



HAL
open science

Dynamique des communautés microbiennes de produits fermentés entretenus par back-slopping . Une démarche participative.

Lucas von Gastrow

► **To cite this version:**

Lucas von Gastrow. Dynamique des communautés microbiennes de produits fermentés entretenus par back-slopping . Une démarche participative.. Alimentation et Nutrition. Université de Montpellier, 2021. Français. NNT: . tel-03519330

HAL Id: tel-03519330

<https://hal.inrae.fr/tel-03519330>

Submitted on 10 Jan 2022

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie et Microbiologie

École doctorale GAIA

Unité de recherche 1083 Sciences Pour l'œnologie, INRAE Montpellier,
Unité de recherche 1253 Sciences et Technologie du Lait et de l'Oeuf,
Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'Intérêt Alimentaire, INRAE Rennes

**Dynamique des communautés microbiennes de produits
fermentés entretenus par *back-slopping*.
Une démarche de recherche participative.**

**Présentée par Lucas VON GASTROW
Le 30 novembre 2021**

**Sous la direction de Delphine Sicard
et Florence Valence**

Devant le jury composé de

Yann DEMARIGNY, Enseignant-Chercheur, ISARA Lyon
Jean-Baptiste BOULE, Chargé de Recherche, CNRS/MNHN
Yuna CHIFFOLEAU, Directrice de Recherche, INRAE
Christophe Chassard, Directeur de Recherche, INRAE
Delphine Sicard, Directrice de Recherche, INRAE
Florence Valence, Ingénieure de Recherche, INRAE

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Co-directrice de thèse
Co-directrice de thèse

Résumé

Les aliments fermentés représentent une part importante de notre alimentation et des différentes cultures gastronomiques à travers le monde. Les microorganismes qui les composent se développent dans un environnement contrôlé par des humains et sont donc susceptibles d'être domestiqués. La communauté microbienne des aliments fermentés étant généralement relativement simple, ils peuvent constituer de bons modèles en écologie microbienne et pour les études de domestication des microorganismes. Ma thèse a porté sur les communautés microbiennes du levain de panification et d'un lait fermenté traditionnel breton nommé Gwell. Ces deux produits sont entretenus par *back-slopping*, c'est à dire qu'une partie d'une production précédente est utilisée pour inoculer la suivante. Ils sont ainsi entretenus par les producteurs parfois pendant plusieurs années de manière continue. La première partie de ma thèse a consisté à étudier la dispersion des microorganismes. J'ai montré que la farine apportée au cours des *back-slopping* n'introduisait pas de nouveaux microorganismes fermentaires dans le levain de panification mature, et que les échanges de ferments entre producteurs de Gwell avaient donné lieu à deux lignées de Gwell dont les communautés microbiennes étaient distinctes. La seconde partie de ma thèse a porté sur la stabilité des communautés microbiennes au cours de leur entretien par les producteurs. Les résultats obtenus ont montré que les boulangers conservaient pour la plupart l'espèce fermentaire majoritaire de leur levain tant qu'ils ne changeaient pas de locaux ni de personne en charge du levain ou n'initiaient pas un nouveau levain. En ce qui concerne le Gwell, nous avons réalisé avec trois producteurs un essai d'évolution expérimentale en fromagerie. Nous avons montré qu'une fréquence accrue de *back-slopping* du Gwell entraînait une acidification plus rapide du lait, car l'espèce de bactérie principalement responsable de l'acidification dans le Gwell était plus résistante aux chocs thermiques et était donc favorisée. Nos résultats suggèrent de plus que les bactéries du Gwell se sont adaptées sur le long terme aux pratiques de *back-slopping* de leur producteur. Ma thèse a été menée avec une approche de recherche participative, les producteurs prenant part à une ou plusieurs étapes du processus de recherche, de l'élaboration des questions de recherche à l'analyse des résultats. Cette approche a permis de mettre en commun nos connaissances scientifiques et empiriques des produits fermentés et d'échanger des savoirs. Ces échanges ont pris la forme de formations, de réunions de préparation des expérimentations, de synthèse des résultats, ou de manière informelle, chemin faisant au cours de la réalisation du projet de recherche.

Abstract

Fermented food are an important part of our diet and of gastronomical cultures around the globe. The microorganisms composing them develop in an environment controlled by humans and can thus be domesticated. Because the microbial communities of fermented foods are generally relatively simple, they can be good models for microbial ecology and domestication studies. My PhD focuses on the microbial communities of sourdough bread and of a traditional fermented milk from Brittany region called Gwell. These two products are maintained by back-slopping, i.e. a part of a previous production is used to inoculate the next one. They are thus maintained by the producers, sometimes during several years. The first part of my thesis consisted in studying the dispersal of microorganisms. I showed that the flour added to sourdough during the back-sloppings did not introduce new fermenting microorganisms into the mature sourdough, and that the exchange of ferments between Gwell producers resulted in two lineages of Gwell with distinct microbial communities. The second part of my thesis focused on the stability of microbial community during their maintenance by producers. My results showed that most bakers maintained the same dominant fermentative yeast species in their sourdough over years, as long as they did not change bakery, bakers, or initiate a new sourdough. With respect to Gwell, we conducted an in-farm experimental evolution assay with three Gwell producers. We showed that an increased frequency of back-slopping resulted in a faster acidification of the Gwell, because the bacterial species mainly responsible for the acidification in Gwell was more resistant to cold shocks and was thus favored. Our results further suggested that Gwell bacteria adapted over the long term to the back-slopping practices of the producer. My thesis was conducted using a participatory approach, with producers taking part in one or more steps of the research process, from the development of the research questions to the analysis of the results. This approach allowed us to share our empirical and scientific knowledges on fermented food. These exchanges took the form of training session, meetings for the preparation of the experimentation, synthesis of results, or informal exchanges, as the research process progressed.

Liste des communications

Publication scientifiques

2020 : von Gastrow L, Madec MN, Chuat V, Lubac S, Morinière C, Lé S, Santoni S, Sicard D, and Valence F : Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter, *Microorganisms* 8(7) :982. doi : 10.3390/microorganisms8070982

2021 (accepté par l'éditeur, non édité) : von Gastrow L, Gianotti A, Vernocchi P, Serrazanetti DA, and Sicard D : Sourdough yeasts diversity, physiology and evolution, In *Handbook on sourdough biotechnology* (2nd edition), Michael Gänzle

A soumettre : von Gastrow L, Amelot R, Segond D, Guézennec D, Bianco J, Valence F and Sicard D : Microbial community dispersal in sourdough, *Molecular Ecology*

A soumettre (revue à définir) : von Gastrow L, Madec MN, Xu YX, Sicard D and Valence F : Dynamics of fermented milk microbial communities under fluctuating environments

Communications scientifiques

22 octobre 2018 : Présentation d'un poster au congrès SFE2ecologie, Rennes. Securing the production of Gwell, a fermented milk specialty from Bretagne.

27 juin 2019 : Présentation orale au Third Jack R. Harlan International Symposium, Montpellier. Securing the production of Gwell, a fermented milk specialty from Bretagne.

19 août 2019 : Présentation d'un poster au congrès de l'ESEB, Turku, Finlande. Securing the production of Gwell, a fermented milk specialty from Bretagne.

15 novembre 2021 : Présentation orale au congrès iGenolevures, congrès en distanciel. Dispersal and stability in sourdough microbial communities.

Interventions auprès des professionnels

Juillet 2021, Juillet 2019 : Formation à destination de boulangers du projet de recherche participative "Gluten, Mythe ou Réalité?", BioCIVAM de l'Aude, Retour des résultats d'analyse de levain, analyse sensorielle.

Février 2020 : Formation à destination de boulangers du projet de recherche participative BAKERY, Association Triptolème, Retours des résultats du projet BAKERY, prise de repères sensorielle lors de la panification, analyse sensorielle de pains.

Janvier 2020, octobre 2021 : Intervention auprès des paysans producteurs de Gwell, Association des Paysans Producteurs de Gwell, Intervention dans le cadre du projet de recherche participative de ma thèse sur le Gwell pour présenter et discuter les résultats obtenus.

Interventions grand public

Octobre 2020, 2021 : Conférence grand public sur le levain de panification, Association Pomme De Pain, Biodiversité et fermentations dans les levains de panification.

Octobre 2021 : Animation d'un atelier à la Fête de la Science à destination d'un public scolaire, Université de Montpellier, Formation Partage Des Sciences, Biodiversité et fermentation dans les levains de panification, observations au microscope.

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour et n'aurait pas eu de sens sans bon nombre de personnes, qui y ont participé de près ou de loin, ou qui ont partagés de petits ou gros morceaux de ma vie durant cette période. Je tenais à toutes et tous vous remercier.

Tout d'abord, un grand merci à mes directrices de thèse, Florence et Delphine. Dès le début de ma thèse, je me suis dit que j'avais une grande chance de vous avoir pour directrices, et jamais je ne suis revenu sur cette idée. Delphine, ta rigueur scientifique et ton inventivité m'ont guidé ces trois années durant. Si je me dis qu'il y a de bons côtés à continuer dans la recherche scientifique, c'est en grande partie grâce à toi. Florence, malgré la distance tu as suivi mon travail et l'a guidé sans discontinuer, merci pour tes remarques toujours constructives. Et surtout merci à toutes les deux pour votre écoute et votre compréhension, d'avoir su m'aider et me remotiver dans les moments difficiles, et de m'avoir accompagné toujours sans pression.

Une thèse se doit d'être validée par la communauté scientifique, et je remercie mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Merci à Yann Demarigny, Jean-Baptiste Boulé, Yuna Chiffolleau et Christophe Chassard d'avoir relu et commenté ma thèse.

Je tiens également à remercier mon comité de thèse, qui m'a suivi et accompagné et dont les remarques ont posé des jalons dans mon projet. Merci à Jérôme Hamelin, Sylvain Gandon, Florentin Constancias, Virginie Galeote, et Frédéric Bigey d'y avoir participé. Je tenais à remercier spécialement Florentin pour ses conseils et son suivi sur les analyses de communautés microbiennes.

La recherche scientifique n'est pas une affaire solitaire, spécialement en biologie. Merci aux membres des UMR SPO et STLO de m'avoir accueilli, et à toutes les personnes qui m'ont formé et assisté pour les expérimentations au laboratoire ou l'analyse des résultats.

Un immense merci à toute l'équipe du CIRM-BIA, et tout spécialement à Marie-Noëlle Madec pour son aide inestimable concernant toutes les analyses de Gwell. Merci également à Victoria Chuat pour son soutien et ses conseils avisés en biologie moléculaire, et à Anne-Sophie Bage pour son aide précieuse en organisation collective d'expérimentation et sa jovialité légendaire. Merci également à Yu-Xiao Xu, qui m'a aidé à passer des milliers de boîtes de Pétri et m'a accompagné dans les fermes lors de son

stage. Ce laboratoire ne tournerait pas rond sans Jessica Musset, que je remercie ainsi que Sébastien Devault pour leur aide à la préparation des milieux et la gestion du nettoyage de toute la verrerie. Merci à Hélène Falentin, Anne Thierry, Marine Penland et Olivier Harle pour les discussions scientifiques toujours intéressantes. Merci également à Laurence Adamandidis et Danielle Guilloux pour la gestion administrative, Anne Giboulot pour la documentation et Sylvie Toillon pour son soutien sur le matériel informatique.

J'ai passé la majeure partie de mon temps au SPO, et je tenais à remercier la "Team Pain", Diego Segond et Stéphane Guezenc pour leur soutien technique, Thérèse Marlin pour sa rigueur sans faille en biologie moléculaire, Laurianne Mietton, avec qui j'ai pris grand plaisir à travailler et à participer aux rencontres avec les boulangers, ainsi que les stagiaires avec qui j'ai travaillé, Rémy Amelot et Juliane Bianco. Merci à Thibault Nidelet d'avoir partagé ses compétences en analyse de données et à Frédéric Bigey pour son assistance en bioinformatique. Merci à Agnès Masquin pour la gestion administrative et Agnès Ageorges pour l'animation de l'UMR et notamment pour l'organisation du dispositif Apprentis Chercheurs. Un grand merci à Elisa Michel de m'avoir accompagné à mes débuts et de m'avoir si bien passé le relais, ainsi qu'à Irene De Guidi, Carmen Becerra-Rodriguez et Elissa Abi-Habib pour leur accueil chaleureux au laboratoire. Merci à Cécile "Fantastica" Neuvéglise pour les discussions passionnantes et notre mini-projet sur les levures brassicoles. Merci à toutes les autres personnes qui rendent le quotidien sympathique, Coline Leriche, Saul Assuncao Bicca (caralho, que demônio !), Cécile Leborgne, Ludovic Monnin, Giovana Girardi Pivva, Olivier Teuf, Hélène Hallé, Stéphanie Roi, Elise Bourru, Marta Avramova, et bien d'autres !

Si la recherche ne se fait pas de manière solitaire, la recherche participative ne se fait pas sans partenaires. J'adresse un immense merci à tous les éleveurs et boulangers avec qui j'ai eu l'occasion de travailler, ainsi qu'aux animateurs qui ont organisé les projets et les rencontres.

Merci beaucoup à Yann Clozel, Elise Laudren, Marion et Benjamin Henry, Violaine et Sébastien Hautchamp, et Thomas Meignan d'avoir participé à l'expérimentation sur le repiquage du Gwell. Merci également à Nicolas Guérin, Lucia, Eglantine Touchais et Cédric Briand pour la construction du projet et les nombreux échanges, notamment lors du séjour à Bra. Rien n'aurait été possible sans le formidable travail d'organisation, de synthèse et de médiation de Stanislas Lubac, que je remercie tout particulièrement.

Je remercie également les boulangers des projets BAKERY et *Gluten, Mythe ou Réalité 2*, qui ont participé à ma thèse, et notamment Christelle Queutier et Jean-Marc Maygnan, Julie Bertrand et Floriant Marteau, ainsi qu'Alexandra Gainon pour leur accueil lors des formations et temps d'échanges collectifs, Alain Bourgeois pour les échanges et Xavier Dell'Armi pour le travail sur le poster "La Panification au levain". Un grand merci également à Kristel Moinet pour l'organisation du projet Gluten, ainsi qu'à Alice Becouze.

Je tiens à remercier Elise Demeulenaere, qui est à l'origine de ma thèse en m'ayant introduit au projet sur le Gwell et présenté Delphine.

L'équipe de Migale fait un travail fantastique, et je remercie particulièrement Olivier Rué pour m'avoir partagé ses scripts, et Valentin Loux et Véronique Martin pour leur réactivité et leur aide à l'utilisation du serveur. Merci également à Sylvain Santoni pour ses conseils et explications sur le séquençage Illumina.

Merci à Hélène Tormo pour les échanges et le partenariat sur les projets de recherche et pour m'avoir introduit au projet Fromics.

Bien que très enrichissantes, ces trois années seraient restées quelque peu vaines et fades sans mes proches, famille, ami-e-s, et autres f[ami]lles dont la relation ne se laisse pas engager si facilement dans des catégories simplistes.

Mes premières pensées vont à mes frères, Guillaume, qui a toujours été pour moi un exemple à suivre de rigueur scientifique et de détermination sans faille voire d'obstination à poursuivre ses projets, et Pierre, P'tit Pierre le facétieux, ou Lord Pierre von Gastrow devrais-je dire, pour les séjours enjaillés à Montpellier.

Merci aux Cretontons, Cretatas et Couzinzins, Alain dont les projets foisonnants m'ont toujours fait rêver, ainsi qu'Ayla, Téliau et Camille pour leur accueil à la Châtaigneraie où les séjours sont à chaque fois source d'expériences inédites, et Sophie, François et Maël, chez qui il est toujours si bon de retourner.

Je remercie les Z'Almayrac, Brigitte, ainsi que Nicolas dont l'exemple m'a donné envie de faire de la recherche et pour leur accueil plus que chaleureux à Lescun, les presque frères Pierre et Matthieu, et bien sûr Etienne, merci à toi et Adriana pour l'accueil et les bons moments à Rennes, il nous reste du pain sur la planche pour refaire le monde! Merci aux autres copaines de Rennes, Maud avec qui les discussions sont toujours aussi animées, Gwen, meilleure acolyte de manif' et Mickael et Gwenn pour m'avoir hébergé à plusieurs reprises.

Merci aux amis de Boulbi, Bizien, Manu, Tristan, Gus', Judith. Merci aux anciens de Cachan, les Gros Bios Auriane, Manon, Delphine, Théo (qui est encore plus musclé après sa thèse), Erwan, Ours, Stackow, Marine, MAB, Arnaud et Eve d'être resté un groupe aussi soudé, merci à Lorenzo d'avoir donné vie à Miraj, Alissa, Exandre et Ellyon et de suivre le chemin de Bryo, à Guillaume et Maylis qui ont décidément le sens de la fête. Merci aussi à Laura Sy et Ivana pour les virées marseillaises. Merci aux autres anciens AST, Pablo, Jérôme, Etienne, Capu et Marjo, qui en viendront tous eux aussi à élever des chèvres, des vaches ou des radis si ce n'est pas déjà fait.

Un grand merci au groupe du LOL, Robin, Yannou, Philou, Naïs, Damien, Hugo, Alice, Joyce, Thomas, Florian pour ces vacances de Gelukkig Nieuwjaar-jeux de société-champagne-raquettes-Philippe Katerine.

Un immense merci à Jonathan, pour être resté si proche et pour les discussions qui m'ont tant aidé. Merci aussi à Eunjung, pour les expérimentations en poterie, tissage, teinture végétale et j'en passe, la

gastronomie coréenne, et tous les bons moments.

Un grand merci à tou-te-s les colocs de la Palette où il fait si bon vivre, à Thibthib', ses musiques expérimentales et ses gésiers, au vénérable doyen EdWeird pour la gestion de l'infrastructure matérielle tout le long de ma thèse : alimentation, déplacements, informatique ! Un grand, grand merci à Cécé, pour tout et c'est pas facile à résumer, les soirées Mamie-Verveine, ta curiosité, la déco kitschou-petites lumières, les discussions à coeur ouvert. . . Merci à Groval, Crissie et Irene avec qui le confinement s'est si bien passé. Merci à Antoine, fermenteur fou, pour les discussions techniques et les transfos alimentaires, à Marianne "L'entremetteuse" Griffon et à Madou de si bien faire vivre cette maison.

Merci à la ferme de la Condamine, Léa, Pippen et Léo, d'avoir participé à me nourrir, aux Jardiniers Toqués pour les belles soirées, et notamment à Fifi pour tes innombrables histoires et pour ton goût prononcé pour les calembours.

Un immense merci aux Tendres d'animer ce bel endroit qu'est la Tendresse, Vincent, Clara qui aura peut-être un jour un nom, ainsi que tous les membres du café-assoc. Merci à Félix pour son si bon pain, à Greg2 aka Boulard pour les jôlis dessins et les séances de ragottage.

Merci aux matelots du BIB, César, Adri, Pistache pour la relecture de mon code Python et de ce manuscrit, Romane, sérigraphiste de folie, Gilles, Max, Mike, Morgan Clou, et bien d'autres. . . Merci aussi aux biologieeks de LABASE, Géronimo, Jeanne, R1 aka Juvénile, Eddy, qui font vivre une recherche alternative et solidaire en dehors des sentiers battus.

Merci aux membres du big band Clara Veut Un Nom, Céline qui est la meilleure prof de musique sur Terre, Lucas Pollen, meilleur joueur de santoor de ma connaissance, que je remercie également pour les cours sur les pollens, et Léo (Delalandre), notre guide, notre métronome.

Merci à Lise de m'avoir transmis la passion des objets jetés en l'air, à Léo (Carex giardi) qui m'a prouvé que les balles pouvaient être presque aussi stylées que les massues, et à tous Lez'Hérault De La Jogle.

Merci infiniment aux Bras-Soeurs, Loup pour la professionnalisation de la brasserie et des fuites, et Théau pour les mille projets expérimentaux, bricolages et transformations alimentaires pharaoniques passées et à venir.

Merci Violaine, de t'être ouverte à moi, d'avoir bien voulu m'inviter chez toi en cette belle soirée de juin, pour toutes les soirées gastronomiques, les errances nocturnes en ville ou en forêt qui ont suivi et toutes celles qui viendront, merci pour ta confiance et ta sincérité.

Mes derniers remerciements vont à mes parents, merci Maman de m'avoir toujours soutenu, pour les bons petits plats et ta confiance sans limite, qui m'a permis d'avoir confiance en moi. Merci aussi Jean-Pierre pour ton accueil chaleureux lors de mes séjours en Bretagne. Et merci, Papa, de m'avoir transmis ta curiosité, le goût du raisonnement et une partie de ton érudition.

Bonne lecture !

"Ils sont là, parmi nous, jamais où tu regardes, à circuler dans les angles morts de la vision humaine. On les appelle les furtifs. Des fantômes ? Plutôt l'exact inverse : des êtres de chair et de sons, à la vitalité hors norme, qui métabolisent dans leur trajet pierres, déchets, animaux ou plantes pour alimenter leurs métamorphoses incessantes."

Alain Damasio, *Les Furtifs*

Table des matières

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Introduction | 1 |
| 1.1 | Évolution des populations et des communautés | 1 |
| 1.1.1 | Théorie de l'évolution et écologie | 1 |
| 1.1.2 | Domestication | 5 |
| 1.2 | Mécanismes et fonctions des fermentations | 7 |
| 1.2.1 | Les différentes fermentations | 7 |
| 1.2.2 | Rôle des microorganismes dans les produits fermentés | 11 |
| 1.2.3 | Méthodes d'ensemencement des produits fermentés | 12 |
| 1.3 | Modèles d'étude utilisés dans la thèse | 13 |
| 1.3.1 | Procédé de préparation du pain au levain et du Gwell | 15 |
| 1.3.2 | Histoire du pain au levain et du Gwell | 16 |
| 1.3.3 | Échelle de production et profil des producteurs | 18 |
| 1.3.4 | Caractérisation des communautés microbiennes | 19 |
| 1.3.5 | Initiation des communautés microbiennes | 22 |
| 1.3.6 | Facteurs influençant la diversité microbienne | 23 |
| 1.3.7 | Stabilité des communautés microbiennes | 24 |
| 1.4 | Une démarche de recherche participative | 27 |
| 1.5 | Objectifs de ma thèse | 29 |
| 2 | Rôle de la dispersion | 45 |
| 2.1 | Introduction | 45 |
| 2.2 | Microbial Community Dispersal In Sourdough | 47 |
| 2.2.1 | Introduction | 47 |
| 2.2.2 | Material and Methods | 49 |
| 2.2.3 | Results | 51 |
| 2.2.4 | Discussion | 59 |
| 2.3 | Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter | 68 |
| 2.3.1 | Introduction | 69 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 2.3.2 | Materials and Methods | 71 |
| 2.3.3 | Results | 77 |
| 2.3.4 | Discussion | 86 |
| 2.3.5 | Conclusions | 90 |
| 3 | Dynamique des communautés au cours du temps | 98 |
| 3.1 | Introduction | 98 |
| 3.2 | Évaluation de la stabilité des levains de panification sur plusieurs années | 101 |
| 3.2.1 | Revue bibliographique | 101 |
| 3.2.2 | Méthodes | 102 |
| 3.2.3 | Résultats | 103 |
| 3.3 | Dynamics of fermented milk microbial communities under fluctuating environments | 112 |
| 3.3.1 | Introduction | 113 |
| 3.3.2 | Material and methods | 115 |
| 3.3.3 | Results | 120 |
| 3.3.4 | Discussion | 128 |
| 3.4 | "Hotline Gwell" : Analyse de Gwell en cours de perte | 140 |
| 3.4.1 | Protocole d'analyse | 140 |
| 3.4.2 | Résultats et interprétations | 140 |
| 4 | Processus de recherche participative et échanges de savoirs | 142 |
| 4.1 | Échanges avec les producteurs de Gwell | 142 |
| 4.1.1 | Historique de l'organisation des producteurs de Gwell | 142 |
| 4.1.2 | Expérimentation sur le repiquage du Gwell | 143 |
| 4.1.3 | Participation aux discussions techniques sur le cahier des charges du Gwell | 146 |
| 4.2 | Echanges de savoirs avec les boulangers | 147 |
| 4.2.1 | Poster sur la panification au levain | 147 |
| 4.2.2 | Formations destinées aux boulangers | 148 |
| 4.2.3 | Ateliers de médiation et de vulgarisation scientifique à destination d'un large public | 151 |
| 4.3 | Apprentis chercheurs | 152 |
| 4.4 | Formation metabarcoding | 152 |
| 5 | Discussion | 155 |
| 5.1 | Synthèse des résultats obtenus dans ma thèse | 155 |
| 5.2 | Diversité des pratiques et des communautés microbiennes | 156 |
| 5.3 | Dispersion de communautés microbiennes de produits fermentés | 159 |
| 5.4 | Stabilité des communautés microbiennes | 159 |
| 5.5 | Avancées et perspectives sur la compréhension de la perte du Gwell | 162 |
| 5.6 | Retour réflexif sur la démarche de recherche participative | 163 |

| | |
|--|------------|
| 5.7 Recherche participative et Low-Tech | 166 |
| Annexes | 175 |
| A Chapitre dans "Handbook on sourdough biotechnology" | 176 |
| B Questionnaires envoyés aux boulangers (stabilité des levains) | 239 |
| C Questionnaires envoyés aux boulangers (projet Gluten) | 242 |
| D Retours de l'essai sur la fréquence de repiquage du Gwell | 248 |
| E Retour des résultats du projet Gluten | 263 |
| F Poster "La panification au levain" | 277 |

Chapitre 1

Introduction

Les microorganismes peuplent l'entièreté de la planète. On les retrouve au plus profond des océans, dans les strates les plus élevées de l'atmosphère, dans le sol et associés aux plantes, et jusque dans nos entrailles. Ils ont d'importantes fonctions, avec parfois un rôle de producteur primaire comme par exemple le phytoplancton marin ou les bactéries fixatrices d'azote atmosphérique dans le sol, ou encore un rôle de transformation de la matière organique que l'on dénomme communément pourriture, putréfaction, ou bien moisissure si c'est le fait d'un champignon filamenteux. Bien que ces termes soient péjoratifs, ces mêmes processus biologiques sont à l'origine de délices parfois très raffinés sous la forme de produits fermentés.

1.1 Évolution des populations et des communautés

Nombre de microorganismes sont associés aux humains et ont subi une domestication, c'est notamment le cas de ceux liés à notre alimentation dans les produits fermentés [1]. Le terme microorganisme fait référence à tout organisme non visible à l'oeil nu [2]. J'adopte une définition plus restrictive, qui désigne l'ensemble des organismes unicellulaires. La domestication étant un processus évolutif, il convient de commencer par poser les bases de la théorie de l'évolution.

1.1.1 Théorie de l'évolution et écologie

La théorie de l'évolution cherche à expliquer au sein d'une population les variations génétiques et phénotypiques au cours des générations [3]. Cette théorie se base sur la théorie développée par Charles Darwin au XIX^{ème} siècle [4], qui n'a depuis cessé d'évoluer et d'être synthétisée après avoir agrégé des concepts d'autres disciplines dont notamment la génétique [5, 6]. On définit classiquement quatre forces évolutives déterminant l'évolution des populations [7].

- La mutation conduit à l'apparition de variants génétiques dans la descendance d'un individu, dont le phénotype est héritable [3]. Le taux de mutation (substitution d'un nucléotide par un autre) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est de l'ordre de 10^{-10} par nucléotide par réplication [8].

La taille de son génome est de l'ordre de 10^7 nucléotides, ce qui correspond donc à un taux de mutation d'environ 10^{-4} par génération. Chez l'espèce de bactérie *Escherichia coli*, ce taux est d'environ 10^{-3} par génération [9]. Cependant, la majorité des mutations n'ont pas d'effet sur le phénotype [10, 11]. La distribution de l'effet des mutations dépend de nombreux facteurs comme la complexité de l'espèce, des facteurs biologiques, de l'environnement, etc. [12, 13]. Une mutation peut avoir un effet sur le phénotype si elle apparaît dans un gène ou dans une région régulatrice d'un gène. Elle peut être silencieuse si elle forme un codon synonyme à celui pré-existant, mais les biais d'usage de codons peuvent tout de même entraîner une modification de l'expression du gène et donc potentiellement modifier le phénotype [14]. Des mutations dans des régions non codantes peuvent également avoir un effet sur le phénotype. Ces mutations peuvent modifier l'expression génique si elles interviennent par exemple dans des sites de liaison à des facteurs de transcription ou à d'autres facteurs ou dans des régions transcrites en ARN régulateurs non codants [15, 16, 17, 18]. Dans la majorité des organismes eucaryotes, une grande proportion du génome est composé d'éléments transposables inactivés, d'introns, de séquences hautement répétées ou de pseudogènes, dans lesquels la plupart des mutations restent sans effet [19].

Le taux de mutation dans le génome peut varier fortement d'une espèce et d'un individu à l'autre ainsi qu'en fonction des conditions environnementales. Certaines espèces de bactéries ainsi que la levure *Saccharomyces cerevisiae* peuvent en effet augmenter leur taux de mutation en conditions de stress, ce qui a pour effet de faire apparaître des variants dont certains pourront être adaptés aux nouvelles conditions [20, 8]. On peut considérer que les variations d'origine non génétique sont des mutations, dès lors qu'elles se transmettent à la descendance. Ces variations peuvent par exemple être d'origine épigénétique via la méthylation de l'ADN et la modification de la structure de la chromatine, la présence de petits ARN régulateurs dans le cytoplasme, ou encore via des protéines prions [21, 22]. Ce type de mutation est généralement réversible et on parle dans ce cas de plasticité transgénérationnelle [23].

- La sélection est le processus par lequel certains individus, du fait de leur phénotype, donnent plus de descendants que les autres [3]. On peut définir une valeur sélective (*fitness* en anglais), associée à un génotype ou à un phénotype, qui correspond au nombre moyen de descendants engendrés par les individus possédant ce génotype ou phénotype [24]. Cette valeur sélective peut être absolue, et donc correspondre au nombre absolu de descendants engendrés, ou relative, et donc correspondre à la proportion de descendants possédant le génotype ou phénotype considéré dans la population. Il n'est pas toujours possible de mesurer directement le nombre de descendants engendrés par chacun des individus d'une population, et on utilise donc souvent d'autres mesures qui constituent des approximations de la valeur sélective [25]. Cela peut être pour les animaux supérieurs la masse des individus [26], et en microbiologie la taille maximale d'une population ou son temps de génération. De nouvelles méthodes de microfluidique en cellule unique permettent maintenant d'obtenir des informations plus précises au niveau des individus [27].

La sélection est liée à la notion d'adaptation [4]. On appelle adaptation un trait phénotypique qui est maintenu et qui a évolué du fait de la sélection [28]. Cette définition recouvre donc à la fois le sens courant du terme "adaptation", qui s'applique à un individu qui sait tirer le meilleur parti de son environnement et dont les exemples foisonnent, mais ne s'y réduit pas. En effet selon cette définition n'importe quel trait phénotypique entraînant un plus grand nombre de descendants est dit adaptatif. Ainsi des traits sous sélection sexuelle sont adaptatifs puisqu'ils permettent d'avoir plus de descendants, mais ne correspondent pas forcément au sens courant d'une adaptation puisqu'ils peuvent constituer un véritable fardeau pour les individus qui les possèdent. L'exemple typique est la queue du paon, qui constitue un handicap pour les mâles mais qui reste sélectionnée du fait du choix des femelles [29]. D'une manière plus générale, on peut également distinguer les adaptations qui permettent directement une meilleure utilisation des ressources du milieu que les organismes environnants, que l'on pourrait considérer comme une adaptation au sens propre, et les traits phénotypiques sélectionnés car ils permettent une inhibition du développement des autres organismes, voire leur destruction [30]. Un exemple dans le monde microbiologique du premier type d'adaptation serait la présence d'une enzyme permettant la consommation du fructose donnant ainsi la capacité à un organisme de se développer sur des fruits, comme c'est le cas pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* [31], ou les levures du clade *Wickerhamiella/Starmerella* dont un ancêtre a acquis une enzyme nécessaire pour l'assimilation du saccharose par transfert horizontal depuis une bactérie [32]. Un exemple du deuxième type d'adaptation serait la présence d'armes biologiques, comme chez certaines bactéries qui possèdent des systèmes de sécrétion parfois très sophistiqués leur permettant de concentrer des toxines dans le milieu environnant voire de les injecter directement dans une cellule cible [33].

- La dispersion correspond à des déplacements d'individus d'une population à une autre [3]. Les organismes peuvent disperser de manière autonome s'ils sont motiles, ou via des vecteurs. On distingue les vecteurs biotiques, c'est à dire vivants, et abiotiques, non-vivants. Le vent ou l'eau qui court sont des vecteurs abiotiques de dispersion. On retrouve des microorganismes dans des strates élevées de l'atmosphère [34], et les vents constituent ainsi un vecteur de dispersion de microorganismes, potentiellement à l'échelle des continents. Des vecteurs biotiques peuvent également participer à la dispersion de microorganismes. Différents animaux tels que des insectes ou des oiseaux sont ainsi des vecteurs de dispersion de levures et de bactéries, via leur microbiote intestinal [35, 36]. La drosophile disperse ainsi des microorganismes en se déplaçant de fruit en fruit pour s'en nourrir. La dispersion joue un rôle dans l'évolution des espèces en permettant des flux de gènes d'une population à une autre, par reproduction sexuée ou transfert horizontal de matériel génétique.
- Enfin la dérive renvoie aux phénomènes stochastiques dans la reproduction de certains individus d'une population [3]. L'importance de la dérive est liée à la taille de la population. Dans une population de faible taille, les variations stochastiques de la fréquence des allèles sont plus importantes que dans une population de grande taille.

Le terme *force* fait référence aux forces physiques définies par la mécanique Newtonienne, et son utilisation dans le cadre de la théorie de l'évolution des espèces par sélection naturelle fait débat chez les philosophes de la biologie depuis le début des années 2000. Certains sont partisans d'une interprétation statistique de la théorie de l'évolution [37]. Ils proposent de considérer les différents processus évoqués précédemment comme des grandeurs statistiques rendant compte de l'état d'un système biologique et non comme des forces. Les partisans de l'analogie avec la mécanique Newtonienne montrent que ces processus évolutifs ont des caractéristiques qui permettent de les rapprocher de forces au sens physique du terme : ils sont la cause de changements dans les proportions d'individus observés, ils ont une direction, une magnitude et on peut leur trouver une base matérielle [38, 39]. J'utiliserai donc le terme de force pour désigner ces processus évolutifs.

La théorie de l'évolution ainsi décrite s'applique à une population, c'est à dire à un ensemble d'individus d'une même espèce. La discipline qui s'intéresse aux interactions d'organismes de différentes espèces entre eux et avec leur environnement est l'écologie [40]. L'écologie considère que la mutation est un phénomène rare, et que l'apparition et la sélection de variants se déroule sur une temporalité longue. Elle étudie donc classiquement des interactions entre espèces sur une temporalité courte sans considérer qu'elles puissent évoluer, tandis que l'évolution s'attache à décrire et expliquer l'apparition et la sélection de variants au sein d'une espèce ainsi que l'apparition de nouvelles espèces. Cette distinction tend cependant à s'estomper [41], notamment avec l'étude des communautés et la prise en compte de phénomènes d'évolution rapide [42]. Une communauté est un ensemble d'organismes de différentes espèces regroupés dans un même écosystème. On peut utiliser les concepts développés dans le cadre de la théorie de l'évolution pour expliquer les variations de proportions des différents individus qui composent une communauté. VELLEND [43] a ainsi proposé une synthèse de l'écologie des communautés qui reprend le cadre théorique des forces évolutives pour expliquer l'évolution des communautés. D'une manière plus générale, on définit les métapopulations [44, 45] ainsi que les métacommunautés [46] comme des ensembles de populations ou de communautés séparées mais entre lesquelles il existe de la dispersion. Ces différents niveaux d'assemblage d'organismes au sein d'écosystèmes est schématisée figure 1.1.

Niveaux et indices de diversité

A chaque niveau d'organisation correspond un niveau de diversité [40]. La biodiversité est ainsi un concept qui opère à plusieurs échelles. On distingue ainsi la diversité intra-spécifique (aussi appelée diversité génétique), qui correspond à la diversité des individus d'une même espèce au sein et entre des populations, la diversité alpha qui correspond à la diversité des espèces au sein d'une communauté, et la diversité bêta qui correspond aux différences de composition en espèce de plusieurs communautés. La diversité bêta d'une méta-communauté est nulle si toutes les communautés ont la même composition en espèces, et maximale si toutes les communautés sont composées d'espèces différentes. La diversité gamma décrit le nombre total d'espèce ou de taxons au sein de la méta-communauté. C'est l'équivalent de la diversité alpha mais appliqué à une méta-communauté.

Différents indices sont utilisés pour mesurer ces niveaux de diversité. Pour la diversité alpha, l'indice le plus simple est la diversité observée, qui correspond au nombre d'espèce ou de taxons trouvés dans la communauté. D'autres comme l'indice de Shannon prennent en compte l'abondance des différents taxons. Pour la diversité bêta de nombreux indices ont été développés [47]. L'indice de dissimilarité de Bray-Curtis est largement utilisé, avec deux variantes prenant en compte ou non l'abondance de chaque taxon [48]. La distance Unifrac a été développée spécifiquement pour le calcul de la diversité bêta de communautés microbiennes et prend en compte l'abondance des différents taxons mais également leur distance phylogénétique [49].

La théorie de l'évolution nous permet de comprendre le processus de domestication.

1.1.2 Domestication

Le terme domestication dérive du latin *domus*, qui signifie "le foyer", "la maison" [50]. Ce concept a initialement été défini pour décrire l'évolution de plantes et d'animaux du fait de leur utilisation par les humains [51]. Des études plus récentes portent sur la domestication d'autres organismes, et notamment de microorganismes. Différentes définitions sont actuellement acceptées, et dépendent en partie des organismes considérés. Une définition restrictive, et plutôt utilisée pour la domestication des animaux, désigne le contrôle exercé par les humains sur les mouvements, la nutrition, la protection et surtout la reproduction de l'organisme domestiqué [52].

Une autre définition, plus utilisée concernant la domestication des plantes, élargit le sens du terme domestication en le considérant comme une coévolution entre une espèce animale et une autre espèce. Selon cette définition, la domestication renvoie au processus par lequel une espèce et l'animal qui s'en nourrit évoluent en établissant une relation symbiotique de dispersion et de protection [53], cette relation symbiotique étant facilitée par des adaptations de l'espèce domestiquée et des modifications du comportement de l'animal. La relation qu'établissent certaines fourmis avec les champignons qu'elles cultivent au sein de la fourmilière correspond selon cette définition à de la domestication [54].

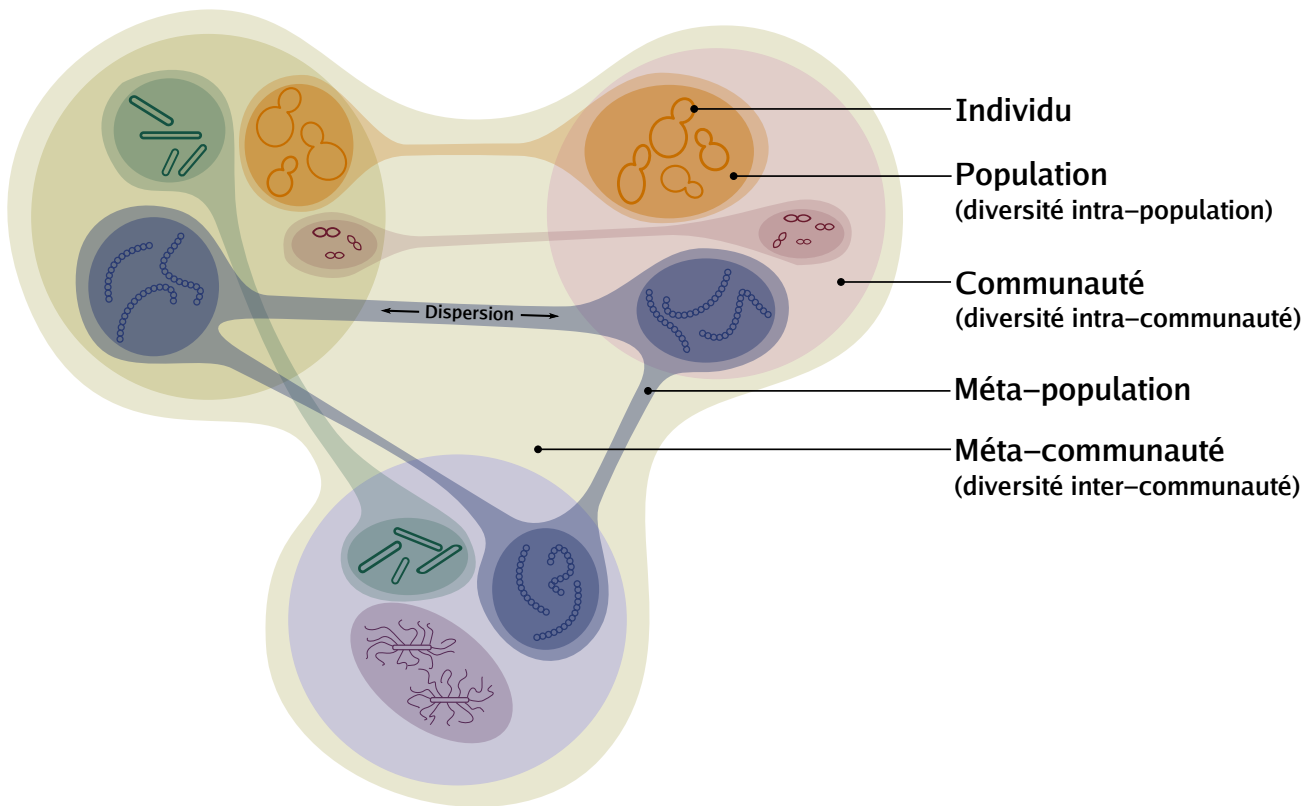


FIGURE 1.1 – Niveaux d'assemblages des organismes au sein d'un écosystème. Chaque espèce est représentée par une couleur. Une population est un ensemble d'individus d'une même espèce, et une communauté regroupe plusieurs populations d'espèces différentes. Les métapopulations et métacommunautés sont des populations et communautés séparées mais entre lesquelles il existe de la dispersion. Les différents niveaux de diversité classiquement étudiés sont indiqués. La diversité intra-population est également appelée diversité génétique ou diversité intra-spécifique, et concerne la diversité des individus d'une même espèce. La diversité intra-communauté est aussi nommée diversité alpha. La diversité inter-communauté est synonyme de diversité bêta, et correspond à la diversité des différentes communautés dans une méta-communauté. Différents indicateurs permettent de mesurer ces diversités. Enfin la diversité gamma concerne le nombre d'espèces de la méta-communauté.

J'adopte dans ce manuscrit une définition proche de celle-ci, que l'on peut simplifier et restreindre aux humains. La domestication est le processus par lequel des espèces évoluent du fait de leurs interactions avec des humains et s'adaptent ainsi aux niches agro-écologiques humaines [55]. C'est en imposant des contraintes de sélection particulières que les humains domestiquent d'autres organismes. Au-delà de la sélection, les humains influencent l'évolution des autres espèces en contrôlant ou limitant leur dispersion, ou encore en modifiant leur taux de mutation.

Il est important de réaliser que le processus de domestication s'est réalisé en grande partie de manière non-intentionnelle [55]. Cela est particulièrement flagrant concernant les microorganismes, dont l'existence n'était pas connue avant l'utilisation du microscope, à la fin du XVI^{ème} siècle. Il y a pourtant de nombreuses preuves de domestication de microorganismes, notamment du fait de la production de produits fermentés depuis la préhistoire [56, 57]. Afin de démontrer qu'un microorganisme a été domestiqué, on compare la croissance de souches issues du milieu dans lequel il est cultivé par l'homme à celui de souches de la même espèce isolées dans des milieux non-anthropisés. On mesure alors sa valeur sélective, via sa vitesse de croissance ou la taille maximale de population par exemple, pour savoir s'il est mieux adapté que les souches sauvages, auquel cas il a été domestiqué. On peut également chercher des signatures de domestication au niveau de son génome, avec par exemple des pertes de gènes non utiles dans le milieu, ou des duplications ou modification de l'expression de gènes adaptatifs. On a pu trouver de tels marqueurs de domestication chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, présente dans de nombreux produits fermentés dont le pain, le vin ou la bière [58, 59, 60], ou encore chez la bactérie *Lactococcus lactis*, retrouvée dans de nombreux produits laitiers [61, 62, 63]. Ces microorganismes se sont retrouvés soumis à des contraintes évolutives particulières dans l'environnement des produits fermentés et ont évolué en conséquence. Ils présentent des adaptations à ces milieux et ont donc été domestiqués. Des produits fermentés sont préparés sur différents types de matières premières, avec des objectifs et des méthodes diverses, imposant dans chaque cas des contraintes évolutives différentes sur les microorganismes qui les composent.

1.2 Mécanismes et fonctions des fermentations

1.2.1 Les différentes fermentations

Le terme fermentation trouve son origine dans le latin *fermentum* "ferment" qui dérive lui-même de *bher-men-tom*, où l'on retrouve la racine indo-européenne **bher* qui signifie bouillonner [50]. Cette racine a également donné les termes latins *fervere* "bouillir" ou *fervor* "bouillonnement". La fermentation est donc liée à l'origine à l'idée de bouillonnement, et de nombreuses fermentations s'accompagnent effectivement de la production de gaz formant des bulles. En biochimie, on définit la fermentation comme une voie métabolique qui permet la transformation de carbohydrates (glucose, saccharose, fructose, etc.) en énergie utilisable par la cellule avec un accepteur final d'électron endogène et sans chaîne de transfert d'électrons, donc notamment sans dioxygène [2]. Ces processus métaboliques entraînent

une dégradation plus ou moins complète des carbohydrates, et génèrent des composés qui peuvent s'accumuler (acides organiques, CO_2 , etc.) en fonctions des microorganismes impliqués et des conditions environnementales. Il existe différents types de fermentations, réalisées par différents types de microorganismes. La grande majorité des produits fermentés actuellement consommés sont issus de la fermentation alcoolique (pain, bière, vin, etc.) ou lactique (produits laitiers fermentés, légumes fermentés, yaourts végétaux, etc.). L'acétification, qui correspond à la production d'acide acétique à partir d'éthanol, est également un processus biologique largement utilisé pour la transformation d'aliments comme le vinaigre ou le kombucha, mais ne constitue pas à proprement parler une fermentation puisque l'accepteur final d'électrons est le dioxygène, qui est exogène (figure 1.2). Des microorganismes réalisant ces différents types de réaction (fermentation alcoolique ou lactique, acétification, etc.) peuvent être présents en même temps dans la communauté microbienne d'un produit fermenté.

Les microorganismes responsables de la fermentation alcoolique que l'on retrouve le plus communément dans les produits fermentés sont les levures, qui sont des champignons unicellulaires. Ces levures appartiennent généralement à la classe des *Saccharomycetales* [64]. Certaines bactéries peuvent également réaliser cette fermentation mais on ne les retrouve que rarement dans les produits fermentés [65]. Cependant, de l'éthanol peut être produit en plus d'autres composés lors de la fermentation mixte chez *Escherichia coli* [66], ou chez certaines bactéries lactiques hétérofermentaires telles que celles du genre *Leuconostoc* [67]. La fermentation alcoolique est basée sur la glycolyse, ou voie de Embden–Meyerhof–Parnas, et entraîne la transformation de chaque molécule de glucose en une molécule d'éthanol et une de CO_2 . De nombreux sucres peuvent être consommés par cette voie mais ils doivent généralement être transformés en glucose-6-phosphate ou fructose-6-phosphate. Des levures de l'ordre des *Saccharomycetales* réalisent la fermentation alcoolique même en présence d'oxygène lorsqu'il y a suffisamment de sucres dans le milieu [68]. On appelle ce phénomène l'effet Crabtree. Il concerne les levures des genres *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovozyma*, *Nakaseomyces*, *Tetrapisispora* et *Vanderwaltozyma*. Or le rendement énergétique de la fermentation est bien inférieur à celui de la respiration aérobie, on pourrait donc supposer que la respiration serait favorisée en présence d'oxygène. Les levures qui ne présentent pas cet effet Crabtree utilisent d'ailleurs les sucres de manière plus efficace pour produire de la biomasse que celles qui le réalisent. Les levures qui fermentent en conditions aérobies consomment donc plus de sucres que si elles respiraient, mais les consomment plus rapidement. Deux hypothèses permettent de résoudre la contradiction apparente du "gâchis" de sucres lié à l'effet Crabtree. La première est résumée par le triptyque "Produire-Accumuler-Consommer" [68]. Les levures fermenteraient les sucres en conditions aérobie afin de les consommer rapidement pour accumuler de l'éthanol dans le milieu, ce qui empêche d'autres organismes de s'y développer. Une fois tous les sucres consommés, elles peuvent alors consommer l'éthanol produit et ainsi atteindre un développement maximal en limitant la compétition. Cette stratégie est viable en présence d'une grande quantité de sucres, et elle aurait ainsi coévolué avec le l'apparition des fruits chez les végétaux supérieurs, il y a environ 125 Ma. Cette hypothèse n'est cependant pas suffisante pour expliquer l'effet Crabtree, et une autre hypothèse repose sur un compromis entre le rendement et le taux de production d'énergie.

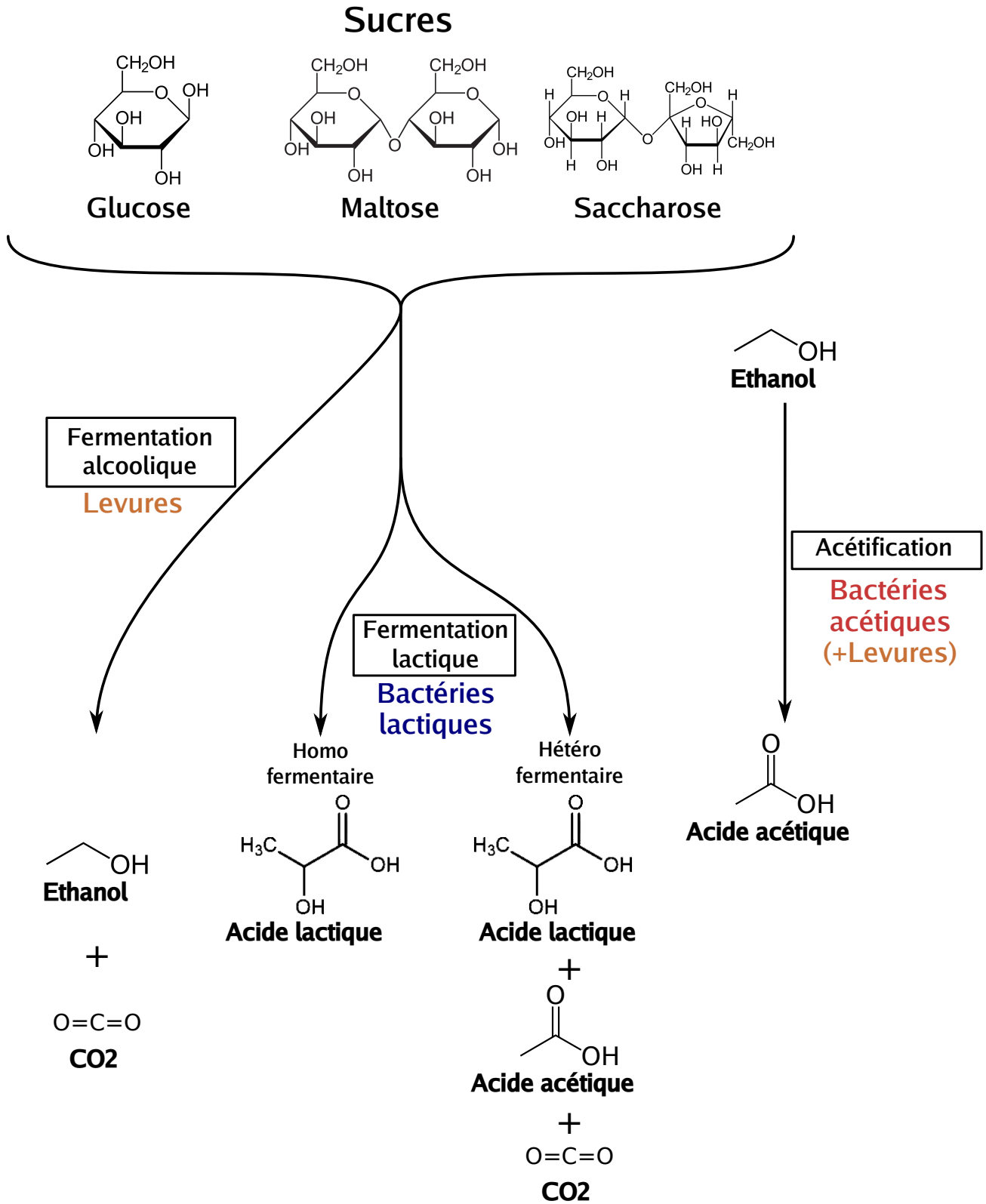


FIGURE 1.2 – Différents types de fermentations réalisées dans les produits fermentés. L'acétification, qui correspond à la transformation de l'éthanol en acide acétique, fait intervenir du dioxygène qui est l'accepteur final d'électrons. Cette réaction n'est donc pas à proprement parler une fermentation, dont l'accepteur final d'électrons doit être endogène.

La respiration a un meilleur rendement énergétique que la fermentation, mais un taux de production moindre. Or le taux de production d'énergie sous forme d'ATP est un paramètre plus important dans la compétition entre microorganismes que le rendement maximal. La fermentation serait favorisée même en présence d'oxygène car elle donnerait un avantage sélectif du fait d'un meilleur taux de croissance [69].

La fermentation lactique est le plus souvent le fait de bactéries, que l'on nomme bactéries lactiques [70]. Elle correspond à la transformation de sucres en acide lactique. On distingue deux types de bactéries lactiques, qui réalisent deux fermentations lactiques différentes [67]. Les espèces homofermentaires transforment chaque molécule de glucose en deux molécules d'acide lactique. Les espèces hétérofermentaires transforment le glucose en acide lactique, en acide acétique et en CO_2 . La voie homofermentaire est basée comme la fermentation alcoolique sur la voie de Embden–Meyerhof–Parnas, et les sucres sont d'abord transformés dans la plupart des cas en glucose-6-phosphate ou fructose-6-phosphate. La voie hétérofermentaire démarre également par un glucose-6-phosphate mais diffère de cette voie dès la deuxième étape, et passe par des intermédiaires à 5 carbones, une molécule de CO_2 étant produite. Les pentoses ne peuvent être fermentés que par cette voie, et il n'y a dans ce cas pas de production de CO_2 . Les bactéries lactiques regroupent des bactéries Gram+ de la classe des *Lactobacillales*, dont les principales familles sont les *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, et les *Streptococcaceae*. Le type de fermentation lactique n'est pas un critère taxonomique au sens où il ne permet pas de constituer des groupes monophylétiques. Cependant, certains genres sont strictement hétérofermentaires, comme *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Levilactobacillus*, *Limosilactobacillus* ou *Fructilactobacillus*. D'autres sont strictement homofermentaires, comme *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, ou *Companilactobacillus*. Certaines enfin sont hétérofermentaires facultatives, et peuvent réaliser les deux types de fermentation lactique. C'est le cas de *Latilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* ou *Lacticaseibacillus*.

Les fermentations lactiques et alcooliques correspondent ainsi à la métabolisation d'un glucose. Les sucres disponibles dans l'environnement le sont souvent sous forme de disaccharides, comme la lactose qui est composé d'un glucose et d'un galactose, le maltose composé de deux glucoses ou le saccharose composé d'un glucose et d'un fructose. Les microorganismes qui les fermentent ont ainsi des enzymes qui leur permettent de rompre la liaison entre les deux unités de ces disaccharides pour les fermenter [67]. *L. lactis*, *S. thermophilus* et les bactéries thermophiles du genre *Lactobacillus* ont un système d'import du lactose, qui est ensuite clivé en glucose et galactose par une β -galactosidase. Chez *S. thermophilus* et les *Lactobacillus* thermophiles le galactose ainsi produit n'est pas métabolisé mais rejeté dans le milieu extérieur. Similairement, le maltose est transformé en glucose-6-phosphate et glucose par une maltose phosphorylase chez *F. sanfranciscensis*. Le glucose-6-phosphate est métabolisé tandis que le glucose est rejeté dans le milieu extérieur. La présence d'une enzyme permettant de métaboliser le maltose chez les levures dépend des espèces, et *S. cerevisiae* en possède une tandis que *K. humilis* ou *K. exigua* n'en ont pas [71].

1.2.2 Rôle des microorganismes dans les produits fermentés

La fermentation d'aliments répond à différents objectifs. Le principal est certainement la conservation [72]. En effet, de nombreux microorganismes sont capables de se développer sur et dans les aliments, pouvant mener à leur perte, soit simplement par décomposition ou altération, soit par le développement de microorganismes pathogènes. La préparation d'un produit fermenté consiste donc à sélectionner des microorganismes pouvant être ingérés et qui transforment l'aliment tout en conservant ses capacités nutritives. Les molécules produites lors de la fermentation comme l'acide lactique ou l'éthanol jouent un rôle dans cette conservation : en s'accumulant dans le milieu elles inhibent le développement d'autres microorganismes potentiellement pathogènes ou altérant. Ainsi le fromage permet de transformer le lait et d'en conserver les protéines, consommables plusieurs mois voire années après la traite. La production d'acide lactique mais aussi d'autres métabolites (autres acides organiques, peptides antimicrobiens, etc.) par les bactéries lactiques inhibe le développement de nombreuses espèces, et notamment de pathogènes [73]. Il en est de même pour les légumes fermentés comme le kimchi ou la choucroute.

Un autre intérêt de la fermentation réside dans les bénéfices qu'elle peut apporter d'un point de vue nutritif ou pour la santé. Pendant la fermentation, les bactéries lactiques peuvent synthétiser divers métabolites d'intérêt : des acides organiques comme l'acide lactique, d'autres acides gras à chaîne courte, des vitamines, des peptides bio-actifs, des composés phénoliques, et beaucoup d'autres. L'effet santé de ces différents métabolites a fait l'objet d'une revue bibliographique récente [74]. Parmi ces métabolites on retrouve notamment les acides linoléiques conjugués, qui ont un effet hypotenseur ou les exopolysaccharides (EPS) qui peuvent avoir des propriétés prébiotiques, c'est-à-dire favoriser certaines bactéries du microbiote intestinal. La fermentation peut également permettre d'éliminer certains facteurs anti-nutritionnels, des composés qui altèrent la digestibilité de certains nutriments ou diminuent la biodisponibilité de minéraux, voire peut permettre de rendre comestible un produit qui ne l'était pas dans son état brut via un effet de détoxification. Ainsi dans le pain préparé au levain dans les minéraux sont plus disponibles pour l'organisme que dans un pain préparé à la levure uniquement [75], et le manioc, riche en composés cyanogéniques, ou certaines variétés de pommes de terre au Pérou sont consommés seulement après un long processus de maturation parfois réalisé par fermentation [76]. Les produits fermentés peuvent également apporter des microorganismes vivants qui peuvent interagir avec le microbiote intestinal [77, 78]. Cependant, peu d'études cliniques ont permis de vérifier les bénéfices pour la santé qu'apportent les produits fermentés via le développement de probiotiques, sauf dans le cas du yaourt et de certains produits laitiers [79, 80].

Enfin, les aliments peuvent être fermentés pour leur intérêt gustatif et sensoriel. La fermentation transforme l'aliment et lui apporte de nouvelles saveurs, ou révèle et amplifie des goûts déjà présents [81, 82].

Ces différents critères ont amenés les humains de tous les continents à développer de manière empirique des produits fermentés divers, à partir de multiples matières premières et selon de nombreux procédés. On dénombre ainsi plus de 5000 produits fermentés [72]. Les objectifs liés à la fermentation

des aliments et les différentes méthodes d'obtention des produits fermentés constituent les pressions de sélection exercées sur les microorganismes qui sont à l'origine de leur domestication. La méthode d'ensemencement microbien d'un aliment fermenté est un paramètre fondamental du procédé de fabrication, qui détermine la manière dont évoluent les microorganismes qui le composent.

1.2.3 Méthodes d'ensemencement des produits fermentés

On peut distinguer différents types de produits fermentés en fonction de l'origine des microorganismes qui y réalisent la fermentation.

Dans certains cas, aucun microorganisme n'est ajouté intentionnellement. Des microorganismes se développent tout de même, ils peuvent provenir des matières premières, des ustensiles utilisés, de l'air ambiant, ou encore du microbiote de la personne préparant le produit. On peut alors parler de fermentation spontanée, au sens où les microorganismes qui fermentent sont endogènes et non ensemencés intentionnellement. Les bières de type lambic, les vins dits "nature", certains fromages au lait cru ou la majorité des légumes fermentés sont produits de cette manière. Dans certains cas la limite entre un ensemencement intentionnel ou non peut être tenue, notamment lorsqu'un biofilm est cultivé et entretenu sur un ustensile, par exemple sur les cuves en bois comme la gerle qui sert à fabriquer le Salers [83] ou la Tina qui sert à fabriquer le Ragusano en Sicile [84].

La majorité des produits fermentés sont produits par ensemencement d'un ferment [85]. On peut distinguer deux types de ferments : ceux entretenus par *back-slopping* et les souches pures. Le *back-slopping* consiste à nourrir régulièrement une communauté microbienne par l'ajout de matière première (eau, lait, farine, fruit, etc., en fonction du produit). On utilise une partie de cette communauté microbienne pour ensemer la production. C'est comme cela qu'on produit le kefir, le vinaigre, le levain de panification ou encore certains laits fermentés. L'initiation du ferment peut varier. Dans certains cas, comme pour le levain, on peut initier la fermentation en mélangeant simplement la matière première et la communauté microbienne s'installe naturellement. La communauté microbienne est ensuite propagée par *back-slopping*. Dans d'autres, comme pour le kéfir, on ne sait pas initier une nouvelle communauté microbienne et il faut s'en procurer une vivante pour pouvoir la reproduire.

L'utilisation de souches pures permet un contrôle plus important sur la production, en utilisant des microorganismes aux caractéristiques connues et qui ont été sélectionnés pour une fonctionnalité désirée [86]. L'utilisation d'un ferment, aussi bien une souche pure qu'un ferment entretenu par *back-slopping*, peut s'accompagner de la stérilisation des matières premières afin de s'assurer que seuls les microorganismes voulus se développent.

Le type et l'origine du ferment, associé à la technologie mise en oeuvre, influencent donc la diversité microbienne (diversité alpha) du produit fermenté (Figure 1.3). Au début de la fermentation, on observe généralement une gradation depuis les aliments produits sans ajout de ferment qui présentent une diversité microbienne plus importante que ceux produits par *back-slopping*, eux-mêmes étant plus diversifiés que ceux produits à partir de souches pures. Dans tous les cas, du fait de la compétition un

nombre limité de souches finit par dominer l'écosystème [87].

On peut ainsi voir l'utilisation de ferments comme une manière de contrôler la dispersion. En absence d'utilisation de ferment, la dispersion est très peu contrôlée et on peut supposer qu'elle joue un rôle important dans le développement de la communauté microbienne. Dans le cas de l'utilisation d'un ferment avec stérilisation de la matière première, la dispersion est au contraire maintenue à son minimum et entièrement contrôlée. Dans le cas de l'utilisation d'un ferment sans stérilisation, elle est intermédiaire, certains microorganismes pouvant provenir des matières premières et les autres du ferment. Les microorganismes introduits entrant en compétition avec ceux naturellement présents, la proportion dans lesquels on les introduit détermine leur importance relative dans la communauté microbienne ainsi produite.

Quel que soit le type de ferment, la sélection imposée par la méthode de fabrication, la température ou encore le temps de fermentation jouent un rôle important dans le développement de la communauté. Cependant, on peut considérer que l'évolution est en quelque sorte figée dans le cas de l'utilisation d'une souche pure sélectionnée. En effet, la souche est dans ce cas conservée dans un centre de ressource biologique et réutilisée à chaque nouvelle production. S'il arrive qu'elle mute et que le variant soit sélectionné, il ne perdurera pas à la fabrication suivante. A l'inverse, dans le cas d'un ensemencement par *back-slopping*, la communauté microbienne est maintenue au cours du temps et réutilisée à chaque fabrication. Elle évolue donc en réponse aux changements apportés dans la composition des matières premières ou dans le procédé de fabrication. Du point de vue de la conservation des ressources biologiques, l'utilisation de souches pures correspond à une conservation *ex situ*, et l'utilisation d'un ferment entretenu par *back-slopping* à une conservation *in situ*.

Cette thèse porte sur des produitsensemencés par un ferment entretenu par *back-slopping*. Il s'agit d'évaluer le rôle de la dispersion ainsi que des changements dans les pratiques des producteurs sur l'évolution des communautés microbiennes de ces produits. Je m'intéresse notamment à la stabilité au cours du temps de ces communautés microbiennes.

1.3 Modèles d'étude utilisés dans la thèse

Mes travaux portent sur deux produits fermentés : le levain de panification et un lait fermenté breton nommé Gwell. Ils sont produits à partir de matières premières très différentes, de la farine de céréales pour le levain et du lait pour le Gwell. Ils diffèrent également dans le processus de fabrication, par l'initiation de la communauté microbienne et par la stérilisation ou non de la matière première à chaque cycle de production. La principale caractéristique qui les rapproche est leur méthode de propagation, par *back-slopping*. Ils constituent ainsi tous deux des communautés microbiennes qui évoluent au cours du temps sous l'influence des différentes pratiques des producteurs. Le fait que ces produits soient très contrastés permet de gagner en généralité concernant l'étude de l'influence de phénomènes fondamentaux tels que la dispersion ou les variations de l'environnement abiotique sur l'évolution des communautés microbiennes.

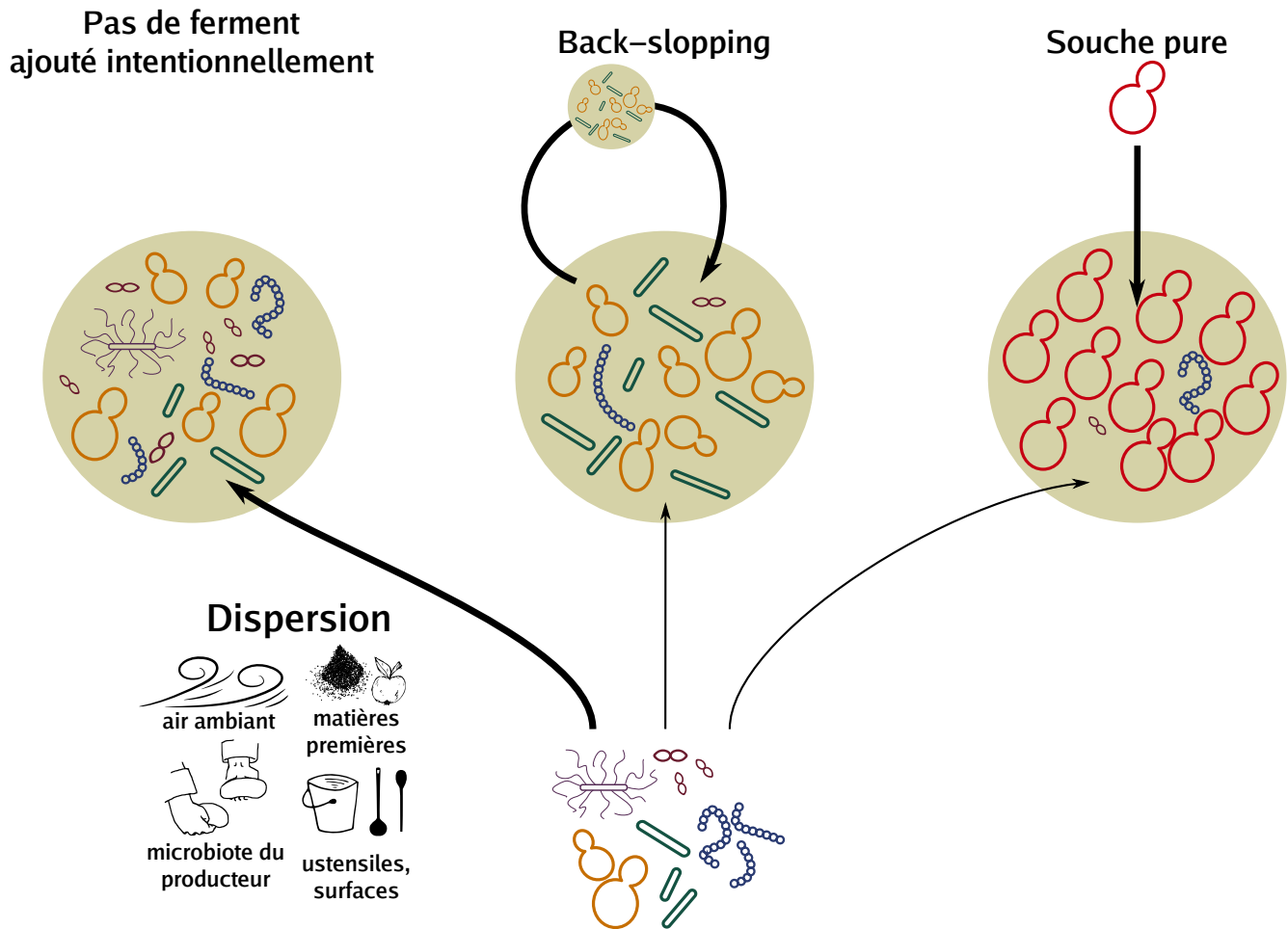


FIGURE 1.3 – Schématisation des différentes méthodes de fermentation et lien avec la dispersion et la diversité dans les produits fermentés. Dans le cas d'un produit fermenté sans ajout intentionnel de ferment, la dispersion depuis l'environnement de production (air ambiant, matières premières, ustensiles, microbiote du producteur, etc.) est maximale et la diversité microbienne dans le produit en début de fermentation élevée. L'importance de la dispersion depuis l'environnement de production est réduite dans le cas du *back-slopping*. La diversité microbienne au début de la fermentation est minimale lorsque l'on utilise des souches pures et intermédiaire par *back-slopping*. On peut voir l'ajout de ferment (*back-slopping* ou souche pure) comme une manière de contrôler la dispersion. En effet on introduit alors les microorganismes désirés en grande quantité et l'importance relative de ceux venant de l'environnement de production est moindre.

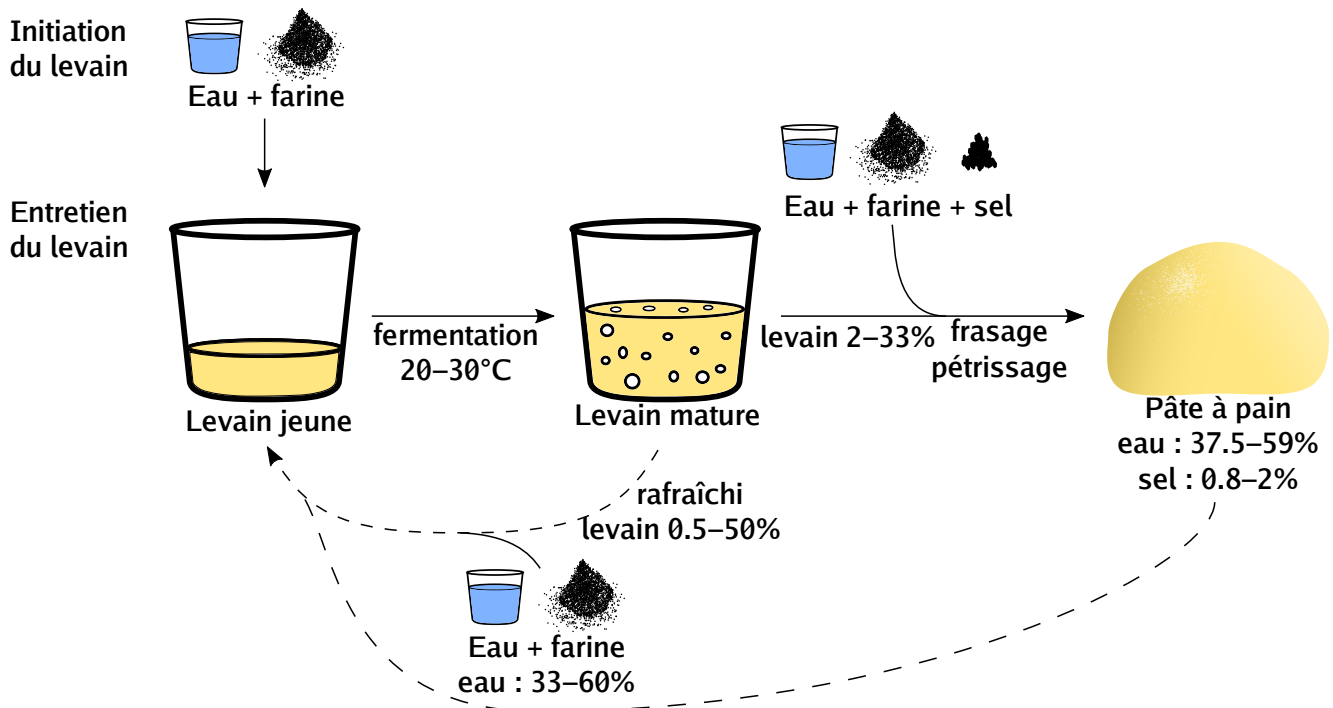


FIGURE 1.4 – Schéma de la préparation du levain de panification. Il existe deux méthodes d'entretien : ou bien le nouveau levain est prélevé à partir d'un levain mature avant la panification, ou bien l'ensemble du levain est intégré dans la pâte à pain est c'est un bout de pâte qui est prélevé et qui constitue le levain qui sera utilisé à la panification suivante. Les données numériques ont été obtenues à partir des résultats d'enquête sur les pratiques boulangères de MICHEL et al. [88].

1.3.1 Procédé de préparation du pain au levain et du Gwell

Préparation du levain

Le levain est un mélange d'eau et de farine de céréales, typiquement de blé ou du seigle, mis à fermenter. Il est initié en mélangeant de la farine et de l'eau puis il est rafraîchi régulièrement (*back-slopping*), c'est à dire qu'on lui ajoute de l'eau et de la farine, ce qui permet de nourrir les microorganismes qui le composent et de le maintenir en activité. Il existe deux méthodes d'utilisation du levain (figure 1.4). On peut en prélever une partie pour l'intégrer dans la pâte à pain tandis que le reste sera conservé et entretenu par rafraîchi. Il est également possible d'intégrer l'ensemble du levain dans la pâte à pain. On prélève dans ce cas un morceau de pâte qui servira de levain pour la panification suivante. Avec cette dernière méthode le levain contient du sel, en proportion variable en fonction de la quantité introduite dans la pâte. Il existe une grande diversité de pratiques concernant l'entretien du levain, les boulangers pouvant jouer sur la fréquence des rafraîchis, la température à laquelle le levain est maintenu ou encore la proportion d'eau, de farine et de levain dans les rafraîchis.

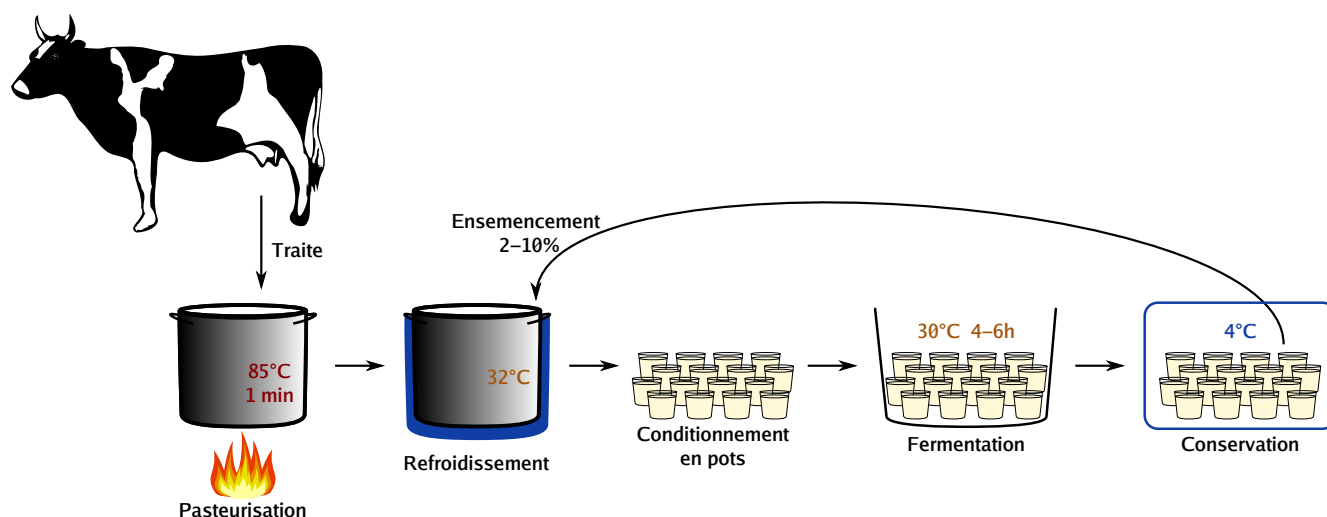


FIGURE 1.5 – Schéma de la préparation du Gwell

Préparation du Gwell

Le Gwell est produit à partir de lait de vache entier. On ne sait pas initier un nouveau Gwell à partir de lait uniquement, il faut disposer d'un Gwell pour pouvoir le reproduire. Le lait est chauffé à 85°C ou plus pendant au minimum 1 minute afin de le pasteuriser. Ceci a également pour effet de modifier la structure des protéines du lait ce qui améliore la texture du gel formé lors de la coagulation. Il est ensuite refroidi rapidement entre 32 et 35°C . On y ajoute alors 3 à 10% de la quantité de lait en Gwell. Après homogénéisation, le mélange est réparti en pots qui sont placés à l'étuve entre 27 et 34°C . Après 4 à 6h d'étuvage le lait a coagulé et le Gwell ainsi produit est conservé en chambre froide à 4°C avant consommation (figure 1.5)

Le Gwell est donc à la fois le produit fini prêt à être consommé et le ferment qui permet de le produire, à la différence du levain qui constitue le ferment qui permet de produire le pain.

1.3.2 Histoire du pain au levain et du Gwell

Pain au levain

Les plus anciennes traces archéologiques de pain datent de 14400 ans [89]. Il s'agissait cependant de pains plats. Les premières traces avérées de l'utilisation de levain remontent à l'Égypte antique, il y a environ 3500 ans [90, 91]. La production de pain au levain était alors liée à celle de boissons fermentées à base de céréales. Plus tard, la production de pain au levain s'est étendue en Europe, notamment dans la Rome antique comme le rapporte Pline l'Ancien [92]. Durant le XIX^{ème} siècle, le levain était très utilisé aux États-Unis, notamment pendant la ruée vers l'or. Une tradition de levain existe ainsi à San Francisco [93], et *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, l'espèce de bactérie la plus souvent retrouvée dans les levains a été identifiée pour la première fois dans un levain de San Francisco et a été nommée d'après cette localité [94]. Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, la seule manière de faire

lever une pâte à pain consistait à utiliser du levain [95]. Il arrivait tout de même d'utiliser la mousse ou la lie issue d'un moût de bière en fermentation pour inoculer une pâte à pain [96]. C'est à partir du début du XX^{ème} siècle et du développement de la microbiologie que des souches pures de levures ont été utilisées. On appelle levure de boulanger ces cultures de souches pures utilisées pour la panification, et la seule espèce qui a été produite industriellement au XX^{ème} siècle est *Saccharomyces cerevisiae*. Le pain produit à la levure de boulanger ne contient ainsi que des levures, quasiment systématiquement de l'espèce *S. cerevisiae*, alors que le pain au levain contient des bactéries et différentes espèces de levures selon le levain. La présence de bactéries et la diversité des levures entre les levains est à l'origine des différences organoleptiques entre le pain à la levure et le pain au levain. La proportion de pain au levain dans la production globale a diminué progressivement à partir du moment où la levure de boulanger a été produite. On trouve un regain d'intérêt pour le levain depuis la fin du XX^{ème} siècle, du fait de son image de produit traditionnel [97], de son intérêt gustatif [98] et des bienfaits pour la santé qu'on lui attribue [99].

Gwell

Le Gwell est une marque de gros-lait. Le gros-lait est un lait fermenté breton produit par repiquage (*back-slopping*). On connaît de nombreux laits fermentés, dont les plus vieilles traces remontent à environ 10000 ans avec le début de l'agriculture [72]. Des écrits ayurvédiques rapportent la consommation de lait fermenté en Inde il y a 8000 ans[100]. Le lait fermenté repiqué le plus connu est le yaourt, et des écrits grecs datant d'il y a 2100 ans décrivent des laits fermentés pouvant se rapprocher du yaourt tel qu'on le connaît aujourd'hui [101]. On peut également citer le kéfir, dont on récupère des grains pour ensemercer le lait à chaque production.

Le gros-lait est probablement consommé depuis plusieurs siècles en Bretagne, et un médecin du début du XX^{ème} siècle explique l'utiliser ainsi que plusieurs autres laits fermentés dont le yaourt pour traiter ses patients [102]. Il décrit la méthode de production : le lait estensemencé par le ferment et éventuellement par de la présure, et il est laissé à cailler pendant environ 18h dans un endroit tiède. Il rapporte également qu'il arrivait que le ferment "subisse une forme de dégénérescence qui les rend impuissant à coaguler le lait". Les fermières utilisaient dans ce cas un ferment d'un village voisin pour initier une nouvelle fermentation ou éventuellement le mélanger au leur. Certains villages étaient réputés pour la qualité de leur ferment. Il a connu différentes dénominations selon les localités, dont *laez-goell* (lait fermenté en breton) ou *laez-teo* (lait épais). La consommation de gros-lait a décliné au cours du XX^{ème} jusqu'à quasiment disparaître, mais a commencé à trouver un regain d'intérêt à partir des années 1980. On le trouvait alors principalement dans le finistère sud [103]. Il a notamment été développé récemment par des éleveurs de vaches de race Bretonne Pie Noir, qui ont déposé en 1993 la marque Gwell qui correspond à un gros-lait produit exclusivement avec du lait de race locale de vache (Bretonne Pie Noir, Froment du Léon, Armoricaïne ou Nantaise). Ces éleveurs ont formé en 2019 une association, l'Association des Paysans Producteurs de Gwell, qui constitue un outil permettant la gestion collective

du produit et qui porte la demande d'une AOP (Appellation d'Origine Protégée) pour le Gwell.

1.3.3 Échelle de production et profil des producteurs

Pain au levain

On peut distinguer trois grands types de boulangers : les boulangers industriels, qui peuvent cuire des pains congelés produits en usine, les boulangers artisanaux, qui choisissent les farines, pétrissent la pâte et cuisent le pain eux-mêmes et les paysans-boulangers, qui produisent au moins une partie de leurs céréales et de leur farine [96]. Des boulangers de chacune de ces catégories produisent du pain au levain. Une précision concernant le terme levain s'impose, car il n'en existe pas de dénomination officielle très claire. Le décret pain définit le levain comme suit :

Le levain est une pâte composée de farine de blé et de seigle, ou de l'un seulement de ces deux ingrédients, d'eau potable, éventuellement additionnée de sel, et soumise à une fermentation naturelle acidifiante, dont la fonction est d'assurer la levée de la pâte.

Le levain renferme une micro-flore acidifiante constituée essentiellement de bactéries lactiques et de levures. Toutefois, l'addition de levure de panification (*Saccharomyces cerevisiae*) est admise dans la pâte destinée à la dernière phase du pétrissage, à la dose maximale de 0,2 p. 100 par rapport au poids de farine mise en oeuvre à ce stade.

Extrait de l'article 4 du décret n°93-1074 du 13 septembre 1993

Il précise par ailleurs qu'un pain peut être dit "au levain" seulement s'il a un pH inférieur à 4.3 et une teneur en acide acétique de la mie supérieure à 900 ppm (parties par million). La proportion de levain utilisée par rapport à la levure de boulanger n'est donc pas définie, et le critère d'acidité est difficilement vérifiable. Une étude sur la diversité des levains français a montré que certains pains au levain produits de manière traditionnelle contenaient moins d'acide acétique et avaient un pH plus élevé que les normes du décret [88], ce qui rend ces critères inopérants. Par ailleurs, il existe 3 types de levains [104]. Le levain de type I correspond à un mélange de farine et d'eau entretenu par *back-slopping* tel que présenté figure 1.4. Les levains de type II sont des levainsensemencés par des souches pures de bactéries lactiques, maintenus à 30°C ou plus, et utilisés comme agent acidifiant et d'arôme dans l'industrie boulangère. Les levains de type III sont des levains de type II séchés pour être conservés, ils ne contiennent donc plus de microorganismes vivants. Les levains de type II et III ne permettent pas de faire lever la pâte à pain et on doit donc forcément y ajouter de la levure de boulanger. Cette pratique est autorisée dans le décret pain à des doses suffisante pour faire lever la pâte, et des pains produits avec ce type de levain ont un pH et un taux d'acide acétique suffisant pour être appelé pain au levain. J'entendrai par pain au levain des pains levés avec un levain de type I qui a été initié sans apport intentionnel de souche pure de microorganismes.

Ainsi défini, le pain au levain est majoritairement produit par des artisans et paysans-boulangers. Il est souvent produit à petite échelle, dans des boulangeries artisanales ou par des paysans-boulangers. Il est produit dans toutes les régions de France ainsi que dans de nombreux autres pays. Il n'existe pas d'association ou de syndicat unique des boulangers travaillant au levain. Les réseaux de boulangers travaillant au levain sont divers, et notamment structurés autour d'écoles, comme les Centre de Formation des Apprentis (CFA) en boulangerie, les compagnons du devoir ou encore l'École Internationale De la Boulangerie (EIDB). Des associations de professionnels permettent également aux paysans-boulangers de s'organiser et d'échanger des savoirs, telle que triptolème en Bretagne, les CIVAM (Centre d'Initiative pour Valoriser l'Agriculture et le Milieu rural) avec notamment le BioCIVAM de l'Aude, ou encore le Réseau Semences Paysannes dans toute la France.

Gwell

Les producteurs de Gwell sont des éleveurs de vaches de races locales bretonne. On trouve au moment de la rédaction de ce manuscrit une vingtaine de producteurs de Gwell. Il s'agit généralement de petites fermes (entre 12 et 45 ha, 25 ha en moyenne), de petits cheptels avec 12 vaches laitières en moyenne et la production moyenne est de 20 000 L de lait par UTH (unité de main d'oeuvre). Les vaches sont nourries exclusivement avec de l'herbe et du foin, éventuellement complété d'un apport en céréales, généralement produites sur la ferme. La commercialisation des produits se fait en vente directe à la ferme ou en marché, à des petites ou moyennes surfaces, via des systèmes de paniers paysans ou de magasins de producteurs [105].

Pain au levain et Gwell ont donc en commun d'être issus de petites exploitations avec des pratiques artisanales ou paysannes. Cette petite échelle de production est rendue nécessaire par la technique du *back-slopping*, qui nécessite une adaptation permanente au ferment et aux microorganismes qui le composent. Ils évoluent en effet en permanence et leurs variations imprévisibles sont difficilement compatibles avec une production industrielle, ce qui impose une échelle artisanale et un savoir-faire spécifique pour s'y adapter.

1.3.4 Caractérisation des communautés microbiennes

Le levain et le Gwell contiennent tous deux des bactéries lactiques et des champignons. Ce ne sont cependant pas les mêmes espèces, le Gwell contenant notamment des champignons filamenteux et parfois des levures en faibles quantités alors que le levain contient uniquement des levures.

Levain

On trouve en moyenne 2 espèces de bactérie et 1.3 espèces de levure par levain [106]. Différentes espèces sont cependant retrouvées d'un levain à l'autre, la diversité gamma des levains est donc plus

élevée, avec 73 espèces de bactéries [106] et 42 espèces de levures [104]. Toutes les bactéries majoritaires dans un levain appartenaient au genre *Lactobacillus* avant qu'il ne soit reclassifié en 2020 et divisé en 23 nouveaux genres [107]. Les bactéries majoritaires appartiennent ainsi toutes à la famille des *Lactobacillaceae*, et *F. sanfranciscensis* est celle qui est retrouvée le plus souvent [108, 109, 110, 111, 112, 113]. On trouve également d'autres espèces telles que *Companilactobacillus paralimentarius*, *Lactiplantibacillus plantarum* ou *Levilactobacillus brevis*. Les bactéries lactiques des levains ayant été étudiées beaucoup plus en détail que les levures, et ont déjà fait l'objet de nombreuses revues, dont une méta-analyse récente [114], cette introduction met donc l'accent sur les levures.

La diversité des levures dans les levains a été décrite dans plusieurs revues [115, 116, 71, 108]. Je l'ai mise à jour dans le cadre de ma thèse dans un chapitre de livre, donné en annexe de ce manuscrit. Quasiment toutes les espèces appartiennent à la famille des *Saccharomycetaceae*. L'espèce la plus fréquemment détectée est *Saccharomyces cerevisiae*. On trouve également des espèces du genre *Kazachstania*, avec notamment les espèces *Kazachstania humilis* et *Kazachstania bulderi*, ainsi que les espèces *Wickerhamomyces anomalus* et *Torulasporea delbruecki*. La répartition géographique des espèces majoritaires de levures est présentée figure 1.6.

Gwell

En ce qui concerne le Gwell, très peu d'études ont été réalisées. Une analyse a été conduite en 1999 par un laboratoire privé commanditée par des éleveurs soucieux de comprendre la nature de l'écosystème Gwell. L'étude a conclu que la flore bactérienne était composée de *Lactococcus lactis* sp. *lactis*, *Lactococcus cremoris* (anciennement nommée *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* [117]), et de *Streptococcus thermophilus* [118]. *L. lactis* sp. *lactis* est connue pour produire des arômes typiques de produits laitiers [119, 120]. Des levures ont été identifiées, mais pas de moisissures. Des expérimentations préliminaires au laboratoire arrivent à la même conclusion à l'exception de *S. thermophilus* qui n'était pas détecté. Certains producteurs constatent qu'un champignon filamenteux se développe en surface du Gwell, il apparaît après une à deux semaines et a la morphologie de *Geotrichum candidum*, qui est utilisé par la plupart des producteurs de Gwell pour l'affinage de leurs fromages.

Dans les deux produits, on trouve des bactéries lactiques qui de part leur activité fermentaire entraînent une acidification du milieu. Dans le levain, la fermentation lactique peut être hétérofermentaire, et s'accompagne donc de la production d'acide acétique et de CO₂, par exemple en présence de *F. sanfranciscensis* ou de *L. brevis*, ou homofermentaire, par exemple en présence de *L. plantarum* ou *C. paralimentarius* [109]. Dans le Gwell, les bactéries des genres *Lactococcus* et *Streptococcus* sont homofermentaires, ce qui n'entraîne donc la production que d'acide lactique [70]. Cette acidification est particulièrement importante pour la production du Gwell puisqu'elle entraîne la coagulation du lait c'est à dire la formation d'un gel lié à la déstabilisation des micelles de caséines, c'est par ce processus qu'on obtient la texture finale du produit qui est proche de celle d'un yaourt. Pour le levain, l'acidification peut

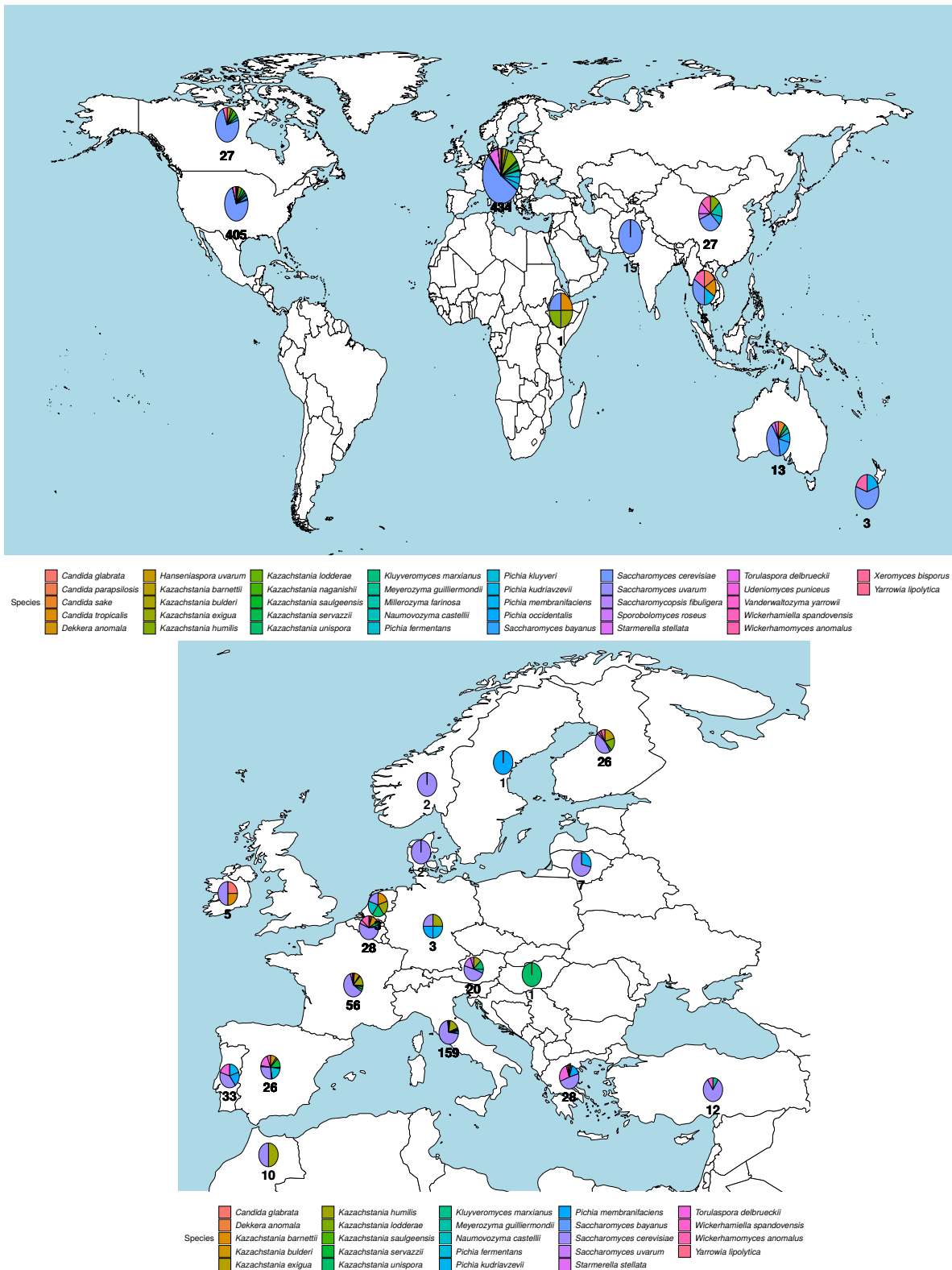


FIGURE 1.6 – Carte des principales espèces de levure détectées dans le monde. Chaque espèce est représentée par une couleur, et le nombre sous les graphiques camembert indique le nombre total de levains analysés dans chaque pays. La proportion représentée dans chaque graphique est basée sur le nombre de levains où une espèce de levure a été détectée. Les données ont été compilées à partir des de l'ensemble des publications portant sur des levures dans les levains de type I. Les études qui n'indiquaient pas le nombre de levains où une espèce donnée a été détectée ont dues être écartées. Celles qui n'indiquaient pas si de la levure de boulangerie est utilisée dans le fournil ou dans le levain ont été retenues, ce qui peut accentuer la prédominance de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

être recherchée pour les propriétés gustatives du pain produit, et permet d'améliorer les qualités nutritionnelles du pain via la lyse enzymatique de l'acide phytique ce qui permet une meilleure biodisponibilité des minéraux [75, 121]. Dans le levain, les levures réalisent la fermentation alcoolique qui s'accompagne d'un important dégagement de CO_2 . C'est ce dégagement lors de la panification qui fait lever la pâte et qui permet d'obtenir une mie avec des alvéoles. Ce sont ces paramètres (acidification et/ou dégagement de CO_2) que les producteurs peuvent observer et c'est sur cette base qu'ils peuvent modifier les paramètres environnementaux pour diriger le développement de leurs communautés microbienne et obtenir le produit recherché.

1.3.5 Initiation des communautés microbiennes

L'initiation de la communauté microbienne des deux produits est différente. On peut aisément préparer un nouveau levain à partir de farine et d'eau. En revanche on ne sait pas initier un nouveau Gwell à partir de lait uniquement.

D'un point de vue microbiologique, l'initiation d'un levain entraîne une succession d'espèces en trois étapes [122, 123, 124, 125]. Ces successions n'ont été décrites que concernant les bactéries, et uniquement sur des levains produits en laboratoire. Les genres de bactéries détectées sont tout d'abord typiques de la farine, tels que *Acinetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Erwinia* ou *Sphingomonades* [124]. Au bout d'un jour après le mélange d'eau et de farine, on détecte principalement les genres *Weisella*, *Lactococcus* ou *Pediococcus*, dont beaucoup d'espèces sont typiquement retrouvées dans des produits fermentés. Enfin, après une dizaine de jours, les *Lactobacillaceae* classiquement retrouvées dans les levains (cf. Section 1.3.4) sont quasiment systématiquement majoritaires.

Une étude socio-historique rapporte différents récits concernant l'obtention du premier Gwell [103]. Certains affirment qu'il n'est que le résultat d'un lait caillé dans les bonnes conditions climatiques. Une méthode un peu plus complexe consisterait à faire cailler à température ambiante du lait préalablement chauffé à 37°C dans un pot en terre cuite dont les parois ont été humidifiées avec du lait ribot (il s'agit du petit lait, également appelé babeurre obtenu lors de la fabrication du beurre). Est également cité l'ajout de levain de pain ou de colostrum caillé dans le lait. Une autre recette consisterait à faire cailler du lait sous un arbre, dans un panier en osier recouvert de feuilles. Enfin, des éleveurs évoquent l'ensemencement du lait par de la caillette de veau. Les éleveurs n'ont pas recours à ces méthodes car le résultat est assez aléatoire et le produit obtenu lors des rares essais n'est pas jugé typique d'un Gwell. Pour commencer une production, il faut donc disposer d'un Gwell, donné par un producteur. Ceci a pour conséquence que les dons de ferment sont très fréquents chez les producteurs de Gwell et beaucoup moins chez les boulangers, qui ont plus tendance à initier leur propre levain que de récupérer celui d'un collègue.

1.3.6 Facteurs influençant la diversité microbienne

La diversité microbienne des produits fermentés est le résultat de nombreux facteurs. On peut distinguer l'influence de la dispersion et de la sélection sur les communautés microbiennes. Ces facteurs agissent différemment dans les deux modèles d'études de cette thèse.

La dispersion a potentiellement plus d'effet dans le cas du levain que dans le cas du Gwell. Ceci est principalement lié à la stérilisation de la matière première pour la production du Gwell. Le levain étant produit à partir de farine et d'eau non transformées, les microorganismes qui y sont associés peuvent potentiellement se développer dans le levain. A l'inverse, la plupart des microorganismes présents dans le lait ne survivent pas à la stérilisation et ne sont pas retrouvés dans le Gwell. Seuls certains microorganismes, notamment des bactéries du genre *Bacillus*, peuvent survivre sous forme de spore à la pasteurisation, et auraient ainsi la possibilité de se développer dans le Gwell [126].

La dispersion depuis l'environnement de fabrication est également plus limitée dans le cas du Gwell que dans celui du levain. Il a été montré que l'on retrouve les microorganismes majoritaires du levain dans le fournil [127]. Pour le Gwell, des microorganismes présents sur les pots de Gwell, dans l'air de la fromagerie ou dispersés par des vecteurs biotiques comme des insectes peuvent potentiellement s'y développer. Les mesures d'hygiène étant très strictes en fromagerie du fait de craintes quant au risque sanitaire, les possibilités de dispersion via des insectes ou par des contaminations des pots sont réduites. Il est tout de même possible que des organismes dispersent dans le Gwell par l'air ambiant, car plusieurs produits différents peuvent être préparés dans l'atelier de transformation. Notamment, certains fromages dont la flore d'affinage peut sporuler sont parfois produits dans des locaux communiquant directement avec l'atelier de transformation du lait. Les producteurs observent souvent des contaminations croisées entre différents types de produits, et la moisissure observée en surface du Gwell pourrait provenir de contaminations de ce type.

La sélection joue également un rôle dans la composition microbienne des produits, et elle est notamment liée aux pratiques des producteurs. Les producteurs peuvent jouer sur trois paramètres fondamentaux pour obtenir le résultat souhaité : le taux d'inoculation microbien, le temps de fermentation, et la température. L'effet de certains paramètres de fabrication ont été étudiés pour le levain, et plusieurs revues synthétisent les connaissances à ce sujet [128, 129, 108, 130]. Il a notamment été montré que la température détermine la composition bactérienne du levain [131], et qu'un changement dans le taux d'hydratation du levain entraîne un changement de composition microbienne [132, 133].

Les producteurs de Gwell peuvent également jouer sur ces paramètres et sélectionner différemment leur communauté microbienne, mais il n'existe pas d'étude à ce sujet. Il est cependant intéressant de noter que la variabilité des pratiques d'un producteur à l'autre n'est pas la même pour le levain de panification et pour le Gwell. Pour les boulangers une grande latitude est possible, entre par exemple des fermentations longues donc des rafraîchis peu fréquents à température plutôt faible ou au contraire

des rafraîchis très fréquents à température plus élevée, parfois contrôlée dans une chambre de pousse. Ces différentes pratiques dépendent des différentes écoles, et rien n'empêche un boulanger de modifier le processus pour obtenir le résultat qu'il souhaite. Dans le cas du Gwell, la production est plus cadrée. Les paramètres de fabrication sont en effet définis dans le cahier des charges de production du Gwell, établi dans le cadre d'une demande d'Appellation d'Origine Contrôlée (AOP). Un des objectifs de ce cahier des charges est d'obtenir un produit avec une identité propre et reconnaissable quel que soit le producteur, et les possibilités de variations quant au mode de production sont donc volontairement restreintes. Par exemple, le gros-lait peut être produit par une fermentation longue de plus de 16h à une température proche de 20°C, avec un lait pasteurisé ou non. Le cahier des charges de production du Gwell stipule que la fermentation doit durer moins de 8h et que le lait doit être pasteurisé. Les variations de pratique d'un producteur à l'autre sont donc beaucoup plus limitées dans le cas du Gwell que dans le cas du levain, et on peut donc s'attendre à observer moins de diversité entre les différents Gwell qu'entre les différents levains. Le tableau 1.1 présente les gammes de variations de quelques paramètres de production du levain et du Gwell.

1.3.7 Stabilité des communautés microbiennes

Les communautés microbiennes de produits entretenus par *back-slopping* évoluent au cours du temps, et les variations des tailles des populations qui les composent peuvent être dues à de la dispersion depuis l'environnement de production ou à de la sélection du fait des pratiques des producteurs, mais également le résultat de dynamiques endogènes d'interactions entre les différents organismes [108]. En fonction de l'influence de ces différents facteurs, la composition microbienne des communautés de produits fermentés peut être plus ou moins stable. On peut distinguer deux types de stabilité qui n'opèrent pas au même niveau [135]. La stabilité microbiologique concerne les variations des tailles de populations au cours du temps, tandis que la stabilité fonctionnelle concerne les caractéristiques physico-chimiques de l'écosystème. Il s'agit par exemple pour nos modèles d'étude de la stabilité de la cinétique d'aci-

| Paramètre | Levain | Gwell |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Taux d'ensemencement | 0.5-50% | 3-10% |
| Température de fermentation | 20-30°C médiane = 21 | 27-34°C 30°C recherché |
| Nombre de repiquages par semaine | 2-28 médiane = 5 | 0.5-3 |

Tableau 1.1 – Gammes de variation des paramètres de production du levain et du Gwell. Les données sont tirées de TEFFRI-CHAMBELLAND [134] pour le taux d'ensemencement du levain, de MICHEL et al. [88] pour les autres paramètres de préparation du levain, et du cahier des charges de production du Gwell. Les données présentées sont donc de nature différente pour le levain et le Gwell : il s'agit de gamme de variation de pratiques observées pour le levain, et de fourchette réglementaire pour le Gwell.

dification à chaque repiquage, ou dans le cas du levain uniquement, de la production de CO_2 du fait de la fermentation. Ces évolutions des caractéristiques physico-chimiques du milieu sont directement observables, et le travail du producteur consiste à offrir à ses microorganismes les conditions qui leur permettent de modifier leur environnement afin d'obtenir le résultat souhaité de manière répétable. La stabilité fonctionnelle et la stabilité microbiologique ne sont pas forcément liées. En effet, si plusieurs espèces réalisent la même fonction (on parle de redondance fonctionnelle), la disparition de l'une d'entre elles n'affectera pas les caractéristiques physico-chimiques du milieu. Une communauté peut donc être instable d'un point de vue microbiologique mais stable d'un point de vue fonctionnel.

Les deux modèles d'étude considérés n'ont pas la même stabilité fonctionnelle. Le levain est en effet très stable en ce qui concerne l'acidification et la production de CO_2 , il arrive très rarement qu'il ne permette pas de faire lever une pâte à pain, et il n'est pas exceptionnel que des boulangers entretiennent leur levain pendant plus de 20 ans sans qu'il ne présente jamais de défaut. A l'inverse, les producteurs de Gwell sont régulièrement confrontés à un défaut d'acidification. Il arrive que le lait ne caille pas lors de l'étuvage. Le Gwell est alors dit "perdu", et les éleveurs ne disposant pas d'une méthode sûre pour initier un nouveau ferment, la seule possibilité en cas de perte reste donc d'obtenir un nouveau Gwell chez un collègue.

Le tableau 1.2 récapitule les principales caractéristiques des levains et des Gwell ainsi que de leurs producteurs.

| | Levain | Gwell |
|--|--|---|
| Espèces le plus souvent détectées | <i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kazachstania bulderi</i> <i>Kazachstania humilis</i> <i>Torulaspota delbruecki</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> | <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus cremoris</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Geotrichum candidum</i> |
| Type de fermentation | Hétérolactique Alcoolique | Homolactique |
| Matières premières | + | - Pasteurisation |
| Ustensiles Surfaces | + | |
| Dispersion | + | - |
| Microbiote du producteur | Notamment si levain issu de la pâte et pétrissage à la main | Hygiène stricte en fromagerie |
| Air et vecteurs biotiques | Possible | |
| Initiation de la communauté | Aisée, mélange eau + farine | Origine inconnue, pas de production <i>de novo</i> |
| Stabilité | Pertes très rares | Pertes fréquentes |
| Echanges de ferments entre producteurs | Rares | Fréquents, notamment en cas de perte du Gwell |
| Structure du réseau de producteurs | Diffus, structuré autour d'écoles, de formations, ou d'associations de paysans | Structure unique : Association des Paysans Producteurs de Gwell |
| Variabilité des pratiques | Importante : peu de réglementation | Faible : limitée par le cahier des charges soucis de reconnaissabilité du produit |
| Échelle de production | Variable, généralement petite échelle artisanale ou paysanne | Petite échelle, fermière et paysanne |

Tableau 1.2 – Tableau récapitulatif des caractéristiques des levains et des Gwell, ainsi que de leur producteurs.

1.4 Une démarche de recherche participative

J'adopte dans ma thèse une démarche de recherche participative. Les boulangers et les éleveurs sont parties prenantes du projet, et participent au processus de recherche depuis la formulation des hypothèses jusqu'à la présentation des résultats.

Ces dernières années, les projets de recherche participative florissent. L'association Sciences Citoyennes en a recensé plus de 200 en 2014 sans en faire une recherche exhaustive [136]. Ces projets concernent de nombreux domaines et la majorité sont associés au domaine de la santé ou de l'environnement.

Cette approche de la recherche trouve ses sources dans différents courants de pensée dont l'éducation populaire ou la philosophie de John Dewey sur les liens entre pédagogie, éducation et science. Le terme *participatory research* est apparu pour la première fois au début des années 1970 dans le cadre de projets de développement en Tanzanie [137]. L'auteure y pose comme principe que la recherche conduite au sein d'une communauté doit profiter en partie à cette communauté et que les personnes concernées par le projet doivent y participer autant que possible. Cette approche est également intrinsèquement interdisciplinaire, et constitue un processus éducatif pour toutes les catégories d'acteurs participants, scientifiques y compris. On trouve actuellement différents courants, tels que la Recherche Action Participative (RAP), la Recherche Action Collaborative (RAC) ou encore la Recherche-Intervention. Ces courants diffèrent quelque peu de part l'accent mis plus ou moins sur le processus de construction du collectif de recherche ou sur l'objectif de transformation de la société, mais restent très proches des principes originaux posés par SWANTZ [137].

Des projets de recherche participative ont par la suite été déclinés dans de nombreux domaines. Ceux développés dans le domaine des sciences naturalistes touchent un public large. Par exemple, le projet Vigie-Nature [138] est un observatoire de la biodiversité, dont toutes les données sont produites par des bénévoles, naturalistes amateurs ou chercheurs en écologie. Ce type de projet a fait émerger la figure du citoyen expert, qui participe à la création des savoirs de part la connaissance qu'il a de son milieu de vie, et ils ont également souvent une vocation éducative en sensibilisant des citoyens à l'environnement.

On peut également citer ceux mis en place dans les années 1980-1990 dans le domaine médical, tels que ceux rapportés par BARTHE, CALLON et LASCOUMES [139]. Les auteurs décrivent la formation de ce qu'ils appellent des "forums hybrides", où se rencontrent différents groupes d'acteurs : experts, techniciens, politiques, citoyens, réunis car impliqués dans une controverse. Ils décrivent ainsi la modification des protocoles d'essais cliniques et la réorientation des recherches sur des myopathies rares ou sur le SIDA, du fait de la mobilisation de patients qui se sont emparés de ces problématiques. Ces patients mettaient en avant leur connaissance de premier plan de la maladie, parfois leurs connaissances techniques sur le sujet, et surtout le fait qu'ils étaient les premiers concernés par les recherches sur le sujet et par les protocoles d'essais cliniques, ce qui leur donne une légitimité à décider de leur organisation. L'Inserm met aujourd'hui en avant cette démarche, et entretient des liens avec des associations de malades

pour mettre en place les protocoles d'essais cliniques [140]. BARTHE, CALLON et LASCOUMES [139] décrivent d'autres types de forums hybrides et les jeux de pouvoir qui les traversent, et montrent que beaucoup de controverses sociotechniques telles que celles sur les risques liés aux OGM ou aux déchets nucléaires sont liées à un défaut de démocratie dans le développement des techniques, et à un mode de production des connaissances qui se fait en vase clos, entre scientifiques, techniciens et experts sans que les citoyens n'aient aucune prise sur le développement des techniques. Les auteurs font ainsi la distinction entre la recherche "confinée" et le recherche "de plein air". La première correspond à la recherche en laboratoire, généralement réductionniste, qui tire sa puissance de son isolement simplificateur qui permet d'avancer sur des faits bien établis. Ceci correspond au fonctionnement de la recherche et à la production des faits scientifiques tels que décrits par LATOUR et WOOLGAR [141]. Cette organisation de la recherche a pour défaut de ne plus rendre compte de la complexité du monde, et de se détacher des enjeux liés à la production des savoirs. BARTHE, CALLON et LASCOUMES [139] développent ainsi le concept de recherche "de plein air", qui se concentre sur la formulation des problèmes, les modalités de mise en oeuvre des connaissances et savoir-faire et sur l'ouverture du collectif de recherche. Les complémentarités entre la recherche "confinée" et la recherche "de plein air" permettraient de construire une démocratie technique, dans laquelle les premiers concernés par de nouvelles technologies et savoir-faire peuvent prendre part à leur développement. Ceci permettrait notamment de mieux gérer les effets inattendus et les problèmes imprévus liés au développement de nouvelles technologies.

Beaucoup de projets de recherche participative sont également mis en place en agronomie. On peut notamment citer le projet de sélection paysanne des blés initié par le Réseau Semences Paysannes en lien avec une équipe de l'INRAE du Moulon, de l'INRAE de Rennes et l'ITAB (Institut Technique d'Agriculture Biologique). Il s'agit d'une collaboration entre paysans et chercheurs, dont les objectifs ont été définis au départ par les paysans : obtenir des variétés de populations adaptées à leur terroir, sélectionner en tenant compte des qualités organoleptiques des blés [142]. Un réseau d'échange de variétés paysannes de blés a ainsi été mis en place, ainsi qu'un protocole visant à évaluer les caractéristiques de différentes variétés-populations de blé en culture dans les fermes des paysans participants. Ceci rompt avec le schéma classique de sélection des blés : les populations sont ici sélectionnées par des paysans et échangées de pair à pair, et non de manière centralisée par un organisme de sélection, et les essais sont réalisés en condition réelle à la ferme plutôt que dans un environnement standardisé. Ce dispositif avait également une visée politique, en permettant de fait à des paysans d'échanger et produire leurs propres semences, permettant leur autonomie vis à vis de l'industrie semencière. Ce projet a demandé des négociations et des adaptations de la part des différents acteurs, avec notamment des discussions sur le plan d'expérience autour de la nécessité des répliques, ce qui devait permettre des analyses statistiques robustes tout en correspondant au mode de fonctionnement des paysans, et l'utilisation de modèles statistiques innovants permettant l'analyse de ce jeu de données peu conventionnel [143].

Les projets de recherche participative regroupent des scientifiques et des acteurs ne relevant pas du milieu académique, qui participent donc à la création des connaissances et à l'élaboration des techniques

ce qui permet leur émancipation vis à vis des dépendances et des rapports de pouvoir liés au savoir et à la technologie. Le processus de recherche participative répond également à un enjeu de légitimation des savoirs [144]. Cette légitimation se fait de manière symétrique, des savoirs locaux ou profanes auprès de la communauté scientifique ou des institutions mais également des savoirs scientifiques auprès des acteurs impliqués. Des traductions entre les différents registres de connaissance sont ainsi nécessaires, et les projets de recherche participative nécessitent souvent des outils de médiation scientifique et plus généralement d'animation de collectif, tels que ceux développés dans le cadre de la Recherche Action Participative (RAP) [145]. Les différents acteurs peuvent avoir des objectifs différents, et leur collaboration nécessite une organisation, non seulement d'un point de vue pragmatique pour le fonctionnement quotidien du collectif, mais également pour que chacun ait un accès égal à l'information et que les objectifs du projet ne dérivent pas au profit d'un groupe uniquement. En effet, l'échange des savoirs entre scientifiques et acteurs locaux n'échappe pas à des rapports de pouvoir [144]. On voit ainsi apparaître le rôle d'animateur dans ce type de projet, qui peut organiser les rencontres, rédiger les compte-rendus, etc., et qui peut éventuellement jouer le rôle de médiateur entre les différentes parties. Ce rôle d'animateur peut être adopté par un des acteurs impliqués, scientifique ou non, mais l'est généralement par une personne dédiée souvent issue du milieu associatif ou d'une collectivité locale.

1.5 Objectifs de ma thèse

Ma thèse vise à étudier l'évolution des communautés microbiennes du levain et du Gwell. Je m'intéresse dans une première partie au rôle de la dispersion dans les dynamiques des communautés microbiennes, en évaluant l'importance de la dispersion de microorganismes depuis la farine vers le levain (Section 2.2), ainsi que l'effet de la dispersion du levain et du Gwell (Section 2.2, 2.3). Dans une seconde partie, j'étudie la stabilité des communautés microbiennes. Je compare la composition microbienne de levains à 4 ans d'intervalle (Section 3.2), et j'étudie par évolution expérimentale les dynamiques de la communauté microbienne du Gwell en fonction de sa fréquence de repiquage (Section 3.3).

Bibliographie

- [1] Grace L. DOUGLAS et Todd R. KLAENHAMMER. "Genomic Evolution of Domesticated Microorganisms". en. In : *Annual Review of Food Science and Technology* 1.1 (avr. 2010), p. 397-414. ISSN : 1941-1413, 1941-1421. DOI : [10.1146/annurev.food.102308.124134](https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124134) (cf. p. 1).
- [2] Joanne M. WILLEY, Linda SHERWOOD et Christopher J. WOOLVERTON. *Prescott's Microbiology*. en. Tenth edition. New York, NY : McGraw-Hill, 2017. ISBN : 978-1-259-28159-4 (cf. p. 1, 7).
- [3] Frédéric THOMAS, Thierry LEFÈVRE et Michel RAYMOND. *Biologie évolutive*. fr. Second. De Boeck Supérieur, 2016 (cf. p. 1-3).
- [4] Charles DARWIN. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. J. Murray. London, 1859 (cf. p. 1, 3).
- [5] Theodosius DOBZHANSKY. *Genetics and the Origin of Species*. English. New York : Columbia Univ. Press, 1937 (cf. p. 1).
- [6] Richard DAWKINS. *The Selfish Gene*. eng. Oxford : Oxford University Press, 1976. ISBN : 978-0-19-857519-1 (cf. p. 1).
- [7] Hilary CALLAHAN. "The Driving Forces of Evolution: Genetic Processes in Populations. By David Wool." In : *The Quarterly Review of Biology* 83.3 (sept. 2008), p. 303-303. ISSN : 0033-5770. DOI : [10.1086/592624](https://doi.org/10.1086/592624) (cf. p. 1).
- [8] Haoxuan LIU et Jianzhi ZHANG. "Yeast Spontaneous Mutation Rate and Spectrum Are Environment-Dependent". In : *Current biology : CB* 29.10 (mai 2019), 1584-1591.e3. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2019.03.054](https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.054) (cf. p. 1, 2).
- [9] Heewook LEE, Ellen POPODI, Haixu TANG et Patricia L. FOSTER. "Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in the Bacterium Escherichia Coli as Determined by Whole-Genome Sequencing". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.41 (oct. 2012), E2774-E2783. ISSN : 0027-8424. DOI : [10.1073/pnas.1210309109](https://doi.org/10.1073/pnas.1210309109) (cf. p. 2).
- [10] S.F. ELENA et R.E. LENSKI. "Evolution Experiments with Microorganisms: The Dynamics and Genetic Bases of Adaptation". English. In : *Nature Reviews Genetics* 4.6 (2003), p. 457-469. ISSN : 1471-0056. DOI : [10.1038/nrg1088](https://doi.org/10.1038/nrg1088) (cf. p. 2).

- [11] Olivier TENAILLON, Alejandra RODRÍGUEZ-VERDUGO, Rebecca L. GAUT, Pamela McDONALD, Albert F. BENNETT, Anthony D. LONG et Brandon S. GAUT. "The Molecular Diversity of Adaptive Convergence". In : *Science* 335.6067 (jan. 2012), p. 457-461. DOI : [10.1126/science.1212986](https://doi.org/10.1126/science.1212986) (cf. p. 2).
- [12] Adam EYRE-WALKER et Peter D. KEIGHTLEY. "The Distribution of Fitness Effects of New Mutations". en. In : *Nature Reviews Genetics* 8.8 (août 2007), p. 610-618. ISSN : 1471-0064. DOI : [10.1038/nrg2146](https://doi.org/10.1038/nrg2146) (cf. p. 2).
- [13] Christian D. HUBER, Bernard Y. KIM, Clare D. MARSDEN et Kirk E. LOHMEUILLER. "Determining the Factors Driving Selective Effects of New Nonsynonymous Mutations". en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114.17 (avr. 2017), p. 4465-4470. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : [10.1073/pnas.1619508114](https://doi.org/10.1073/pnas.1619508114) (cf. p. 2).
- [14] Etsuko N. MORIYAMA et Jeffrey R. POWELL. "Gene Length and Codon Usage Bias in *Drosophila Melanogaster*, *Saccharomyces Cerevisiae* and *Escherichia Coli*". In : *Nucleic Acids Research* 26.13 (juil. 1998), p. 3188-3193. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/26.13.3188](https://doi.org/10.1093/nar/26.13.3188) (cf. p. 2).
- [15] Cristian I. CASTILLO-DAVIS. "The Evolution of Noncoding DNA: How Much Junk, How Much Func?" en. In : *Trends in Genetics* 21.10 (oct. 2005), p. 533-536. ISSN : 0168-9525. DOI : [10.1016/j.tig.2005.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.08.001) (cf. p. 2).
- [16] Esther RHEINBAY et al. "Analyses of Non-Coding Somatic Drivers in 2,658 Cancer Whole Genomes". en. In : *Nature* 578.7793 (fév. 2020), p. 102-111. ISSN : 1476-4687. DOI : [10.1038/s41586-020-1965-x](https://doi.org/10.1038/s41586-020-1965-x) (cf. p. 2).
- [17] Jian WU, Daniela DELNERI et Raymond T. O'KEEFE. "Non-Coding RNAs in *Saccharomyces Cerevisiae*: What Is the Function?" In : *Biochemical Society Transactions* 40.4 (juil. 2012), p. 907-911. ISSN : 0300-5127. DOI : [10.1042/BST20120042](https://doi.org/10.1042/BST20120042) (cf. p. 2).
- [18] Nayang SHAN, Zuoheng WANG et Lin HOU. "Identification of Trans-eQTLs Using Mediation Analysis with Multiple Mediators". In : *BMC Bioinformatics* 20.3 (mar. 2019), p. 126. ISSN : 1471-2105. DOI : [10.1186/s12859-019-2651-6](https://doi.org/10.1186/s12859-019-2651-6) (cf. p. 2).
- [19] Alexander F. PALAZZO et T. Ryan GREGORY. "The Case for Junk DNA". en. In : *PLOS Genetics* 10.5 (mai 2014), e1004351. ISSN : 1553-7404. DOI : [10.1371/journal.pgen.1004351](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004351) (cf. p. 2).
- [20] Anne-Laure PRUNIER et Roland LECLERCQ. "Role of mutS and mutL Genes in Hypermutability and Recombination in *Staphylococcus Aureus*". en. In : *Journal of Bacteriology* 187.10 (mai 2005), p. 3455-3464. ISSN : 0021-9193, 1098-5530. DOI : [10.1128/JB.187.10.3455-3464.2005](https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3455-3464.2005) (cf. p. 2).
- [21] Ana BOŠKOVIĆ et Oliver J RANDO. "Transgenerational Epigenetic Inheritance". en. In : (2018), p. 23 (cf. p. 2).

- [22] Russell BONDURIANSKY, Angela J CREAM et Troy DAY. "The Implications of Nongenetic Inheritance for Evolution in Changing Environments". In : *Evolutionary Applications* 5.2 (fév. 2012), p. 192-201. ISSN : 1752-4571. DOI : [10.1111/j.1752-4571.2011.00213.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00213.x) (cf. p. 2).
- [23] Emilien LUQUET et Juliette TARIEL. "Offspring Reaction Norms Shaped by Parental Environment: Interaction between within- and Trans-Generational Plasticity of Inducible Defenses". en. In : *BMC Evolutionary Biology* 16.1 (déc. 2016), p. 209. ISSN : 1471-2148. DOI : [10.1186/s12862-016-0795-9](https://doi.org/10.1186/s12862-016-0795-9) (cf. p. 2).
- [24] H. Allen ORR. "Fitness and Its Role in Evolutionary Genetics". en. In : *Nature Reviews Genetics* 10.8 (août 2009), p. 531-539. ISSN : 1471-0064. DOI : [10.1038/nrg2603](https://doi.org/10.1038/nrg2603) (cf. p. 2).
- [25] Michael J. WISER et Richard E. LENSKI. "A Comparison of Methods to Measure Fitness in *Escherichia Coli*". en. In : *PLOS ONE* 10.5 (mai 2015), e0126210. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0126210](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126210) (cf. p. 2).
- [26] Marta K. LABOCHA et Jack P. HAYES. "Morphometric Indices of Body Condition in Birds: A Review". en. In : *Journal of Ornithology* 153.1 (jan. 2012), p. 1-22. ISSN : 2193-7192, 2193-7206. DOI : [10.1007/s10336-011-0706-1](https://doi.org/10.1007/s10336-011-0706-1) (cf. p. 2).
- [27] Cheng-Ying JIANG, Libing DONG, Jian-Kang ZHAO, Xiaofang HU, Chaohua SHEN, Yuxin QIAO, Xinyue ZHANG, Yapei WANG, Rustem F. ISMAGILOV, Shuang-Jiang LIU et Wenbin DU. "High-Throughput Single-Cell Cultivation on Microfluidic Streak Plates". In : *Applied and Environmental Microbiology* 82.7 (avr. 2016), p. 2210-2218. DOI : [10.1128/AEM.03588-15](https://doi.org/10.1128/AEM.03588-15) (cf. p. 2).
- [28] Ernst MAYR. *The Growth of Biological Thought: Diversity, Evolution, and Inheritance*. Belknap Press, jan. 1985 (cf. p. 3).
- [29] David HOULE et Alexey S KONDRASHOV. "Coevolution of Costly Mate Choice and Condition-Dependent Display of Good Genes." In : *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269.1486 (jan. 2002), p. 97-104. ISSN : 0962-8452. DOI : [10.1098/rspb.2001.1823](https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1823) (cf. p. 3).
- [30] Melanie GHOUL et Sara MITRI. "The Ecology and Evolution of Microbial Competition". en. In : *Trends in Microbiology* 24.10 (oct. 2016), p. 833-845. ISSN : 0966-842X. DOI : [10.1016/j.tim.2016.06.011](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011) (cf. p. 3).
- [31] N.J. BERTHELIS, R.R. CORDERO OTERO, F.F. BAUER, J.M. THEVELEIN et I.S. PRETORIUS. "Discrepancy in Glucose and Fructose Utilisation during Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* Wine Yeast Strains". In : *FEMS Yeast Research* 4.7 (mai 2004), p. 683-689. ISSN : 1567-1356. DOI : [10.1016/j.femsyr.2004.02.005](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.02.005) (cf. p. 3).

- [32] Carla GONÇALVES, Jennifer H WISECAVER, Jacek KOMINEK, Madalena Salema OOM, Maria José LEANDRO, Xing-Xing SHEN, Dana A OPULENTE, Xiaofan ZHOU, David PERIS, Cletus P KURTZMAN, Chris Todd HITTINGER, Antonis ROKAS et Paula GONÇALVES. "Evidence for Loss and Reacquisition of Alcoholic Fermentation in a Fructophilic Yeast Lineage". In : *eLife* 7 (avr. 2018). Sous la dir. de Paul B RAINEY, e33034. ISSN : 2050-084X. DOI : [10.7554/eLife.33034](https://doi.org/10.7554/eLife.33034) (cf. p. 3).
- [33] Erin R. GREEN et Joan MECSAS. "Bacterial Secretion Systems: An Overview". en. In : *Microbiology Spectrum* 4.1 (jan. 2016). Sous la dir. d'Indira T. KUDVA. ISSN : 2165-0497. DOI : [10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015) (cf. p. 3).
- [34] Priya DASSARMA, André ANTUNES, Marta Filipa SIMÕES et Shiladitya DASSARMA. "Earth's Stratosphere and Microbial Life". en. In : *Current Issues in Molecular Biology* (2020), p. 197-244. ISSN : 14673037. DOI : [10.21775/cimb.038.197](https://doi.org/10.21775/cimb.038.197) (cf. p. 3).
- [35] Irene STEFANINI. "Yeast-insect Associations: It Takes Guts". In : *Yeast (Chichester, England)* 35.4 (avr. 2018), p. 315-330. ISSN : 0749-503X. DOI : [10.1002/yea.3309](https://doi.org/10.1002/yea.3309) (cf. p. 3).
- [36] Nicola FRANCESCA, Domenica E. CANALE, Luca SETTANNI et Giancarlo MOSCHETTI. "Dissemination of Wine-Related Yeasts by Migratory Birds". en. In : *Environmental Microbiology Reports* 4.1 (2012), p. 105-112. ISSN : 1758-2229. DOI : [10.1111/j.1758-2229.2011.00310.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00310.x) (cf. p. 3).
- [37] Denis WALSH, Tim LEWINS et André ARIEW. "The Trials of Life: Natural Selection and Random Drift". en. In : *Philosophy of Science* 69.3 (sept. 2002), p. 429-446. ISSN : 0031-8248, 1539-767X. DOI : [10.1086/342454](https://doi.org/10.1086/342454) (cf. p. 4).
- [38] Christopher STEPHENS. "Selection, Drift, and the "Forces" of Evolution". en. In : *Philosophy of Science* 71.4 (oct. 2004), p. 550-570. ISSN : 0031-8248, 1539-767X. DOI : [10.1086/423751](https://doi.org/10.1086/423751) (cf. p. 4).
- [39] Joshua FILLER. "Newtonian Forces and Evolutionary Biology: A Problem and Solution for Extending the Force Interpretation". en. In : *Philosophy of Science* 76.5 (déc. 2009), p. 774-783. ISSN : 0031-8248, 1539-767X. DOI : [10.1086/605799](https://doi.org/10.1086/605799) (cf. p. 4).
- [40] Robert E RICKLEFS et Rick RELYEA. *Écologie, l'économie de la nature*. fr. 1ère édition. Hors collection Sciences. De Boeck Supérieur, 2019. ISBN : 978-2-8073-1419-1 (cf. p. 4, 5).
- [41] Peter J. MAYHEW. *Discovering Evolutionary Ecology: Bringing Together Ecology and Evolution*. en. Oxford ; New York : Oxford University Press, 2006. ISBN : 978-0-19-852528-8 978-0-19-857060-8 (cf. p. 4).
- [42] Simon P. HART, Martin M. TURCOTTE et Jonathan M. LEVINE. "Effects of Rapid Evolution on Species Coexistence". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.6 (fév. 2019), p. 2112-2117 (cf. p. 4).

- [43] Mark VELLEND. "Conceptual Synthesis in Community Ecology". en. In : *The Quarterly Review of Biology* 85.2 (juin 2010), p. 183-206. ISSN : 0033-5770, 1539-7718. DOI : [10.1086/652373](https://doi.org/10.1086/652373) (cf. p. 4).
- [44] Denis COUVET, Pierre-Henri GOUYON, F KJELLBERG, Isabelle OLIVIERI, D PONENTE et G VALDEYRON. "De la Métapopulation au voisinage: la génétique des populations en déséquilibre From metapopulation to neighbourhood: genetics of unbalanced populations". fr. In : (), p. 8 (cf. p. 4).
- [45] Michael GILPIN. *Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations*. en. Academic Press, déc. 2012. ISBN : 978-0-323-15523-6 (cf. p. 4).
- [46] David Sloan WILSON. "Complex Interactions in Metacommunities, with Implications for Biodiversity and Higher Levels of Selection". en. In : *Ecology* 73.6 (1992), p. 1984-2000. ISSN : 1939-9170. DOI : [10.2307/1941449](https://doi.org/10.2307/1941449) (cf. p. 4).
- [47] C. E. SHANNON. "A Mathematical Theory of Communication". In : *The Bell System Technical Journal* 27.3 (juil. 1948), p. 379-423. ISSN : 0005-8580. DOI : [10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x](https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x) (cf. p. 5).
- [48] J. Roger BRAY et J. T. CURTIS. "An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin". en. In : *Ecological Monographs* 27.4 (1957), p. 325-349. ISSN : 1557-7015. DOI : [10.2307/1942268](https://doi.org/10.2307/1942268) (cf. p. 5).
- [49] Catherine LOZUPONE et Rob KNIGHT. "UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities". In : *Applied and Environmental Microbiology* 71.12 (déc. 2005), p. 8228-8235. ISSN : 0099-2240. DOI : [10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005) (cf. p. 5).
- [50] Jacqueline PICOCHÉ. *Dictionnaire d'étymologie Du Français*. 2008 (cf. p. 5, 7).
- [51] Melinda A. ZEDER. "Domestication: Definition and Overview". en. In : *Encyclopedia of Global Archaeology*. Sous la dir. de Claire SMITH. New York, NY : Springer, 2014, p. 2184-2194. ISBN : 978-1-4419-0465-2. DOI : [10.1007/978-1-4419-0465-2_71](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0465-2_71) (cf. p. 5).
- [52] Juliet CLUTTON-BROCK. "THE UNNATURAL WORLD: BEHAVIOURAL ASPECTS OF HUMANS AND ANIMALS IN THE PROCESS OF DOMESTICATION". In : *Animals and Human Society*. Routledge, 1994. ISBN : 978-0-203-42144-4 (cf. p. 5).
- [53] David RINDOS. *The Origins of Agriculture: An Evolutionary Perspective*. en. Orlando : Academic Press, 1984. ISBN : 978-0-12-589280-3 (cf. p. 5).
- [54] Natasha J MEHDIABADI et Ted R SCHULTZ. "Natural History and Phylogeny of the Fungus-Farming Ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini)". en. In : *Myrmecological News* 13 (2009), p. 37-55 (cf. p. 5).
- [55] Greger LARSON et al. "Current Perspectives and the Future of Domestication Studies". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111.17 (avr. 2014), p. 6139-6146 (cf. p. 7).

- [56] Patrick E. MCGOVERN, Juzhong ZHANG, Jigen TANG, Zhiqing ZHANG, Gretchen R. HALL, Robert A. MOREAU, Alberto NUÑEZ, Eric D. BUTRYM, Michael P. RICHARDS, Chen-shan WANG, Guangsheng CHENG, Zhijun ZHAO et Changsui WANG. "Fermented Beverages of Pre- and Proto-Historic China". en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101.51 (déc. 2004), p. 17593-17598. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : [10.1073/pnas.0407921102](https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102) (cf. p. 7).
- [57] Emilie SIBBESSON. "Reclaiming the Rotten: Understanding Food Fermentation in the Neolithic and Beyond". In : *Environmental Archaeology* 0.0 (jan. 2019), p. 1-12. ISSN : 1461-4103. DOI : [10.1080/14614103.2018.1563374](https://doi.org/10.1080/14614103.2018.1563374) (cf. p. 7).
- [58] Brigida GALLONE, Stijn MERTENS, Jonathan L GORDON, Steven MAERE, Kevin J VERSTREPEN et Jan STEENSELS. "Origins, Evolution, Domestication and Diversity of Saccharomyces Beer Yeasts". en. In : *Current Opinion in Biotechnology. Food Biotechnology • Plant Biotechnology* 49 (fév. 2018), p. 148-155. ISSN : 0958-1669. DOI : [10.1016/j.copbio.2017.08.005](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005) (cf. p. 7).
- [59] Jean-Luc LEGRAS, Virginie GALEOTE, Frédéric BIGEY, Carole CAMARASA, Souhir MARSIT, Thibault NIDELET, Isabelle SANCHEZ, Arnaud COULOUX, Julie GUY, Ricardo FRANCO-DUARTE, Marina MARCET-HOUBEN, Toni GABALDON, Dorit SCHULLER, José Paulo SAMPAIO et Sylvie DEQUIN. "Adaptation of *S. Cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication". In : *Molecular Biology and Evolution* 35.7 (juil. 2018), p. 1712-1727. ISSN : 0737-4038. DOI : [10.1093/molbev/msy066](https://doi.org/10.1093/molbev/msy066) (cf. p. 7).
- [60] Frédéric BIGEY, Diego SEGOND, Anne FRIEDRICH, Stephane GUEZENEC, Aurélie BOURGAIS, Lucie HUYGHE, Nicolas AGIER, Thibault NIDELET et Delphine SICARD. "Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces Cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes". en. In : *Current Biology* 31.4 (fév. 2021), 722-732.e5. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2020.11.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.016) (cf. p. 7).
- [61] Herwig BACHMANN, Marjo J.C. STARRENBURG, Douwe MOLENAAR, Michiel KLEEREBEZEM et Johan E.T. VAN HYLCKAMA Vlieg. "Microbial Domestication Signatures of *Lactococcus Lactis* Can Be Reproduced by Experimental Evolution". In : *Genome Research* 22.1 (jan. 2012), p. 115-124. ISSN : 1088-9051. DOI : [10.1101/gr.121285.111](https://doi.org/10.1101/gr.121285.111) (cf. p. 7).
- [62] Daniel CAVANAGH, Gerald F. FITZGERALD et Olivia MCAULIFFE. "From Field to Fermentation: The Origins of *Lactococcus Lactis* and Its Domestication to the Dairy Environment". In : *Food Microbiology* 47.Supplement C (mai 2015), p. 45-61. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001) (cf. p. 7).

- [63] Delphine PASSERINI, Charlotte BELTRAMO, Michele CODDEVILLE, Yves QUENTIN, Paul RITZENTHALER, Marie-Line DAVERAN-MINGOT et Pascal Le BOURGEOIS. "Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of *Lactococcus Lactis*". en. In : *PLOS ONE* 5.12 (déc. 2010), e15306. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0015306](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015306) (cf. p. 7).
- [64] Jyoti P. TAMANG, Koichi WATANABE et Wilhelm H. HOLZAPFEL. "Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages". In : *Frontiers in Microbiology* 7 (mar. 2016). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2016.00377](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377) (cf. p. 8).
- [65] Parameswaran BINOD, Raveendran SINDHU et Ashok PANDEY. "The Alcohol Fermentation Step: The Most Common Ethanogenic Microorganisms Among Yeasts, Bacteria and Filamentous Fungi". en. In : *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Sous la dir. de Vincenza FARACO. Berlin, Heidelberg : Springer, 2013, p. 131-149. ISBN : 978-3-642-37861-4. DOI : [10.1007/978-3-642-37861-4_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37861-4_7) (cf. p. 8).
- [66] Andreas H. FÖRSTER et Johannes GESCHER. "Metabolic Engineering of *Escherichia Coli* for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products". In : *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2 (mai 2014), p. 16. ISSN : 2296-4185. DOI : [10.3389/fbioe.2014.00016](https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00016) (cf. p. 8).
- [67] Seppo SALMINEN, éd. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. en. 4th ed. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis, 2012. ISBN : 978-1-4398-3677-4 (cf. p. 8, 10).
- [68] Arne HAGMAN, Torbjörn SÄLL, Concetta COMPAGNO et Jure PISKUR. "Yeast "Make-Accumulate-Consume" Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication". In : *PLoS ONE* 8.7 (juil. 2013). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0068734](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068734) (cf. p. 8).
- [69] Thomas PFEIFFER et Annabel MORLEY. "An Evolutionary Perspective on the Crabtree Effect". English. In : *Frontiers in Molecular Biosciences* 1 (2014). ISSN : 2296-889X. DOI : [10.3389/fmolb.2014.00017](https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017) (cf. p. 10).
- [70] Heping ZHANG et Yimin CAI, éd. *Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice*. en. Springer Netherlands, 2014. ISBN : 978-94-017-8840-3. DOI : [10.1007/978-94-017-8841-0](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0) (cf. p. 10, 20).
- [71] Luc DE VUYST, Henning HARTH, Simon VAN KERREBROECK et Frédéric LEROY. "Yeast Diversity of Sourdoughs and Associated Metabolic Properties and Functionalities". en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 26-34. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018) (cf. p. 10, 20).
- [72] Jyoti Prakash TAMANG et Kasipathy KAILASAPATHY, éd. *Fermented Foods and Beverages of the World*. en. Boca Raton : CRC Press/Taylor & Francis, 2010. ISBN : 978-1-4200-9495-4 (cf. p. 11, 17).

- [73] Baltasar MAYO, Javier RODRÍGUEZ, Lucía VÁZQUEZ et Ana Belén FLÓREZ. "Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety". In : *Foods* 10.3 (mar. 2021), p. 602. ISSN : 2304-8158. DOI : [10.3390/foods10030602](https://doi.org/10.3390/foods10030602) (cf. p. 11).
- [74] Francesca MELINI, Valentina MELINI, Francesca LUZIATELLI, Anna Grazia FICCA et Maurizio RUZZI. "Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review". In : *Nutrients* 11.5 (mai 2019), p. 1189. ISSN : 2072-6643. DOI : [10.3390/nu11051189](https://doi.org/10.3390/nu11051189) (cf. p. 11).
- [75] Arezoo FEKRI, Mohammadali TORBATI, Ahmad YARI KHOSROWSHAHI, Hasan BAGHERPOUR SHAMLOO et Sodeif AZADMARD-DAMIRCHI. "Functional Effects of Phytate-Degrading, Probiotic Lactic Acid Bacteria and Yeast Strains Isolated from Iranian Traditional Sourdough on the Technological and Nutritional Properties of Whole Wheat Bread". en. In : *Food Chemistry* 306 (fév. 2020), p. 125620. ISSN : 0308-8146. DOI : [10.1016/j.foodchem.2019.125620](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125620) (cf. p. 11, 22).
- [76] G. PADMAJA et Keith H. STEINKRAUS. "Cyanide Detoxification in Cassava for Food and Feed Uses". In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35.4 (juil. 1995), p. 299-339. ISSN : 1040-8398. DOI : [10.1080/10408399509527703](https://doi.org/10.1080/10408399509527703) (cf. p. 11).
- [77] Dorota ZIELIŃSKA et Danuta KOŁOŻYN-KRAJEWSKA. "Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review". en. In : *BioMed Research International* 2018 (oct. 2018), e5063185. ISSN : 2314-6133. DOI : [10.1155/2018/5063185](https://doi.org/10.1155/2018/5063185) (cf. p. 11).
- [78] Shannon REZAC, Car Reen KOK, Melanie HEERMANN et Robert HUTKINS. "Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms". In : *Frontiers in Microbiology* 9 (2018), p. 1785. ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2018.01785](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785) (cf. p. 11).
- [79] Maria L. MARCO, Mary Ellen SANDERS, Michael GÄNZLE, Marie Claire ARRIETA, Paul D. COTTER, Luc DE VUYST, Colin HILL, Wilhelm HOLZAPFEL, Sarah LEBEER, Dan MERENSTEIN, Gregor REID, Benjamin E. WOLFE et Robert HUTKINS. "The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on Fermented Foods". In : *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 18.3 (2021), p. 196-208. ISSN : 1759-5045. DOI : [10.1038/s41575-020-00390-5](https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5) (cf. p. 11).
- [80] Nevin ŞANLIER, Büşra Başar GÖKCEN et Aybüke Ceyhun SEZGIN. "Health Benefits of Fermented Foods". In : *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59.3 (fév. 2019), p. 506-527. ISSN : 1040-8398. DOI : [10.1080/10408398.2017.1383355](https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355) (cf. p. 11).
- [81] William E. SANDINE et Paul R. ELLIKER. "Microbially Induced Flavors and Fermented Foods. Flavor in Fermented Dairy Products". In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18.4 (juil. 1970), p. 557-562. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/jf60170a023](https://doi.org/10.1021/jf60170a023) (cf. p. 11).

- [82] Alexander SCHINDLER, Andreas DUNKEL, Frauke STÄHLER, Michael BACKES, Jakob LEY, Wolfgang MEYERHOF et Thomas HOFMANN. "Discovery of Salt Taste Enhancing Arginyl Dipeptides in Protein Digests and Fermented Fish Sauces by Means of a Sensomics Approach". In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59.23 (déc. 2011), p. 12578-12588. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/jf2041593](https://doi.org/10.1021/jf2041593) (cf. p. 11).
- [83] Laurence BÉRARD. "La Gerle, Le Vivant Invisible Entre Traditions et Normes d'hygiène". In : *Animal Certifié Conforme: Déchiffrer Nos Relations Avec Le Vivant*. Dunod, 2012 (cf. p. 12).
- [84] Sylvie LORTAL, Annalisa DI BLASI, Marie-Noëlle MADEC, Concetta PEDILIGGIERI, Laura TUMINELLO, Gaëlle TANGUY, Jacques FAUQUANT, Yohan LECUONA, Patrizia CAMPO, Stefania CARPINO et Giuseppe LICITRA. "Tina Wooden Vat Biofilm: A Safe and Highly Efficient Lactic Acid Bacteria Delivering System in PDO Ragusano Cheese Making". eng. In : *International journal of food microbiology* 132.1 (juin 2009), p. 1-8. ISSN : 1879-3460. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.026) (cf. p. 12).
- [85] Joseph BONNEMAIRE, Marie-Christine MONTEL et Claude BÉRANGER. *Les fermentations au service des produits de terroir*. fr. Quae, nov. 2005. ISBN : 978-2-7592-1245-3 (cf. p. 12).
- [86] Daniela BASSI, Edoardo PUGLISI et Pier Sandro COCCONCELLI. "Comparing Natural and Selected Starter Cultures in Meat and Cheese Fermentations". en. In : *Current Opinion in Food Science*. Food Microbiology • Functional Foods and Nutrition 2 (avr. 2015), p. 118-122. ISSN : 2214-7993. DOI : [10.1016/j.cofs.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.002) (cf. p. 12).
- [87] John G GIBBONS et David C RINKER. "The Genomics of Microbial Domestication in the Fermented Food Environment". en. In : *Current Opinion in Genetics & Development* 35 (déc. 2015), p. 1-8. ISSN : 0959437X. DOI : [10.1016/j.gde.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003) (cf. p. 13).
- [88] Elisa MICHEL, Estelle MASSON, Sandrine BUBBENDORF, Léocadie LAPICQUE, Judith LEGRAND, Stéphane GUÉZENEC, Thibault NIDELET, Thérèse MARLIN, Olivier RUÉ, Bernard ONNO, Delphine SICARD et The Participating BAKERS. "Artisanal and Farmers Bread Making Practices Differently Shape Fungal Species Diversity in French Sourdoughs". en. In : *bioRxiv* (juin 2019), p. 679472. DOI : [10.1101/679472](https://doi.org/10.1101/679472) (cf. p. 15, 18, 24).
- [89] Amaia ARRANZ-OTAEGUI, Lara Gonzalez CARRETERO, Monica N. RAMSEY, Dorian Q. FULLER et Tobias RICHTER. "Archaeobotanical Evidence Reveals the Origins of Bread 14,400 Years Ago in Northeastern Jordan". en. In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.31 (juil. 2018), p. 7925-7930. ISSN : 0027-8424, 1091-6490. DOI : [10.1073/pnas.1801071115](https://doi.org/10.1073/pnas.1801071115) (cf. p. 16).
- [90] Delwen SAMUEL. "Bread in archaeology". fr. In : *Civilisations. Revue internationale d'anthropologie et de sciences humaines* 49 (juin 2002), p. 27-36. ISSN : 0009-8140. DOI : [10.4000/civilisations.1353](https://doi.org/10.4000/civilisations.1353) (cf. p. 16).

- [91] Delwen SAMUEL. "An Archaeological Study of Baking and Bread in New Kingdom Egypt". en. Thesis. University of Cambridge, mai 1994. DOI : [10.17863/CAM.15973](https://doi.org/10.17863/CAM.15973) (cf. p. 16).
- [92] Pline L'ANCIEN. *Histoire Naturelle*. Taylor and Francis. Londres, 1855 (cf. p. 16).
- [93] Susannah T. DOWDS. "Alaska Sourdough: Bread, Beards and Yeast". Thesis. Août 2017 (cf. p. 16).
- [94] Leo KLINE et T F SUGIHARA. "Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process. II. Isolation and Characterization of Undescribed Bacterial Species Responsible for the Souring Activity". en. In : *Applied Microbiology* 21.3 (1971), p. 7 (cf. p. 16).
- [95] William RUBEL. *Bread: A Global History*. en. Reaktion Books, oct. 2011. ISBN : 978-1-86189-961-3 (cf. p. 17).
- [96] Philippe ROUSSEL et Hubert CHIRON. *Les pains français: évolution, qualité, production*. fr. Maé-Erti, 2005. ISBN : 978-2-913338-10-4 (cf. p. 17, 18).
- [97] Nicole STÄUBLE TERCIER et Isabelle RABOUD-SCHÜLE. *Ferments en folie*. français, allemand. Vevey, Suisse : Nestlé, Fondation Alimentarium, 1999 (cf. p. 17).
- [98] Yann DEMARIGNY et Pauline GERBER. "Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread". en. In : *Food and Nutrition Sciences* 05.17 (2014), p. 1679-1691. ISSN : 2157-944X, 2157-9458. DOI : [10.4236/fns.2014.517181](https://doi.org/10.4236/fns.2014.517181) (cf. p. 17).
- [99] Siew Wen LAU, Ann Qi CHONG, Nyuk Ling CHIN, Rosnita A. TALIB et Roseliza Kadir BASHA. "Sourdough Microbiome Comparison and Benefits". en. In : *Microorganisms* 9.7 (juil. 2021), p. 1355. DOI : [10.3390/microorganisms9071355](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355) (cf. p. 17).
- [100] Don R. BROTHWELL, Professor Don R. BROTHWELL et Patricia BROTHWELL. *Food in Antiquity: A Survey of the Diet of Early Peoples*. en. JHU Press, jan. 1998. ISBN : 978-0-8018-5740-9 (cf. p. 17).
- [101] Mauro FISBERG et Rachel MACHADO. "History of Yogurt and Current Patterns of Consumption". In : *Nutrition Reviews* 73.suppl_1 (août 2015), p. 4-7. ISSN : 0029-6643. DOI : [10.1093/nutrit/nuv020](https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv020) (cf. p. 17).
- [102] P. MEVEL. *Des Laits Fermentés : Leur Rôle En Thérapeutique, En Particulier Dans Certaines Formes de l'hépatisme*. Philippe Renouard, 1909 (cf. p. 17).
- [103] Armelle LEBORGNE. *Étude Géographique et Socio-Historique Du Gros Lait*. 1998 (cf. p. 17, 22).
- [104] Marco GOBBETTI et Michael GÄNZLE, éd. *Handbook on Sourdough Biotechnology*. en. Boston, MA : Springer US, 2013. ISBN : 978-1-4614-5424-3 978-1-4614-5425-0. DOI : [10.1007/978-1-4614-5425-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5425-0) (cf. p. 18, 20).
- [105] *Technico-économie des systèmes d'élevage – Bretonne Pie Noir*. fr-FR (cf. p. 19).

- [106] Simon VAN KERREBROECK, Dominique MAES et Luc DE VUYST. "Sourdoughs as a Function of Their Species Diversity and Process Conditions, a Meta-Analysis". en. In : *Trends in Food Science & Technology* 68 (oct. 2017), p. 152-159. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2017.08.016](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016) (cf. p. 19, 20).
- [107] Jinshui ZHENG, Stijn WITTOUCK, Elisa SALVETTI, Charles M.A.P. FRANZ, Hugh M.B. HARRIS, Paola MATTARELLI, Paul W. O'TOOLE, Bruno POT, Peter VANDAMME, Jens WALTER, Koichi WATANABE, Sander WUYTS, Giovanna E. FELIS, Michael G. GÄNZLE et Sarah LEBEER. "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*". en. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70.4 (avr. 2020), p. 2782-2858. ISSN : 1466-5026, 1466-5034. DOI : [10.1099/ijsem.0.004107](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107) (cf. p. 20).
- [108] L. DE VUYST, S. VAN KERREBROECK, H. HARTH, G. HUYS, H. -M. DANIEL et S. WECKX. "Microbial Ecology of Sourdough Fermentations: Diverse or Uniform?" In : *Food Microbiology*. V International Symposium on Sourdough - Cereal Fermentation for Future Foods, Helsinki 10-12 October 2012 37 (fév. 2014), p. 11-29. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.002) (cf. p. 20, 23, 24).
- [109] Michael G. GÄNZLE et Jinshui ZHENG. "Lifestyles of Sourdough *Lactobacilli* – Do They Matter for Microbial Ecology and Bread Quality?" en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: Seventh International Symposium on Sourdough: Health & Wealth through Sourdough Innovation 302 (août 2019), p. 15-23. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019) (cf. p. 20).
- [110] Luc DE VUYST et Marc VANCANNEYT. "Biodiversity and Identification of Sourdough Lactic Acid Bacteria". en. In : *Food Microbiology*. 3rd International Symposium on Sourdough 24.2 (avr. 2007), p. 120-127. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2006.07.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.005) (cf. p. 20).
- [111] Luc DE VUYST et Patricia NEYSENS. "The Sourdough Microflora: Biodiversity and Metabolic Interactions". en. In : *Trends in Food Science & Technology*. Second International Symposium on Sourdough - From Fundamentals to Applications 16.1 (jan. 2005), p. 43-56. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2004.02.012](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.012) (cf. p. 20).
- [112] M GOBBETTI. "The Sourdough Microflora: Interactions of Lactic Acid Bacteria and Yeasts". en. In : *Trends in Food Science & Technology* 9.7 (juil. 1998), p. 267-274. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/S0924-2244\(98\)00053-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00053-3) (cf. p. 20).
- [113] Aldo CORSETTI et Luca SETTANNI. "Lactobacilli in Sourdough Fermentation". en. In : *Food Research International* 40.5 (juin 2007), p. 539-558. ISSN : 0963-9969. DOI : [10.1016/j.foodres.2006.11.001](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.001) (cf. p. 20).

- [114] Kashika ARORA, Hana AMEUR, Andrea POLO, Raffaella DI CAGNO, Carlo Giuseppe RIZZELLO et Marco GOBBETTI. "Thirty Years of Knowledge on Sourdough Fermentation: A Systematic Review". en. In : *Trends in Food Science & Technology* 108 (fév. 2021), p. 71-83. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2020.12.008](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008) (cf. p. 20).
- [115] Belén CARBONETTO, Johan RAMSAYER, Thibault NIDELET, Judith LEGRAND et Delphine SICARD. "Bakery Yeasts, a New Model for Studies in Ecology and Evolution". en. In : *Yeast* 35.11 (2018), p. 591-603. ISSN : 1097-0061. DOI : [10.1002/yea.3350](https://doi.org/10.1002/yea.3350) (cf. p. 20).
- [116] Elizabeth A LANDIS et al. "The Diversity and Function of Sourdough Starter Microbiomes". In : *eLife* 10 (jan. 2021). Sous la dir. de Detlef WEIGEL, Sara MITRI et Rachel ADAMS, e61644. ISSN : 2050-084X. DOI : [10.7554/eLife.61644](https://doi.org/10.7554/eLife.61644) (cf. p. 20).
- [117] Ting Ting LI, Wen Li TIAN et Chun Tao GU. "Elevation of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* to the Species Level as *Lactococcus Cremoris* Sp. Nov. and Transfer of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Tructae* to *Lactococcus Cremoris* as *Lactococcus Cremoris* Subsp. *Tructae* Comb. Nov." en. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (mar. 2021). ISSN : 1466-5026, 1466-5034. DOI : [10.1099/ijsem.0.004727](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004727) (cf. p. 20).
- [118] Olivier GOURVENEC. *Constitution d'un Dossier Pour Le Dépôt de La Marque Collective "Gros-Lait"*. Rapp. tech. ADRIA Quimper, mai 1999 (cf. p. 20).
- [119] Wonyong KIM. "The Genus *Lactococcus*". en. In : *Lactic Acid Bacteria*. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Chap. 26, p. 429-443. ISBN : 978-1-118-65525-2. DOI : [10.1002/9781118655252.ch26](https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch26) (cf. p. 20).
- [120] Delphine PASSERINI, Valérie LAROUTE, Michèle CODDEVILLE, Pascal LE BOURGEOIS, Pascal LOUBIÈRE, Paul RITZENTHALER, Muriel COCAIGN-BOUSQUET et Marie-Line DAVERAN-MINGOT. "New Insights into *Lactococcus Lactis* Diacetyl- and Acetoin-Producing Strains Isolated from Diverse Origins". In : *International Journal of Food Microbiology* 160.3 (jan. 2013), p. 329-336. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023) (cf. p. 20).
- [121] Fanny LEENHARDT, Marie-Anne LEVRAT-VERNY, Elisabeth CHANLIAUD et Christian RÉMÉSY. "Moderate Decrease of pH by Sourdough Fermentation Is Sufficient To Reduce Phytate Content of Whole Wheat Flour through Endogenous Phytase Activity". In : *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53.1 (jan. 2005), p. 98-102. ISSN : 0021-8561. DOI : [10.1021/jf049193q](https://doi.org/10.1021/jf049193q) (cf. p. 22).
- [122] Roel VAN DER MEULEN, Ilse SCHEIRLINCK, Ann VAN SCHOOR, Geert HUYS, Marc VANCANNEYT, Peter VANDAMME et Luc DE VUYST. "Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs". In : *Applied and Environmental Microbiology* 73.15 (août 2007), p. 4741-4750. ISSN : 0099-2240. DOI : [10.1128/AEM.00315-07](https://doi.org/10.1128/AEM.00315-07) (cf. p. 22).

- [123] Stefan WECKX, Roel VAN DER MEULEN, Dominique MAES, Ilse SCHEIRLINCK, Geert HUYS, Peter VANDAMME et Luc DE VUYST. "Lactic Acid Bacteria Community Dynamics and Metabolite Production of Rye Sourdough Fermentations Share Characteristics of Wheat and Spelt Sourdough Fermentations". en. In : *Food Microbiology* 27.8 (déc. 2010), p. 1000-1008. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2010.06.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.005) (cf. p. 22).
- [124] Danilo ERCOLINI, Erica PONTONIO, Francesca De FILIPPIS, Fabio MINERVINI, Antonietta La STORIA, Marco GOBBETTI et Raffaella Di CAGNO. "Microbial Ecology Dynamics during Rye and Wheat Sourdough Preparation". en. In : *Applied and Environmental Microbiology* 79.24 (déc. 2013), p. 7827-7836. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.02955-13](https://doi.org/10.1128/AEM.02955-13) (cf. p. 22).
- [125] Marianna BESSMELTSEVA, Ene VIIARD, Jaak SIMM, Toomas PAALME et Inga SARAND. "Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation". In : *PLoS ONE* 9.4 (avr. 2014). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0095449](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095449) (cf. p. 22).
- [126] M. L. HANSON, W. L. WENDORFF et K. B. HOUCK. "Effect of Heat Treatment of Milk on Activation of Bacillus Spores". In : *Journal of Food Protection* 68.7 (juil. 2005), p. 1484-1486. ISSN : 0362-028X. DOI : [10.4315/0362-028X-68.7.1484](https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.7.1484) (cf. p. 23).
- [127] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Giuseppe CELANO et Marco GOBBETTI. "House Microbiotas as Sources of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Italian Sourdoughs". en. In : *Food Microbiology* 52 (déc. 2015), p. 66-76. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009) (cf. p. 23).
- [128] Martha D. CALVERT, Anne A. MADDEN, Lauren M. NICHOLS, Nick M. HADDAD, Jacob LAHNE, Robert R. DUNN et Erin A. MCKENNEY. "A Review of Sourdough Starters: Ecology, Practices, and Sensory Quality with Applications for Baking and Recommendations for Future Research". In : *PeerJ* 9 (mai 2021), e11389. ISSN : 2167-8359. DOI : [10.7717/peerj.11389](https://doi.org/10.7717/peerj.11389) (cf. p. 23).
- [129] Marco GOBBETTI, Fabio MINERVINI, Erica PONTONIO, Raffaella DI CAGNO et Maria DE ANGELIS. "Drivers for the Establishment and Composition of the Sourdough Lactic Acid Bacteria Biota". en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 3-18. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022) (cf. p. 23).
- [130] Fabio MINERVINI, Maria DE ANGELIS, Raffaella DI CAGNO et Marco GOBBETTI. "Ecological Parameters Influencing Microbial Diversity and Stability of Traditional Sourdough". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 171 (fév. 2014), p. 136-146. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021) (cf. p. 23).

- [131] Gino VRANCKEN, Tom RIMAU, Stefan WECKX, Frédéric LEROY et Luc De VUYST. "Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation". en. In : *Applied and Environmental Microbiology* 77.8 (avr. 2011), p. 2716-2726. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.02470-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02470-10) (cf. p. 23).
- [132] Viola GALLI, Manuel VENTURI, Niccolò PINI, Simona GUERRINI, Lisa GRANCHI et Massimo VINCENZINI. "Liquid and Firm Sourdough Fermentation: Microbial Robustness and Interactions during Consecutive Backsloppings". en. In : *LWT* 105 (mai 2019), p. 9-15. ISSN : 0023-6438. DOI : [10.1016/j.lwt.2019.02.004](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.004) (cf. p. 23).
- [133] Raffaella DI CAGNO, Erica PONTONIO, Solange BUCHIN, Maria DE ANGELIS, Anna LATTANZI, Francesca VALERIO, Marco GOBBETTI et Maria CALASSO. "Diversity of the Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiota in the Switch from Firm- to Liquid-Sourdough Fermentation". eng. In : *Applied and Environmental Microbiology* 80.10 (mai 2014), p. 3161-3172. ISSN : 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.00309-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00309-14) (cf. p. 23).
- [134] Thomas TEFFRI-CHAMBELLAND. *Traité de boulangerie au levain*. fr. Ducasse. Levallois-Perret, 2019 (cf. p. 24).
- [135] V. GRIMM et Christian WISSEL. "Babel, or the Ecological Stability Discussions: An Inventory and Analysis of Terminology and a Guide for Avoiding Confusion". en. In : *Oecologia* 109.3 (fév. 1997), p. 323-334. ISSN : 0029-8549, 1432-1939. DOI : [10.1007/s004420050090](https://doi.org/10.1007/s004420050090) (cf. p. 24).
- [136] Béragère STORUP, Glen MILLOT et Claudia NEUBAUER. *La Recherche Participative Comme Mode De Production Des Savoirs*. Rapp. tech. Sciences Citoyennes, 2014 (cf. p. 27).
- [137] Marja-Liisa SWANTZ. "The Role of Participant Research in Development". In : *Geografiska Annaler: Series B, Human Geography* 57.2 (oct. 1975), p. 119-127. ISSN : 0435-3684. DOI : [10.1080/04353684.1975.11879405](https://doi.org/10.1080/04353684.1975.11879405) (cf. p. 27).
- [138] Marine LEGRAND. "Vigie-Nature : sciences participatives et biodiversité à grande échelle". fr. In : *Cahiers des Amériques latines* 72-73 (déc. 2013), p. 65-84. ISSN : 1141-7161. DOI : [10.4000/cal.2805](https://doi.org/10.4000/cal.2805) (cf. p. 27).
- [139] Yannick BARTHE, Michel CALLON et Pierre LASCOUMES. *Agir dans un monde incertain. Essai sur la démocratie technique*. fr. Le Seuil, fév. 2014. ISBN : 978-2-02-115749-9 (cf. p. 27, 28).
- [140] *La recherche participative · Inserm, La science pour la santé*. fr-FR. <https://www.inserm.fr/nos-recherches/recherche-participative/>. Avr. 2021 (cf. p. 28).
- [141] Bruno LATOUR et Steeve WOOLGAR. *La Vie de Laboratoire. La Production Des Faits Scientifiques*. La Découverte. 1988 (cf. p. 28).

- [142] Élise DEMEULENAERE et al. “La sélection participative à l’épreuve du changement d’échelle. À propos d’une collaboration entre paysans sélectionneurs et généticiens de terrain”. fr. In : *Natures Sciences Societes* Vol. 25.4 (2017), p. 336-346. ISSN : 1240-1307 (cf. p. 28).
- [143] Pierre RIVIÈRE, Julie C. DAWSON, Isabelle GOLDRINGER et Olivier DAVID. “Hierarchical Bayesian Modeling for Flexible Experiments in Decentralized Participatory Plant Breeding”. en. In : *Crop Science* 55.3 (2015), p. 1053-1067. ISSN : 1435-0653. DOI : [10.2135/cropsci2014.07.0497](https://doi.org/10.2135/cropsci2014.07.0497) (cf. p. 28).
- [144] Frédérique JANKOWSKI et Joëlle Le MAREC. “Légitimation des savoirs environnementaux dans un programme de recherche participative au Sénégal”. fr. In : *Natures Sciences Societes* Vol. 22.1 (mai 2014), p. 15-22. ISSN : 1240-1307 (cf. p. 29).
- [145] Jacques M CHEVALIER et Daniel J BUCKLES. “Handbook for Participatory Action Research, Planning and Evaluation”. en. In : (2019), p. 152 (cf. p. 29).

Chapitre 2

Rôle de la dispersion

2.1 Introduction

On a vu dans l'introduction générale que les microorganismes pouvaient disperser dans l'environnement à courte distance de manière autonome s'ils sont motiles, ou à longue distance via des vecteurs biotiques ou abiotiques. Parmi les vecteurs biotiques, des animaux tels que des insectes ou des oiseaux dispersent des microorganismes, et les humains sont un important facteur de leur dispersion. Dans les produits fermentés, on peut distinguer deux niveaux de dispersion : la dispersion de microorganismes depuis l'environnement vers le produit, ou la dispersion de la communauté microbienne entière du produit d'un endroit à un autre. L'importance de la dispersion depuis l'environnement vers le produit est variable selon la méthode de production en fonction notamment de la manière d'apporter les microorganismes (fermentation spontanée ou apport de ferment), et de la stérilisation ou non de la matière première. La dispersion de communautés microbiennes entières est liée à l'organisation sociale des producteurs. Les communautés microbiennes des produits fermentés sont en effet organisés en méta-communautés (voir figure 1.1), dont les possibilités de dispersion entre communautés sont déterminées par l'organisation sociale des producteurs et leurs échanges. Les dons de ferments sont courants pour le Gwell, qui ne peut pas être produit *de novo*. Les éleveurs se donnent donc des ferments en cas de perte ou lorsqu'un éleveur souhaite commencer à produire du Gwell. Ces échanges sont considérés comme faisant partie intégrante de l'identité du produit, et la structure sociale et les réseaux d'échanges peuvent ainsi participer à structurer les communautés microbiennes des différents Gwell. Cette pratique d'échange de ferments est moins courante concernant le levain de panification, de nombreux boulangers préférant initier leur propre levain à partir de farine et d'eau. Il arrive tout de même que des boulangers se donnent du levain, par exemple s'il présente des caractéristiques particulières, comme une acidité ou une odeur spécifique. De plus, il arrive que des boulangers "marient" leur levain, c'est à dire qu'ils les mélangent et obtiennent chacun un levain hybride. D'une manière plus générale, des échanges de grains et de farine, ou simplement des rencontres et des poignées de main peuvent participer à disperser des microorganismes. Les échanges de matière première (grain ou farine) sont plus courants que les échanges de levain chez les

boulangers, notamment chez les paysans-boulangers, et pourraient constituer une source importante de dispersion de microorganismes.

J'évalue dans ce chapitre l'importance de la dispersion des microorganismes de la farine vers le levain, et je m'intéresse également aux échanges de levain entre boulangers. Étant donné que le Gwell a été très peu étudié, j'expose dans un premier temps les résultats de caractérisation sensorielle, physico-chimique et microbiologique, avant d'explorer les liens entre la structuration des communautés microbiennes et les réseaux de dons et d'échanges de ferments entre éleveurs.

2.2 Microbial Community Dispersal In Sourdough

Lucas von Gastrow^{1,2}, Rémy Amelot¹, Diego Segond¹, Stéphane Guézennec¹,
Juliane Bianco¹, Florence Valence² and Delphine Sicard¹

Article pour soumission à *Molecular Ecology*.

Affiliations

¹ : SPO, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, Montpellier 34000, France

² : STLO, INRAE, Institut Agro, Rennes Cedex 35042, France

Abstract

We assessed the effect of dispersal on the composition of the microbial community in sourdough. 16S and ITS1 rDNA metabarcoding analysis allowed us to identify microbial species in 46 sourdough samples, together with the flour from which each one was made. No sourdough-associated yeast species were detected in the flours. Sourdough-associated lactic acid bacteria (LAB) were found in only five flour samples, and they did not have the same amplicon sequence variant (ASV) as that found in the corresponding sourdough. The species shared between sourdough and flour samples were plant-associated and not known to be found alive in sourdough. Thus, flour-associated microorganisms did not appear to develop in the sourdough microbial community. Flour-associated LAB were however typical of the first stages of sourdough initiation. The dispersal between flour samples was investigated, and shared yeast ASVs were found between the sourdough samples. Four clusters of three to five bakers shared at least one yeast ASV. In one case, we were able to confirm that two bakers had exchanged their sourdough and that the same yeast ASV was maintained by both. In other cases, no information was available concerning exchanges between bakers, but this might occur unintentionally through encounters between bakers or students traveling between bakeries.

Keywords

Sourdough, Dispersal, Flour, Microbial Ecology

2.2.1 Introduction

Understanding the functioning and evolution of communities is central to ecological studies. Many of the concepts and debates that have animated this field have arisen from the study of plant communities [1]. Microbial communities have also been a subject of increasing interest, and it is now clearly established that they play a central role in the functioning and evolution of many ecosystems. Numerous concepts have been proposed in community ecology but it is only recently that theoretical models

have unified them to take account of local evolutionary dynamics and the links between communities. VELLEND [2] defined four factors that shape communities : diversification, selection, dispersal and drift, and more recently, THOMPSON et al. [3] proposed a meta-community model with three factors : density-independent responses to abiotic conditions, density-dependent biotic interactions, and dispersal. These general frameworks offer valuable tools to understand the dynamics of microbial communities but suffer from a lack of empirical data on the selection processes and dispersal of microbial communities.

Microbial communities are present in both wild environments and in all human-associated environments. They have been used to make fermented foods since the Neolithic era [4], in which they usually display relatively little complexity with regards wild environments, making them good model systems for ecological studies. They are organized as metacommunities in which the microbial community of each leaven evolves as a function of human practices and may be linked to others through exchanges of the leavens themselves or of the raw materials used to feed them. Among these numerous fermented foods, sourdough microbial communities used for bread-making represent a good metacommunity model system. First, sourdough microbial communities are relatively simple, usually containing one to two dominant bacterial and yeast species [5]. Second, sourdoughs are made of few ingredients, basically flour and water, which are regularly added to feed the microorganisms, thus limiting the number of sources of microbial species. Third, the microbial communities in sourdough have been widely studied and reviewed [6, 7, 8, 9, 5, 10, 11, 12]. Well known species such as *Fructilactobacillus sanfranciscensis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Levilactobacillus brevis* bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis*, *Torulaspora delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus* yeasts are frequently encountered. Finally, population genomic analysis of the yeast species *S. cerevisiae* has shown that sourdough yeast populations differ from commercial yeasts and may have undergone specific selection processes when compared to industrial processes [13].

Although the microbial composition of sourdough has been well described, the origins and dispersal of sourdough microbial species have only been partially studied. Previous studies showed that the same species of lactic acid bacteria (LAB) or yeast could be found on the baker's tools [14] or hands [15] and in their sourdough. But this does not tell us whether the microorganisms in the sourdough came from the baker's tools or hands or vice versa. Moreover, no sourdough microorganisms were detected in the bakery air [14] or in the water [16, 15] used to make the sourdough. Finally, other studies have shown that flour can be a vector for *Lactobacillaceae*. However, this was only shown for three different flours [17] or for laboratory-made sourdoughs [18], whose dynamics are not the same as bakery sourdoughs [19]. The source of sourdough yeast and bacteria therefore still needs to be elucidated.

In France, analyses of sourdough microbial communities revealed that *F. sanfranciscensis* was the dominant bacterial species in almost all sourdoughs [20, 21]. Yeast species were more diverse and included *S. cerevisiae* but also many different *Kazachstania* species. The distribution of the latter was associated with the type of bread-making practices. Sourdough made by farmer bakers tended to carry *K. bulderi* while sourdough made according to artisanal practices often contained *K. humilis* [22]. While farmer bakers exchange seeds, share mills or supply each other with flour, artisanal bakers usually buy

their flour from millers who produce and store flour at a larger scale. Different sources of flour supply may lead to different pathways for microorganism dispersal and explain the structuring of yeast species diversity as a function of bread-making practices.

To test this hypothesis, we analyzed the role of flour in the dispersal of sourdough microorganisms among French bakers and farmer-bakers. We studied the microbial species diversity of 46 flours and related sourdough samples as well as the bread-making practices of the bakers. We did not find any evidence that flour is a vector for sourdough yeasts. Flour can carry LAB species but these are not the same as those found in mature sourdough, suggesting another origin for sourdough LABs.

2.2.2 Material and Methods

Survey of bread-making practices

A total of 22 bakers and 22 French farmer-bakers completed a questionnaire on their bread-making practices, as described by MICHEL et al. [22]. Questions concerned sourdough management (addition of bran, back-slopping technique, time elapsing since sourdough initiation, sourdough hydration, number of back-slopping procedures per week and between bread-making sessions, temperature at back-slopping), the flour (self-produced or not, type of cereal variety, type of mill) and the bread-making process (use of selected baker's yeast in bread or in other products, mechanical or manual kneading, proportions of sourdough, flour, water and salt in bread dough, fermentation time, quantity of bread produced each week, number of bread-making sessions per week). We also asked the producers if they had shared raw materials (grains, flour or sourdough) or if they had physical contacts with each other.

Sample collection

A total of 46 sourdoughs were collected, together with the flour used to make each one. Forty-four sourdoughs came from different bakeries, and two bakeries (B64 and B68) sent two sourdoughs, so that 46 sourdough and 44 flour samples were studied. Samples were collected between September 2018 and July 2019 and were received at the laboratory within one to three days. All samples were stored at -20°C in plastic bags and plastic tubes, respectively, before DNA extraction.

Sourdough and flour microbial enumeration and strain isolation

All 46 sourdoughs and 21 flour samples were plated at reception. 10 g sourdough or 3 g flour were diluted ten times in tryptone-salt buffer (1 g/L tryptone, 8 g/L NaCl). After serial dilutions, lactic acid bacteria (LAB) were enumerated on MRS-5 [23] with 100 µg cycloheximide and on PCA (6 g/L Tryptone, 2.5 g/L yeast extract, 1 g/L glucose, 15 g/L agar) media while yeasts were enumerated on YEPD medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L dextrose, 100 mg/L chloramphenicol).

Identification of bacterial and yeast species

The species diversity of the sourdoughs and flours was analyzed by amplicon-based DNA metabarcoding using two separate Illumina MiSeq runs to prevent any contamination between sample types.

DNA extraction from sourdough and flour DNA was extracted using a Qiagen PowerSoil DNA isolation kit (12888-100). Sourdough DNA was extracted directly from 200 µg of material following the kit procedure. For the flour, 3g of material was washed in sterile PBS, filtered in a sterile filter bag (BagPage+, Interscience, France) and concentrated in 500µg PBS after centrifugation. Extraction was then performed in accordance with the manufacturer's instructions.

MiSeq sequencing The 16S V3-V4 region was amplified for bacteria and the ITS1 region for fungi. For fungi, the ITS1 region was targeted with the PCR primers ITS1-F (5' - CTTGGTCATTTAGAG-GAAGTAA - 3') and ITS2 (5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC - 3') [24], while for bacteria, the 16V3-V4 region was targeted with the PCR primers 343F : (5' - TACGGRAGGCAGCAG - 3') and 784R : (5' - TACCAGGGTATCTAATCCT - 3') [25]. The primers also included the Illumina tail (5' - TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG - 3'), and a frame-shift of four, six or eight random nucleotides for forward primers and four, five or six random nucleotides for reverse primers, in order to prevent saturation during sequencing. The resulting primers therefore had the following structure : 5' - Illumina tail - frame-shift - genome targeting region - 3'. All the primers used are listed in Supplementary Materials Table S1. For each forward or reverse primer, an equimolar mix of the three primers containing the different frame-shifts was added to the PCR mix. To prepare the multiplexed Illumina libraries, we employed a strategy based on a two-step PCR approach : a first PCR using the locus-specific primers including the Illumina adapter overhang (with 30 cycles), and a second PCR for the incorporation of Illumina dual-indexed adapters (with 12 cycles). Bead purifications were carried out after each PCR. Quantification, normalization and pooling were performed before sequencing on Illumina MiSeq [26].

Bioinformatics analyses The resulting sequences were analyzed using R [27] workflow combining dada2 v.1.16 [28] and FROGS 3.1.0 [29] software. Reads were filtered, merged and assigned to ASVs with dada2 and the ASVs were assigned to species using the FROGS affiliation tool. Adapters were first removed using cutadapt v. 1.12 with Python 2.7.13. Reads were then filtered using the dada2 filterAndTrim function, with a truncation length of 250 bp for ITS1 forward and reverse reads and 275 and 200 bp for 16S forward and reverse reads, respectively. This truncation reduced the error rate while still allowing the merging of most reads. The error model was then calculated using the learnErrors function. Reads were dereplicated using derepFastq and the dada2 core sample inference algorithm was executed. Forward and reverse reads were then merged with a minimum overlap of 20 bp. The resulting sequences were saved in a sequence table using makeSequenceTable. Chimera were removed using the removeBimeraDenovo function. The amplicon sequence variants (ASV) in the sequence table

were then assigned to species using FROGS affiliation v3.2.2 with silva 138 [30] for 16S and Unite 8.0 [31] for ITS1. Unite was completed with ITS1 reference sequences from yeast species usually found in sourdough. Multi-affiliations were dealt with by assigning the lowest common taxonomy level to multi-affiliated ASVs. Samples were rarefied to the minimum number of reads for each barcode, or 1000 reads using the `rarefy_even_depth` function of the R (v. 4.1.0) `phyloseq` package (v. 1.24.2) [32]. Samples with a depth of less than 1000 were discarded. If not otherwise specified, the analyses were conducted on the rarefied data.

Analysis of bread-making practices Groups of bread-making practices were obtained with an MCA computed with the R package `FactoMineR` (v. 2.4), and individuals were clustered using the `HCPC` function with two clusters. They were plotted using the `factoextra` package (v. 1.0.7).

Statistical analysis A Wilcoxon-Mann-Witney test was performed to compare the diversity index between the flour and sourdough samples. The correlation between flour and sourdough diversity was computed using a Spearman rank-order correlation test. Both tests were computed using the R package `stats` v 3.6.2, with the `wilcox.test` and `cor.test` functions, respectively. A Mantel test was performed to test the link between geographical distances for sourdoughs and Bray-Curtis distance matrices, using the R `ape` package (v. 5.5) `mantel.test` function.

2.2.3 Results

The sourdough microbiota had greater microbial density but less species diversity than the flour microbiota

To analyze the role of flour microbiota in the composition of sourdough microbiota, we compared 46 sourdough samples obtained from 44 bakeries with the 44 flour samples used to refresh them (only 21 flour samples were plated for microbial counts).

On average, microbial density was higher in sourdoughs than in flours, for both bacteria and fungi. Sourdoughs contained on average 1.9×10^7 (sd = 1.3×10^7) CFU/g (colony forming units/g) of yeast while flours contained a mean of 2.3×10^3 (sd = 1.6×10^3) CFU/g. As for bacteria, the sourdoughs contained 1.3×10^9 (sd = 1.3×10^9) CFU/g while flours contained 7.7×10^3 (sd = 2.0×10^4) CFU/g or 6.9×10^4 (sd = 1.0×10^5) CFU/g, depending on whether the estimation of bacterial density was performed on MRS or PCA. Sourdoughs were only plated on MRS medium, as we expected to find only *Lactobacillaceae*, while flour generally harbors a more diverse bacterial community so we also plated these samples on PCA, which is a less specific medium. The observation of fungal morphology on YEPD petri dishes revealed that most flour samples contained filamentous fungi, some with a typical *Penicillium* morphology, while sourdough samples were characterized by the presence of yeasts.

Although sourdoughs had a higher microbial density than flour, their microbial communities were less diverse than those in flour. Alpha diversity indexes calculated on the number of bacterial and

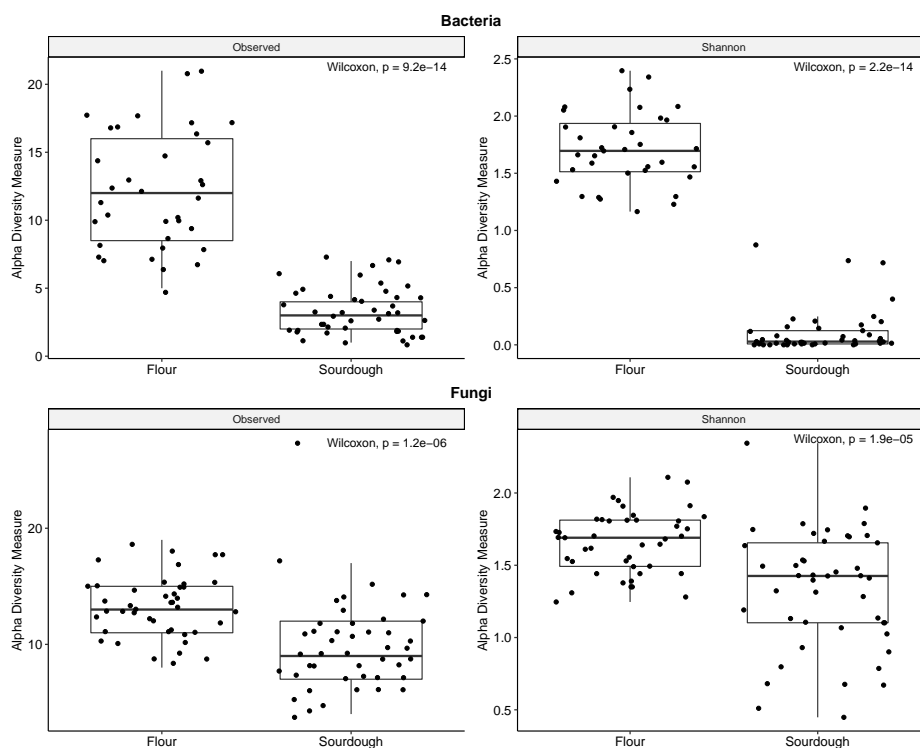


FIGURE 2.1 – Alpha diversity in sourdough and flour samples, estimated from 16S V3-V4 and ITS1 Illumina MiSeq reads assigned to species. Species richness (on the left) and evenness (on the right) are plotted.

fungi species were significantly lower in sourdough than in flour in terms of both richness (Wilcoxon-Mann-Witney test, bacteria $W = 1725.5$, $P < 0.001$, fungi $W = 1555.5$, $P < 0.0001$) and evenness (Wilcoxon-Mann-Witney test, bacteria $W = 1929$, $P < 0.001$, fungi $W = 1467$, $P < 0.0001$; Figure 2.1). This difference was greater for bacteria than for fungi, with averages of four and 11 species for bacteria in sourdough and flour, respectively, and 10 and 13 species for fungi in sourdough and flour, respectively.

Sourdough species diversity was not correlated with flour species diversity for either bacteria (Spearman = 13617, $P = 0.86$) or fungi (Spearman = 13019, $P = 0.91$).

The microbiota compositions of sourdough and flour were characterized by different families. The bacteria in the sourdoughs were almost entirely composed of *Lactobacillaceae*, while flour contained mainly *Erwiniaceae* and *Pseudomonadaceae*. In sourdough, all samples but three contained *Fructilactobacillus sanfranciscensis* as the dominant bacterial species; the others contained *Companilactobacillus paralimentarius*. Less frequently, the presence of *Levilactobacillus brevis*, *Latilactobacillus* sp. and *Lactilactobacillus* sp. was found. In flour, *Erwiniaceae*, *Pantoea agglomerans*, an unidentified *Pantoea* sp., and *Pseudomonadaceae* were generally detected. Among *Pseudomonas* sp., some were *P. graminis*, *P. rhizosphaerae* or *P. donghuensis*. As for fungi, *Saccharomycetaceae* was determined in most sourdough samples but was almost absent from flour samples (Figure 2.2); *S. cerevisiae* was found in 14 sourdough samples, *K. humilis* in seven samples and *K. bulderi* in six. These species were never found in flours. *Pleosporeaceae* species (*Alternaria alternata* and *Alternaria infectoria*), *Mycosphaerellaceae* (*Mycosphaerella tassiana*) and an unidentified fungus from the *Dothideomycetes* family were detected at a

high frequency in almost all flour samples.

Very little overlap between the microbiotas of sourdough and flour

Any overlaps between the sourdough and flour communities were analyzed using the Weighted Bray-Curtis distance calculated on the basis of species diversity. The Weighted Bray-Curtis was used to build two PCoAs, one for the bacterial community and the other for the fungal community. PCoA axis 1 and 2 explained 79.1% and 8.5% of variance for bacteria, and 28.5% and 13.6% of variance for fungi (Figure 2.3). For bacteria, axis 1 separated the flour and sourdough bacterial communities. For fungi, axis 1 separated many but not all of sourdough fungal communities from flour communities. Over the 46 sourdough fungal communities, 14 co-localized with flour fungal communities. Flour and sourdough dissimilarity matrices were not correlated (Mantel test, $z = 836$, $p = 0.667$ for bacteria and $z = 854$, $p = 0.13$ for fungi). Close microbial communities among flours did not lead to close microbial communities among sourdoughs.

We analyzed bread-making practices in order to determine whether they might be related to microbial communities in sourdough and flour. Two groups of bread-making practices could be distinguished (Figure Sx). Farmer-baker practices (cluster 1) were more frequently associated with the use of non-commercial yeast, ancient wheat landraces, small production runs and lengthy fermentation while artisanal practices (cluster 2) were generally characterized by larger scale production, short fermentation, and the use of commercial yeast and modern wheat varieties. Sourdough from farmer-bakers frequently contained *K. bulderi* as the dominant yeast species. However, analysis of the association between sourdough and flour microbial community dissimilarity and the geographical distances between bread-making practices did not reveal any correlation (Mantel test, for flour, $z = 308$, $p = 0.59$ and $z = 235$, $p = 0.79$ for bacteria and fungi, respectively; for sourdough, $z = 153$, $p = 0.60$ and $z = 411$, $p = 0.32$ for bacteria and fungi, respectively).

The differences between the microbial communities in sourdough and flour were explained by the high abundance in sourdough samples of fermentative microorganisms, which were almost never found in the flour samples. (Figure 2.4).

Overall, fermentative bacteria in the *Lactobacillales* order and yeast in the *Saccharomycetales* order were not detected in most flour samples. Out of 46 samples, ten flour samples contained fermentative bacterial species (*F. sanfranciscensis*, *Lactococcus garviae*, *Carnobacterium divergens*, *Weisella* or *Streptococcus* species) and 13 harbored fermentative yeasts (*Candida saitoana*, an unidentified *Candida* species, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikovia* sp. or *Eremothecium coryli*). However, the fermentative species found in flour samples were generally not found in the related sourdoughs. In six cases, *F. sanfranciscensis* was found in both flour and sourdough. Nevertheless, in these cases, the ASVs were not the same except in the case of baker 53 (Figure 2.5). *Lactococcus garviae* was found in the flour and sourdough used by baker 45 but only one read was present in the sourdough and this ASV differed from that found in the flour. An unidentified *Metschnikovia* species was found in four pairs of sourdough

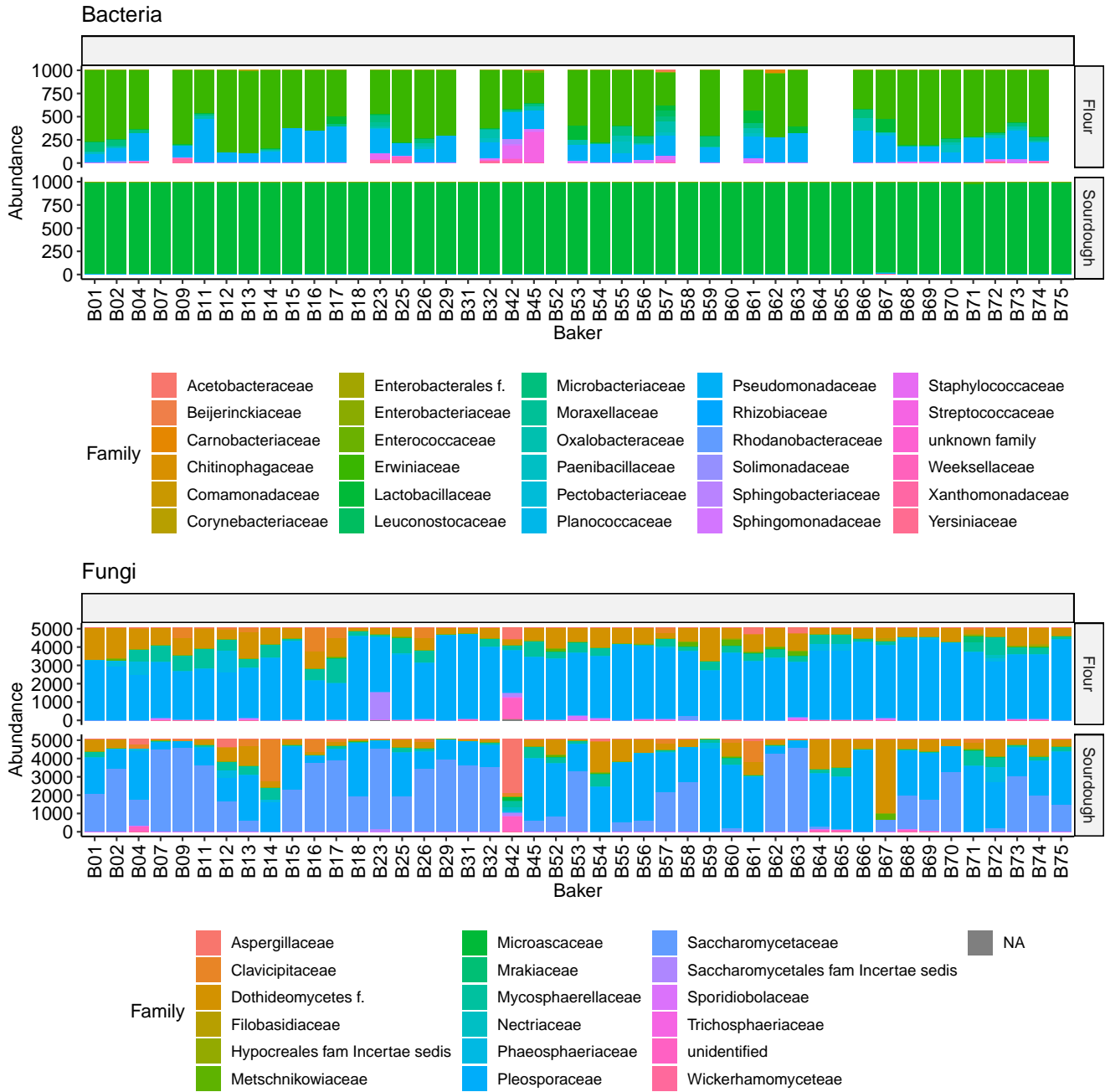


FIGURE 2.2 – Abundance of the different families in flours and sourdoughs. White bars represent the different ASVs.

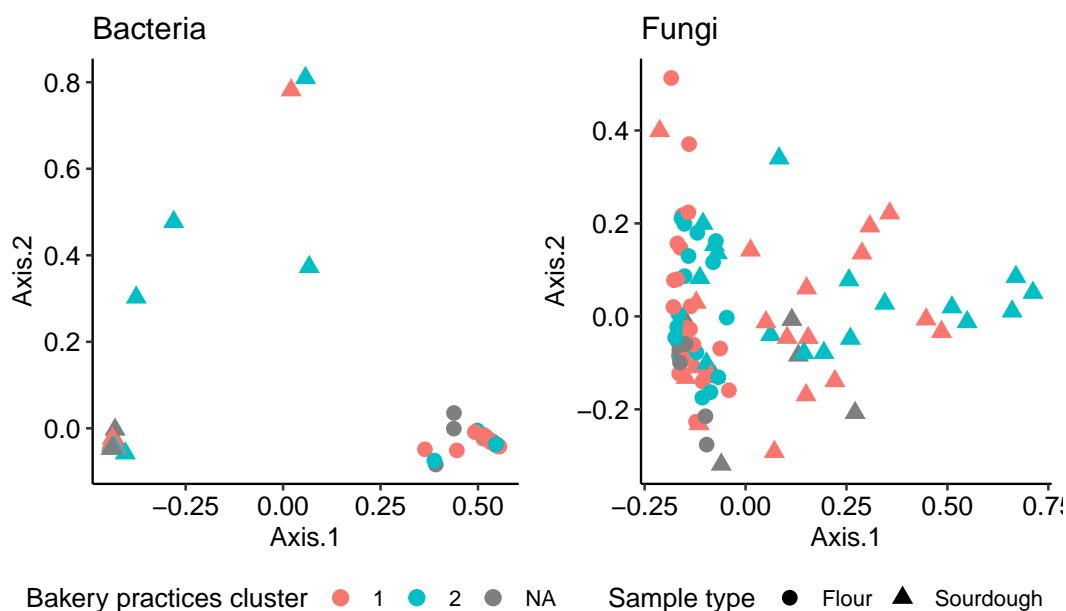


FIGURE 2.3 – PCoA based on Bray-Curtis dissimilarity for bacteria (left) and fungi (right). Bray-Curtis dissimilarity was computed on the basis of the abundance of the different species. Each point represents a sample. Colors indicate the bakery practices cluster, with farmer-baker practices in red and artisan-baker practices in blue. Sample types are represented by different shapes, flours being shown as circles and sourdoughs as triangles.

and flour, and *Candida saitoana* and an unidentified *Candida* species in one pair of sourdough and flour samples, although the same ASV was not found in them. Many non-fermentative fungal species were shared between flour and sourdough samples. They were mainly filamentous fungi, and notably species from the genus *Alternaria* or *Mycosphaerella*. For these species, the flour and sourdough samples shared on average 0.98 ASV (sd = 1.48).

Dispersal appear to be reduced between sourdoughs

The poor overlap between the microbiotas of flours and sourdoughs suggested that flour is not a vector of microbial dispersal between bakeries. However, microbial dispersal could occur through direct exchanges of sourdough between bakers. We therefore analyzed the microbial flux between sourdoughs by looking at the number of sourdoughs containing the same ASVs; those of the *F. sanfranciscensis* species were shared on average by 5.8 sourdoughs (sd = 9.4), while ASVs from the *Saccharomycetales* yeasts were shared by 1.22 sourdoughs on average (sd = 0.69).

We then studied the occurrence of ASVs in the most abundant bacteria, *F. sanfranciscensis*, and found they were present in all sourdoughs. By contrast, the ASVs of the dominant sourdough yeast species (*S. cerevisiae*, *K. bulderi* and *K. humilis*) were generally specific to a single sourdough (Figure 2.6). However, some ASVs were found in several sourdoughs. Sourdoughs from bakers B12, B15, B26 and B63 shared one *K. bulderi* ASV. Sourdoughs from bakers B04, B17, B31, B56 and B58 shared one to three *K. humilis* ASVs. Sourdoughs from bakers B29, B55 and B74 shared one to two *S. cerevisiae* ASVs and those from bakers B01, B16, B17 and B32 shared another ASV. Bakers who shared a yeast ASV

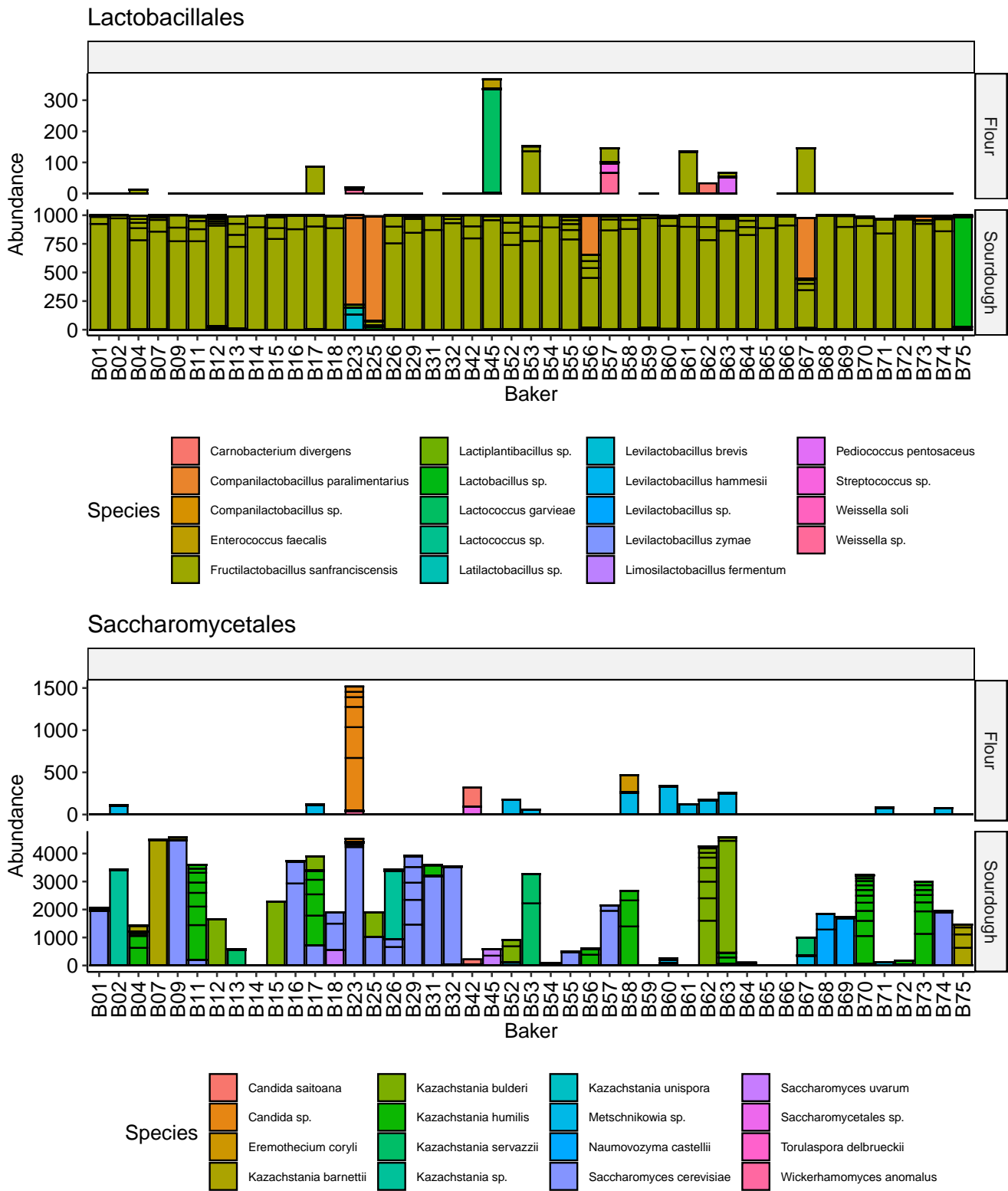


FIGURE 2.4 – Abundance of *Lactobacillales* and *Saccharomycetales* in flour and sourdough. The axes have different scales for abundance in flour and sourdough.

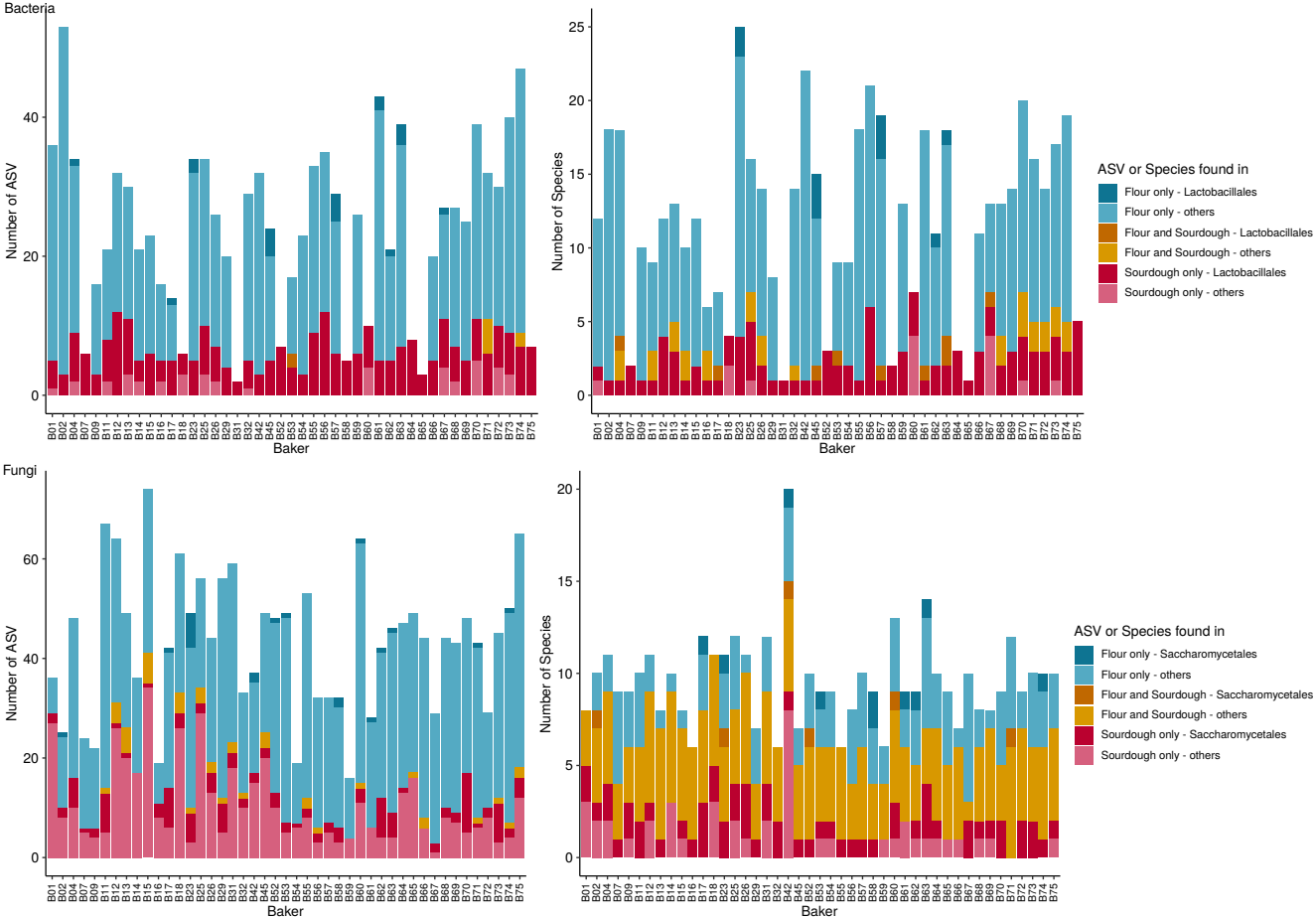


FIGURE 2.5 – Number of shared species (on the right) and ASV (on the left) between sourdoughs and the flour used to make them. Results for bacteria are shown at the top and for fungi at the bottom.

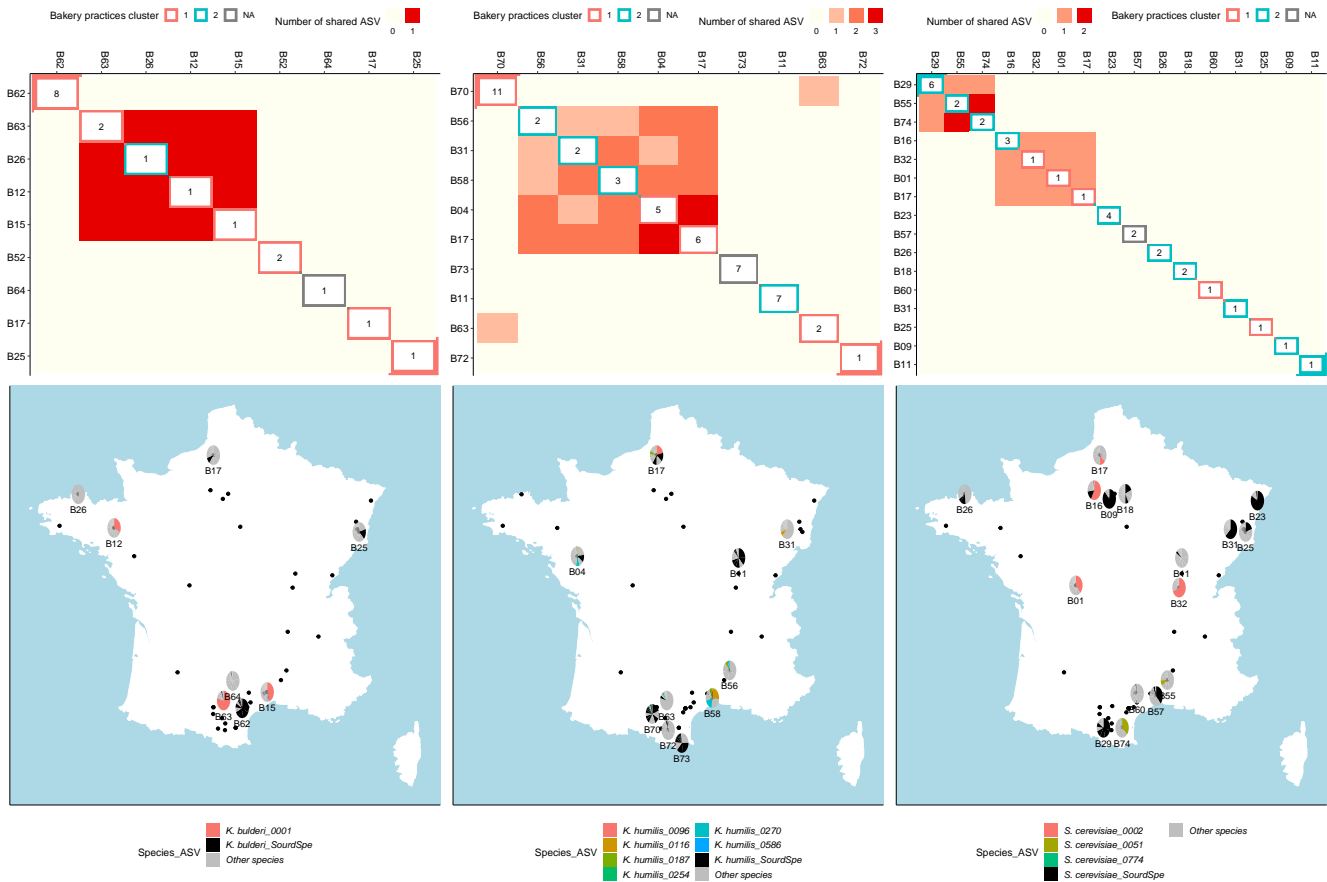


FIGURE 2.6 – Sourdoughs sharing *K. bulderi*, *K. humilis* and *S. cerevisiae* ASVs. Top, the heatmaps show the number of shared ASV between sourdoughs, each tile being colored according to the number of shared ASV. In the diagonal, the number of ASVs of the considered species in each sourdough are displayed, and the tiles are underlined according to the cluster of bread-making practices (1 = farmer-baker and 2 = artisan-baker). At the bottom, the maps of France show the locations of each baker. Bakers are represented by a point when the species considered was not detected in their sourdough, and in the other case the pie charts show the composition of their sourdoughs. ASVs that are shared between at least two different sourdoughs are colored and their identifiers displayed in the legend, while the ASVs of species considered to be specific to one sourdough are represented in black (SourdSpe in the legend), while ASVs from other species are in grey.

generally belonged to the same bakery practices cluster. The group of three bakers who shared one or two *S. cerevisiae* belonged to cluster 2 (corresponding to artisanal bakery practices) while three of the four bakers who shared another *S. cerevisiae* ASV belonged to cluster 1 (corresponding to farmer-baker practices). Three of the five bakers who shared at least one *K. humilis* ASV belonged to cluster 2, but the two others, who belonged to cluster 1, shared more ASVs than with the three others (Figure 2.5). An evaluation of the association between sourdough fungal community dissimilarity and geographical distances did not reveal any significant correlation (mantel $z = 363535.1$, $P = 0.547$). The only link that could be made from the data on sourdough exchanges concerned farmer-baker B15, who shared a *K. bulderi* ASV with farmer-baker B12, and started his sourdough using B12 sourdough.

2.2.4 Discussion

The composition of the sourdough microbiota was consistent with previous studies on sourdough. The mean LAB to yeasts ratio in sourdoughs was 65.4, which is within the same range as that reported by other studies [33, 20, 34, 35]. As previously detected in French sourdoughs, *F. sanfranciscensis* was the most frequently encountered bacterial species. *S. cerevisiae*, *K. humilis* and *K. bulderi* were the most frequently encountered sourdough dominant yeast species [21, 36, 20]. Moreover, *K. bulderi* was associated with farmer-baker practices, as previously reported by MICHEL et al. [22]. Surprisingly, *Saccharomycetales* accounted for fewer than 5% of the reads in ten sourdough samples, yet a typical yeast density and morphology was observed in almost all of these samples. This may have reflected biases in the metabarcoding analysis [37]. DNA could have been poorly extracted or amplified, thus leading to a low number of reads. The reads might also not have passed the quality filtering or merging steps in the bioinformatics analysis, particularly if the ITS region was too long. This is a limitation of the dada2 software, where reads that are too long to be merged are lost. However, this does not concern the ITS database, as in this case the ASV would have been found but not assigned to a species.

Flour-associated species were mainly plant-associated microorganisms

The microbiotas of the flours mainly comprised plant-associated microorganisms. Several filamentous fungi known to be cereal pathogens, and notably *Alternaria* and *Mycosphaerella* species, were detected. Similarly, several bacterial genera such as *Pseudomonas* and *Pantoea* were found. Many species in these genera are plant pathogens or plant-associated species [38, 39].

Most of the species that we detected in flour during this study had been mentioned in previous studies on wheat seed microbiotas [40, 41, 42]. They had also been mentioned in studies describing flour microbiota, and the results were in accordance with those of DE ANGELIS et al. [18] who compared the microbiotas of soft and *durum* wheat flour using culture independent methods. MINERVINI et al. [17] analyzed the microbiotas of three different flours, and found the species *F. sanfranciscensis* in every sample (4% of all the strains isolated from the flour). This was higher than what we found, and could have been related to bias affecting the culture independent analyses, where rare species can go undetected.

Surprisingly, the filamentous fungi plant-associated pathogens detected in flour were also detected in sourdoughs. However, on average they accounted for 54% of the reads (sd = 30%) in sourdough and 92% (sd = 9.3%) in flour, suggesting that filamentous fungi die in the acidic environment of sourdough and/or are poor competitors with yeasts in this environment. To our knowledge, they have never been detected alive in sourdough, even though they are able to grow on the media classically used to enumerate yeasts [43]. The presence of their DNA in sourdough suggested that this was partly protected in this environment, possibly thanks to their cell wall structure. The high proportion of these fungi in sourdough may also be related to bias affecting DNA extraction and amplification.

Unlike filamentous fungi, the common plant bacteria *Pantoea* and *Pseudomonas* were not detected

in sourdoughs, suggesting they did not survive in the sourdough ecosystem and that their DNA was degraded. This is highly probable as *Pseudomonas* species generally do not survive at a low pH.

LAB found in flour were typical of the first stage of sourdough preparation

As well as plant pathogens, the flour microbiotas contained several LAB genera : *Lactococcus*, *Pediococcus* or *Weisella*. They had all been detected previously at the first stages of new sourdough preparation [44], before being replaced by other LAB species, generally *F. sanfranciscensis*. The bacterial species present during the early stages of sourdough preparation may therefore arise from the flour. They do not benefit from a priority effect, and the succession of microbial communities during sourdough initiation does not follow the pattern of the community monopolization hypothesis [45], where an early arriving species can adapt to the environment and gain a competitive advantage over previously better adapted species, thereby altering the community assembly.

LAB present in flour did not develop in mature sourdough

However, our results showed that mature sourdoughs did not contain the same LAB as those provided by the flour. *F. sanfranciscensis*, which is the most frequently encountered LAB species in sourdough, was almost never found in flour. The most abundant *F. sanfranciscensis* ASV in sourdoughs, which is shared across all the French sourdoughs studied, was never detected in flour samples. It may have been absent from the flour, or present at very low levels, and was thus not detected by the metabarcoding analysis. Because the microbial counts were very low in flour (around 10^3 CFU/g), the species may not have been detected. Nevertheless, rare *F. sanfranciscensis* ASVs were detected in five flour samples, but these flour ASVs were only detected in one case in the related sourdough. Because the V3-V4 region of 16S rRNA displays low intra-species diversity, we can consider that the different bacterial ASVs corresponded to different strains. Therefore, the *F. sanfranciscensis* strains found in flour did not appear to develop in an established sourdough. This contradicts the findings of [17], who determined the same strains of *F. sanfranciscensis* in flour and sourdough in three bakeries.

Flour as the source of sourdough microorganisms

Two hypotheses could be advanced concerning evolution of the sourdough population of *F. sanfranciscensis*. On the one hand, the bacterial population may have come from an ancestral flour population and subsequently evolved. On the other hand, the sourdough and flour bacterial populations could have separate ancestral origins, with the sourdough population arising from a source other than flour, such as the baker's hands, bakery equipment, or insects, etc. Further investigation of the intraspecific diversity of *F. sanfranciscensis* is necessary to shed light on its origin and evolutionary dynamics.

During this study, none of the yeast species usually found in sourdough was detected in flour samples, so the sourdough yeasts did not appear to have come from the flour. The preferential occurrence of *K. bulderi* in sourdoughs made by farmer-bakers or *K. humilis* in artisanal sourdoughs could not be

explained by the different flour supply chains. This finding is in agreement with previous studies which showed that the species composition of sourdough yeasts depended more on the bakery house than on the cereal flour species used [14, 46].

Yeast dispersal between sourdoughs

The exchange or gifting of sourdoughs between bakers can lead to yeast dispersal, as was found between bakers B15 and B12 who were regularly in contact and exchanged their sourdoughs. However, this practice is not common, as bakers prefer to develop their own sourdough when they lose one. Finding the same sourdough yeast species in dough from several farmer-bakers could be explained by the development of networks of bakers who meet to share their knowledge and skills, and yeast dispersal may be promoted through handshakes. Student bakers traveling between different bakeries may also be a vector for dispersal. Bakers belonging to the same bakery practices cluster (artisanal or farmer-baker) tended to share more ASVs than with bakers from the other cluster (see Figure 2.6). However, the number of bakers sharing yeast ASVs was quite low : four, six, and eight bakers shared at least one *K. bulderi*, *K. humilis* and *S. cerevisiae* ASV respectively, so we were not able to perform a robust statistical analysis.

A population genomic analysis of *K. bulderi*, *K. humilis* and *S. cerevisiae* from sourdoughs would shed more light on the relative impact of gene flow and selection on the evolution of these sourdough yeasts. The genomes of *K. bulderi* and *K. humilis* were released recently (BioProject accession number PRJEB44438 in the NCBI BioProject database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>) and this will enable the conduct of these studies.

In conclusion, this evaluation of the bacterial and fungal composition of flour and sourdough showed that their microbiotas overlapped little. Flour did not appear to act as a vector for the dispersal for sourdough yeasts, but might be a vector for the dispersal of sourdough LAB. However, the LAB carried by the flour were not able to develop in a mature sourdough.

Bibliographie

- [1] Gregory M. MIKKELSON. "Niche-Based vs. Neutral Models of Ecological Communities". en. In : *Biology & Philosophy* 20.2-3 (mar. 2005), p. 557-566. ISSN : 0169-3867, 1572-8404. DOI : [10.1007/s10539-005-5583-7](https://doi.org/10.1007/s10539-005-5583-7) (cf. p. 47).
- [2] Mark VELLEND. "Conceptual Synthesis in Community Ecology". en. In : *The Quarterly Review of Biology* 85.2 (juin 2010), p. 183-206. ISSN : 0033-5770, 1539-7718. DOI : [10.1086/652373](https://doi.org/10.1086/652373) (cf. p. 48).
- [3] Patrick L. THOMPSON, Laura Melissa GUZMAN, Luc DE MEESTER, Zsófia HORVÁTH, Robert PTACNIK, Bram VANSCHOENWINKEL, Duarte S. VIANA et Jonathan M. CHASE. *A Process-Based Metacommunity Framework Linking Local and Regional Scale Community Ecology*. en. Preprint. Ecology, nov. 2019. DOI : [10.1101/832170](https://doi.org/10.1101/832170) (cf. p. 48).
- [4] Jyoti Prakash TAMANG et Kasipathy KAILASAPATHY, éd. *Fermented Foods and Beverages of the World*. en. Boca Raton : CRC Press/Taylor & Francis, 2010. ISBN : 978-1-4200-9495-4 (cf. p. 48).
- [5] Kashika ARORA, Hana AMEUR, Andrea POLO, Raffaella DI CAGNO, Carlo Giuseppe RIZZELLO et Marco GOBBETTI. "Thirty Years of Knowledge on Sourdough Fermentation: A Systematic Review". en. In : *Trends in Food Science & Technology* 108 (fév. 2021), p. 71-83. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2020.12.008](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.008) (cf. p. 48).
- [6] Luc DE VUYST, Henning HARTH, Simon VAN KERREBROECK et Frédéric LEROY. "Yeast Diversity of Sourdoughs and Associated Metabolic Properties and Functionalities". en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 26-34. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018) (cf. p. 48).
- [7] Michael GÄNZLE et Valery RIPARI. "Composition and Function of Sourdough Microbiota: From Ecological Theory to Bread Quality". In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 19-25. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004) (cf. p. 48).

- [8] Marco GOBBETTI, Fabio MINERVINI, Erica PONTONIO, Raffaella DI CAGNO et Maria DE ANGELIS. "Drivers for the Establishment and Composition of the Sourdough Lactic Acid Bacteria Biota". en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 3-18. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.022) (cf. p. 48).
- [9] Michael G. GÄNZLE et Jinshui ZHENG. "Lifestyles of Sourdough Lactobacilli – Do They Matter for Microbial Ecology and Bread Quality?" en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: Seventh International Symposium on Sourdough: Health & Wealth through Sourdough Innovation 302 (août 2019), p. 15-23. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.019) (cf. p. 48).
- [10] Simon VAN KERREBROECK, Dominique MAES et Luc DE VUYST. "Sourdoughs as a Function of Their Species Diversity and Process Conditions, a Meta-Analysis". en. In : *Trends in Food Science & Technology* 68 (oct. 2017), p. 152-159. ISSN : 0924-2244. DOI : [10.1016/j.tifs.2017.08.016](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.016) (cf. p. 48).
- [11] Martha D. CALVERT, Anne A. MADDEN, Lauren M. NICHOLS, Nick M. HADDAD, Jacob LAHNE, Robert R. DUNN et Erin A. MCKENNEY. "A Review of Sourdough Starters: Ecology, Practices, and Sensory Quality with Applications for Baking and Recommendations for Future Research". In : *PeerJ* 9 (mai 2021), e11389. ISSN : 2167-8359. DOI : [10.7717/peerj.11389](https://doi.org/10.7717/peerj.11389) (cf. p. 48).
- [12] Siew Wen LAU, Ann Qi CHONG, Nyuk Ling CHIN, Rosnita A. TALIB et Roseliza Kadir BASHA. "Sourdough Microbiome Comparison and Benefits". en. In : *Microorganisms* 9.7 (juil. 2021), p. 1355. DOI : [10.3390/microorganisms9071355](https://doi.org/10.3390/microorganisms9071355) (cf. p. 48).
- [13] Frédéric BIGEY, Diego SEGOND, Anne FRIEDRICH, Stephane GUEZENEC, Aurélie BOURGAIS, Lucie HUYGHE, Nicolas AGIER, Thibault NIDELET et Delphine SICARD. "Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces Cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes". en. In : *bioRxiv* (mai 2020), p. 2020.05.28.120584. DOI : [10.1101/2020.05.28.120584](https://doi.org/10.1101/2020.05.28.120584) (cf. p. 48).
- [14] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Giuseppe CELANO et Marco GOBBETTI. "House Microbiotas as Sources of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Italian Sourdoughs". en. In : *Food Microbiology* 52 (déc. 2015), p. 66-76. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009) (cf. p. 48, 61).
- [15] Aspen T. REESE, Anne A. MADDEN, Marie JOOSSENS, Guylaine LACAZE et Robert R. DUNN. "Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread". en. In : *mSphere* 5.1 (fév. 2020). ISSN : 2379-5042. DOI : [10.1128/mSphere.00950-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00950-19) (cf. p. 48).

- [16] I. SCHEIRLINCK, R. Van der MEULEN, L. De VUYST, P. VANDAMME et G. HUYS. "Molecular Source Tracking of Predominant Lactic Acid Bacteria in Traditional Belgian Sourdoughs and Their Production Environments". en. In : *Journal of Applied Microbiology* 106.4 (2009), p. 1081-1092. ISSN : 1365-2672. DOI : [10.1111/j.1365-2672.2008.04094.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04094.x) (cf. p. 48).
- [17] Fabio MINERVINI, Francesca R. DINARDO, Giuseppe CELANO, Maria DE ANGELIS et Marco GOBBETTI. "Lactic Acid Bacterium Population Dynamics in Artisan Sourdoughs Over One Year of Daily Propagations Is Mainly Driven by Flour Microbiota and Nutrients". English. In : *Frontiers in Microbiology* 9 (2018). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2018.01984](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01984) (cf. p. 48, 59, 60).
- [18] Maria DE ANGELIS, Fabio MINERVINI, Sonya SIRAGUSA, Carlo Giuseppe RIZZELLO et Marco GOBBETTI. "Wholemeal Wheat Flours Drive the Microbiome and Functional Features of Wheat Sourdoughs". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 302 (août 2019), p. 35-46. ISSN : 01681605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.009](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.009) (cf. p. 48, 59).
- [19] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Raffaella DI CAGNO et Marco GOBBETTI. "Influence of Artisan Bakery- or Laboratory-Propagated Sourdoughs on the Diversity of Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas". In : *Applied and Environmental Microbiology* 78.15 (août 2012), p. 5328-5340. DOI : [10.1128/AEM.00572-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00572-12) (cf. p. 48).
- [20] Emilie LHOMME, Anna LATTANZI, Xavier DOUSSET, Fabio MINERVINI, Maria DE ANGELIS, Guylaine LACAZE, Bernard ONNO et Marco GOBBETTI. "Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of Sixteen French Traditional Sourdoughs". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 215 (déc. 2015), p. 161-170. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015) (cf. p. 48, 59).
- [21] Elisa MICHEL, Clarisse MONFORT, Marion DEFFRASNES, Stéphane GUEZENEC, Emilie LHOMME, Matthieu BARRET, Delphine SICARD, Xavier DOUSSET et Bernard ONNO. "Characterization of Relative Abundance of Lactic Acid Bacteria Species in French Organic Sourdough by Cultural, qPCR and MiSeq High-Throughput Sequencing Methods". eng. In : *International Journal of Food Microbiology* 239 (déc. 2016), p. 35-43. ISSN : 1879-3460. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034) (cf. p. 48, 59).
- [22] Elisa MICHEL, Estelle MASSON, Sandrine BUBBENDORF, Léocadie LAPICQUE, Judith LEGRAND, Stéphane GUÉZENEC, Thibault NIDELET, Thérèse MARLIN, Olivier RUÉ, Bernard ONNO, Delphine SICARD et The Participating BAKERS. "Artisanal and Farmers Bread Making Practices Differently Shape Fungal Species Diversity in French Sourdoughs". en. In : *bioRxiv* (juin 2019), p. 679472. DOI : [10.1101/679472](https://doi.org/10.1101/679472) (cf. p. 48, 49, 59).
- [23] Christiane B. MEROETH, Jens WALTER, Christian HERTEL, Markus J. BRANDT et Walter P. HAMMES. "Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". en. In : *Applied and Environmental*

- Microbiology* 69.1 (jan. 2003), p. 475-482. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.69.1.475-482.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.475-482.2003) (cf. p. 49).
- [24] T. J. WHITE, T. BRUNS, S. LEE et J. TAYLOR. "38 - AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS". en. In : *PCR Protocols*. Sous la dir. de Michael A. INNIS, David H. GELFAND, John J. SNINSKY et Thomas J. WHITE. San Diego : Academic Press, jan. 1990, p. 315-322. ISBN : 978-0-12-372180-8. DOI : [10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1) (cf. p. 50).
- [25] Zongzhi LIU, Catherine LOZUPONE, Micah HAMADY, Frederic D. BUSHMAN et Rob KNIGHT. "Short Pyrosequencing Reads Suffice for Accurate Microbial Community Analysis". en. In : *Nucleic Acids Research* 35.18 (sept. 2007), e120-e120. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gkm541](https://doi.org/10.1093/nar/gkm541) (cf. p. 50).
- [26] Rupesh Kanchi RAVI, Kendra WALTON et Mahdieh KHOSROHEIDARI. "MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis". en. In : *Disease Gene Identification: Methods and Protocols*. Sous la dir. de Johanna K. DISTEFANO. Methods in Molecular Biology. New York, NY : Springer, 2018, p. 223-232. ISBN : 978-1-4939-7471-9. DOI : [10.1007/978-1-4939-7471-9_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12) (cf. p. 50).
- [27] R Core TEAM. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2019 (cf. p. 50).
- [28] Benjamin J. CALLAHAN, Paul J. MCMURDIE, Michael J. ROSEN, Andrew W. HAN, Amy Jo A. JOHNSON et Susan P. HOLMES. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". en. In : *Nature Methods* 13.7 (juil. 2016), p. 581-583. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869) (cf. p. 50).
- [29] Frédéric ESCUDIÉ, Lucas AUER, Maria BERNARD, Mahendra MARIADASSOU, Laurent CAUQUIL, Katia VIDAL, Sarah MAMAN, Guillermina HERNANDEZ-RAQUET, Sylvie COMBES et Géraldine PASCAL. "FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution". en. In : *Bioinformatics* 34.8 (avr. 2018), p. 1287-1294. ISSN : 1367-4803. DOI : [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791) (cf. p. 50).
- [30] Christian QUAIST, Elmar PRUESSE, Pelin YILMAZ, Jan GERKEN, Timmy SCHWEER, Pablo YARZA, Jörg PEPLIES et Frank Oliver GLÖCKNER. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools". In : *Nucleic Acids Research* 41.Database issue (jan. 2013), p. D590-D596. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219) (cf. p. 51).
- [31] Rolf Henrik NILSSON, Karl-Henrik LARSSON, Andy F. S. TAYLOR, Johan BENGTSSON-PALME, Thomas S. JEPPESEN, Dmitry SCHIGEL, Peter KENNEDY, Kathryn PICARD, Frank Oliver GLÖCKNER, Leho TEDERSOO, Irja SAAR, Urmas KÖLJALG et Kessy ABARENKOV. "The

- UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications”. en. In : *Nucleic Acids Research* 47.D1 (jan. 2019), p. D259-D264. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022) (cf. p. 51).
- [32] Paul J. MCMURDIE et Susan HOLMES. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data”. en. In : *PLOS ONE* 8.4 (avr. 2013), e61217. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217) (cf. p. 51).
- [33] Jiachao ZHANG, Wenjun LIU, Zhihong SUN, Qihua BAO, Fang WANG, Jie YU, Wei CHEN et Heping ZHANG. “Diversity of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Sourdoughs Collected from Western Region in Inner Mongolia of China”. en. In : *Food Control* 22.5 (mai 2011), p. 767-774. ISSN : 0956-7135. DOI : [10.1016/j.foodcont.2010.11.012](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.012) (cf. p. 59).
- [34] Muhammet ARICI, Gorkem OZULKU, Rusen Metin YILDIRIM, Osman SAGDIC et M. Zeki DURAK. “Biodiversity and Technological Properties of Yeasts from Turkish Sourdough”. In : *Food Science and Biotechnology* 27.2 (déc. 2017), p. 499-508. ISSN : 1226-7708. DOI : [10.1007/s10068-017-0282-0](https://doi.org/10.1007/s10068-017-0282-0) (cf. p. 59).
- [35] Vera FRABERGER, Christine UNGER, Christian KUMMER et Konrad J. DOMIG. “Insights into Microbial Diversity of Traditional Austrian Sourdough”. en. In : *LWT* 127 (juin 2020), p. 109358. ISSN : 0023-6438. DOI : [10.1016/j.lwt.2020.109358](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109358) (cf. p. 59).
- [36] Charlotte URIEN, Judith LEGRAND, Pierre MONTALENT, Serge CASAREGOLA et Delphine SICARD. “Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour”. In : *Frontiers in Microbiology* 10 (fév. 2019). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2019.00201](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00201) (cf. p. 59).
- [37] Luna M. LOOS et Reindert NIJLAND. “Biases in Bulk: DNA Metabarcoding of Marine Communities and the Methodology Involved”. en. In : *Molecular Ecology* (août 2020), mec.15592. ISSN : 0962-1083, 1365-294X. DOI : [10.1111/mec.15592](https://doi.org/10.1111/mec.15592) (cf. p. 59).
- [38] Jacek DUTKIEWICZ, Barbara MACKIEWICZ, Marta Kinga LEMIESZEK, Marcin GOLEC et Janusz MILANOWSKI. “Pantoea Agglomerans : A Mysterious Bacterium of Evil and Good. Part III. Deleterious Effects: Infections of Humans, Animals and Plants”. Anglais. In : *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 23.2 (juin 2016), p. 197-205. ISSN : 1232-1966, 1898-2263. DOI : [10.5604/12321966.1203878](https://doi.org/10.5604/12321966.1203878) (cf. p. 59).
- [39] Gail M PRESTON. “Plant Perceptions of Plant Growth-Promoting Pseudomonas.” In : *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359.1446 (juin 2004), p. 907-918. ISSN : 0962-8436. DOI : [10.1098/rstb.2003.1384](https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1384) (cf. p. 59).

- [40] Agnieszka KUZNIAR, Kinga WŁODARCZYK, Jarosław GRZADZIEL, Malgorzata WOZNIAK, Karolina FURTAK, Anna GALAZKA, Ewa DZIADCZYK, Ewa SKORZYNSKA-POLIT et Agnieszka WOLINSKA. "New Insight into the Composition of Wheat Seed Microbiota". en. In : *International Journal of Molecular Sciences* 21.13 (jan. 2020), p. 4634. DOI : [10.3390/ijms21134634](https://doi.org/10.3390/ijms21134634) (cf. p. 59).
- [41] T O ROZHKOVA, A O BURDULANYUK, O M BAKUMENKO, O M YEMETS, V A VLASENKO, V I TATARYNOVA, V M DEMENKO, O M OSMACHKO, V M POLOZHENETS, L V NEMERYTSKA, I A ZHURAVSKA, A V MATSYURA et S V STANKEVYCH. "Influence of Seed Treatment on Microbiota and Development of Winter Wheat Seedlings". en. In : *Ukrainian Journal of Ecology* (2021), p. 7 (cf. p. 59).
- [42] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Francesca Rita DINARDO, Maria DE ANGELIS et Marco GOBBETTI. "Wheat Endophytic Lactobacilli Drive the Microbial and Biochemical Features of Sourdoughs". en. In : *Food Microbiology* 70 (avr. 2018), p. 162-171. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2017.09.006](https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.006) (cf. p. 59).
- [43] V ME et V MELVYDAS. "Primary Analysis of New Measures against Fungal Diseases of Woody Plants". en. In : *Biologija* 18.1 (2007), p. 4 (cf. p. 59).
- [44] Marianna BESSMELTSEVA, Ene VIIARD, Jaak SIMM, Toomas PAALME et Inga SARAND. "Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation". In : *PLoS ONE* 9.4 (avr. 2014). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0095449](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095449) (cf. p. 60).
- [45] Christopher P. NADEAU, Timothy E. FARKAS, Andrea M. MAKKAY, R. Thane PAPKE et Mark C. URBAN. "Adaptation Reduces Competitive Dominance and Alters Community Assembly". en. In : *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 288.1945 (fév. 2021), p. 20203133. ISSN : 0962-8452, 1471-2954. DOI : [10.1098/rspb.2020.3133](https://doi.org/10.1098/rspb.2020.3133) (cf. p. 60).
- [46] Andrea COMASIO, Marko VERCE, Simon VAN KERREBROECK et Luc DE VUYST. "Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins". In : *Frontiers in Microbiology* 11 (juil. 2020). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2020.01212](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01212) (cf. p. 61).

2.3 Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter

Lucas von Gastrow ^{1,2}, Marie-Noëlle Madec ¹, Victoria Chuat ¹, Stanislas Lubac ³, Clémence Morinière ³, Sébastien Lé ⁴, Sylvain Santoni ⁵, Delphine Sicard ² and Florence Valence ^{1,*}

Article publié dans *Microorganisms*, volume 8, numéro 7, 07/2020.

doi : 10.3390/microorganisms8070982

Affiliations

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

² SPO, University of Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, 34000 Montpellier

³ UBPN, Maison de l'agriculture, GIE Elevages de Bretagne, Rond-Point Maurice Le Lannou, 35042 Rennes CEDEX, France

⁴ Statistics and Computer Science Department, Univ Rennes, Agrocampus Ouest, CNRS, IRMAR - UMR 6625, F-35000 Rennes, France

⁵ AGAP, University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier SupAgro, 34000 Montpellier, France

Correspondence : florence.valence-bertel@inrae.fr

Abstract

Gwell is a traditional mesophilic fermented milk from the Brittany region of France. The fermentation process is based on a back-slopping method. The starter is made from a portion of the previous Gwell production, so that Gwell is both the starter and final product for consumption. In a participatory research framework involving 13 producers, Gwell was characterized from both the sensory and microbial points of view and was defined by its tangy taste and smooth and dense texture. The microbial community of typical Gwell samples was studied using both culture-dependent and culture-independent approaches. *Lactococcus lactis* was systematically identified in Gwell, being represented by both subspecies *cremoris* and *lactis* biovar *diacetylactis* which were always associated. *Geotrichum candidum* was also found in all the samples. The microbial composition was confirmed by 16S and ITS2 metabarcoding analysis. We were able to reconstruct the history of Gwell exchanges between producers, and thus obtained the genealogy of the samples we analyzed. The samples clustered in two groups which were also differentiated by their microbial composition, and notably by the presence or absence of yeasts identified as *Kazachstania servazii* and *Streptococcus* species.

Keywords

fermented milk ; lactic acid bacteria ; sensory evaluation ; *Lactococcus* ; microbial community ; back-slopping

2.3.1 Introduction

Within the huge diversity of fermented milk products, the production of some is based on the use of a natural starter and more particularly related to a specific fermentation practice called back-slopping. Back-slopping is characterized by its simplicity as it only requires a raw material to be transformed and a previous production for inoculation [1]. Because it offers a more reproducible and safer method compared to spontaneous fermentation, back-slopping is used for numerous traditional fermented foods, which include raw milk cheeses, natural wines, sourdough bread or lambic beers ([2, 3, 4, 5, 6, 7]). This method can also be regarded as an intermediate between spontaneous indigenous fermentation and fermentation controlled by selected pure cultures. Spontaneous fermentation can produce variable results because the fermentation process relies on endogenous microflora in the raw materials and environment and therefore on an undefined microbial consortium that may affect the repeatability and stability of the final products. In this context, to improve the control of production, particularly those at a large scale, standardized starters are increasingly being used. Although the use of standardized and selected starters can ensure the reproducibility of production, it also leads to a standardization of the products, with generally a small set of very similar strains being commercialized and used [8]. By contrast, back-slopping enables expression of the typicality associated with the raw material and transformation process but in a controlled manner, the limitation being that in some cases a drift of the final product over time may lead to production defects [7].

Gwell is a specific type of gros-lait, a traditional mesophilic fermented milk originating from the French region of Brittany. Gros-lait was very popular in the early 20th century and was almost only produced at home for self-consumption. Its production decreased gradually until the middle of the 20th century, in parallel with the decline of Bretonne Pie Noir [9], an iconic cattle breed from Brittany, which was replaced by more productive breeds such as Prim'Holstein. The Bretonne Pie Noir breed was almost extinct until a rescue plan was initiated in 1976. Since then, headcounts have increased but are still lower than the threshold below which extinction is no longer a threat. Farmers registered the Gwell trademark in 1993 as designating a gros-lait made of milk from Bretonne Pie Noir cows. By linking the product to the breed, they dedicated their efforts to rescuing both a local cattle breed and a traditional product [10]. As part of their efforts to develop the product, two samples were sent by a producer to a private laboratory for microbiological analysis and *Lactococcus lactis* was identified as the main species. The Gwell making process was quite diverse until the 2000s, but it shared at least two main characteristics : use of the back-slopping method, where a batch of a previous Gwell production is used to inoculate thermized milk, and mesophilic fermentation (where the temperature of the fermentation process enables the development of mesophilic microorganisms, i.e., 20–30 °C). Working together, Gwell

producers specified the recipe in order to obtain a more recognizable product, and specifications were compiled in 2014. A typical production process consists in pasteurizing the milk to 85 °C, cooling it to 35 °C, adding 5% to 10% (v/v) cold Gwell and homogenizing the mix, and then incubating at 30 °C for 3.5 to 6 h. As a result of fermentation by mesophilic lactic flora, the lactose is metabolized into lactic acid that causes a drop in the pH and concomitant clotting of the milk. The resulting curd is then stored at 4 °C before consumption, and it can be used as a ferment for the next production. Despite all the precautions taken, the Gwell can sometimes change quite drastically, leading to a loss of the product. The most frequent problems are the slowing down of acidification and texture or taste defects. The producers then have no choice but to obtain a new Gwell from another producer, which therefore hampers Gwell-driven production. However, these manufacturing accidents offer an interesting model for microbiologists to study the dispersion and resilience of microbial communities.

Various mesophilic fermented milks have been described among dairy products [3] and include Vili in Finland, Dahi in India or Dadih in Indonesia, whose process is similar to that of Gwell [11]. They are obtained after a thermization step of the milk, by inoculation of a previous day production. The more important variations between their processes concern the origin of the milk according to the considered country (cow, buffalo or even yak), and/or the temperature of the thermization step and/or the duration and temperature of incubation during the fermentation step. As Dahi and Dadhi are mainly produced at domestic scale, the detailed process is very hard to determine, in general the incubation is performed at room temperature, the milk is boiled from several minutes to one hour, then cooled before the inoculation step [12]. For Viili, semi industrial scale production mentions a pasteurization step and an incubation step of 20 h at 20 °C. The Viili ecosystem is dominated by lactic acid bacteria (LAB) and more particularly *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* [13, 14]. For Dahi, the bacterial ecosystem comprises several lactic genera : *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Pediococcus* [15], while for Dadih the bacterial ecosystem is dominated by LAB and more particularly *Lactococcus lactis* species [16]. In the traditional French cheese called Pelardon, made from raw goat milk, producers use a natural starter. The milk is indeed inoculated with whey from the previous production and back-slopping practices are also employed. Coagulation is conducted at a low temperature (20 °C), which is quite similar to Gwell. Tormo et al. [5] characterized the bacterial community in these traditional raw goat cheeses using culture-dependent methods and showed that the community is largely dominated by *Lactococcus lactis* species, accounting for 60% of the strains isolated. Traditional raw goat cheese producers sometimes have to deal with a drift of their production related to the decline in the activity of their natural starter, which has the same defects as Gwell [17]. In this context, Gwell offers an interesting model to study the dynamics of the microbial community associated with back-slopping practices and their associated defects.

This study aims at better understanding the Gwell ecosystem, by characterizing in detail the microbial community and analyzing some factors influencing Gwell microbial composition. That would allow the producers to better control the Gwell ecosystem and to avoid Gwell loss accidents. Thus, in the context of a participatory research framework involving almost all Gwell producers (13 out of 15 at the time of

the study), we characterized Gwell from both an organoleptic point of view and in terms of its microbial community, using culture-dependent and -independent methods, following a two-step approach. First, in a selected panel of Gwell samples, we characterized the typicality of Gwell from an organoleptic point of view. We then selected typical Gwell samples in order to isolate and identify the associated microbial community. In a second step, we used metabarcoding to analyze the microbial community in a larger panel of samples so as to obtain an overview of the microbial diversity associated with Gwell exchanges between producers.

2.3.2 Materials and Methods

Gwell Sampling and Data Collection

Gwell samples were collected at two different time points with an 18-month interval between them (May 2017 and November 2018). The first sample batch (denoted “a”) was supplied by the producers for sensory analysis and the samples were then used for culture-dependent microbial characterization. The second sample batch (denoted “b”) was sent by courier and received within 24 h. These samples were used for metabarcoding analysis. The data concerning these samples, and notably Gwell exchanges between producers, were collected using a survey sent in with the samples. These data were completed with semi-structured interviews carried out separately in each farm where we also followed Gwell production. The list of Gwell samples and the respective analyses performed are shown in Table 2.1.

Sensory Evaluation of Gwell

Two-Steps Sensory Analysis In order to define a typical Gwell, generate sensory descriptors and group together Gwell samples perceived as being similar, we performed a two-step sensory analysis. A Gwell was considered to be typical if it was recognized by the producers as being representative of the product per se. During the first step, an expert panel of 15 judges analyzed 10 different Gwell samples. These judges all knew the product and were used to consuming it, representing almost all Gwell producers at the time of the study. A random three-digit code was assigned to each sample. They were anonymized and duplicated in order to quantify the reliability of each panelist’s judgment. Tasting samples were given in a random order and the jury was asked to decide, according to their knowledge of the product, whether they were a typical Gwell or not, taking into account of their organoleptic characteristics. After grouping the samples, they described the common organoleptic properties of both typical and non-typical Gwell. The second step consisted in a Gwell sorting task followed by a verbalization task carried out by a panel of 29 untrained judges who did not necessarily know the product. This second step was carried out four days after the first step using Gwell samples from the same batch. However, two of the ten previously analyzed Gwell samples were discarded : GW11a because coliforms were detected at excessive levels and GW2a because an insufficient quantity was available, so eight samples remained. A random three-digit code was assigned to each sample. Panelists were asked to group together the

samples they perceived as being the most similar, taking account of the characteristics (texture, odor and/or taste) they considered as being important to differentiate the products, according to the method described by Cadoret et al. (2009)[18]. Once the groups had been produced, the panelists were asked to associate specific descriptors with each group (verbalization task). To ensure that the panelists were able to group similar samples, one sample was tested in duplicate.

Tableau 2.1 – List of the 23 Gwell samples studied in this study and respective analysis performed on it. Gwell samples share the same ID when coming from the same producers; a, corresponding to the samples analyzed in the first step of the study; b, corresponding to the samples analyzed during the second step of the study, 18 months later.

| Produ- cer | First Gwell sample collection (may, 2017) | | | | Second Gwell sample collection (november, 2018) | | |
|---------------|---|---------------------|-------|------------------------------------|---|-------------------------|---------------|
| | Gwell sample code | Sensory analysis | | Micro- bial enume- ration | Bacte- rial isola- tion | Gwell sample code | Metabarcoding |
| | | Step1 | Step2 | | | | |
| 1 | GW1a | x | x | x | x | GW1b | x |
| 2 | GW2a | x | - | x | - | GW2b | x |
| 3 | GW3a | x | x | x | - | GW3b | x |
| 4 | GW4a | x | x | x | x | GW4b | x |
| 5 | GW5a | x | x | x | x | GW5b | x |
| 6 | GW6a | x | x | x | x | GW6b | x |
| 7 | GW7a | x | x | x | - | GW7b | x |
| 8 | Gw8a | x | x | x | - | GW8b | - |
| 9 | GW9a | x | x | x | x | GW9b | x |
| 10 | | | | | | GW10b | x |
| 11 | GW11a | x | - | - | - | GW11b | x |
| 12 | | | | | | GW12b | x |
| 13 | | | | | | GW13b | x |
| 14 | | | | | | GW14b | x |

Statistical Analysis All statistical analyses were performed using R 3.6.2. For the first step, we calculated the percentage of times a sample was considered to be typical by the expert panel. Samples that obtained a percentage higher than 50% were considered to be “typical Gwell” that could serve as a reference to describe the product. In order to assess the reliability of these judgements, we also calculated the percentage of times each judge assigned the duplicated samples to the same category. To generate descriptors to characterize Gwell, frequency analysis was performed using the R [19] “FactoMineR” [20]

package on the words used by the tasters to describe the Gwell they judged to be typical and non-typical. These descriptors were cleaned and standardized without interpreting their meaning. A graphic representation was made using “Wordle” online software. We then performed a Multiple Correspondence Analysis (MCA) on the results of the second step using the R “FactoMineR” and “factoextra”[21] packages.

Microbial Enumeration

Enumeration was performed on every sample from the sensory analysis, except for the GW11a sample for which insufficient material was available to perform the analysis. For enumeration, 10 g of mixed Gwell (collected during the first step of the sensory analysis and analyzed the next day) was diluted in 90 g citrate diluent (20 g/L trisodic citrate, pH 7.5) and homogenized in a sterile filter bag (BagPage+, Interscience, France). This initial dilution was then serially diluted in sterile diluent (tryptone 1 g, NaCl 8.5 g, H₂O 1 L, pH 7). 100 µL of the serial dilution was plated on different nutritive and selective media (M17, MRS, PCA, VRBL, KF and OGA ; see list in Table 2.2) using a Spiral system (Interscience, France) and incubated under aerobic and anaerobic conditions, depending on the medium (Anaerocult® A, Merck, Darmstadt, Germany).

Tableau 2.2 – List of the different media and incubation conditions used for the numeration step as well as the isolation of strains.

| Name of the Medium | Composition or reference of the medium | Targeted microorganisms | Temperature of incubation | Condition of incubation (aerobiosis or anaerobiosis) |
|--------------------|--|---|---------------------------|--|
| M17 | Biokar Diagnostic | Mesophilic and thermophilic Lactococcal and streptococcal strains | 30°C or 43°C | O ₂ |
| MRS | Biokar Diagnostic | Mesophilic and thermophilic lactobacilli strains | 30°C or 43°C | O ₂ & CO ₂ |
| VRBL | Difco Laboratories, detroit, MI, USA | Coliforms | 30°C | O ₂ |
| KF | Biokar Diagnostic | Enterococcus | 30°C | O ₂ |
| PCA | Biokar Diagnostic | Mesophilic and aerobic total flora | 30°C | O ₂ |
| OGA | Biokar Diagnostic | Yeast and filamentous fungi | 25°C | O ₂ |

Bacterial Isolation and Phenotypic Sorting

The five Gwell considered as typical on completion of the sensory evaluation were selected to characterize their bacterial diversity. Strains were isolated from the M17, PCA and MRS agar plates used for enumeration, incubated at 30 °C and 43 °C under aerobiosis and anaerobiosis, respectively. Around six colonies of each morphology were isolated from M17 medium, while two or three colonies were isolated from MRS agar plates incubated at 43 °C and from PCA agar plate. The isolates were then sorted according to macroscopic criteria (planktonic growth, widespread or concentrated at the bottom of the culture tube), their ability to ferment ribose and microscopic criteria (cell morphology, bacilli or cocci, length of cocci chains). When several clones isolated from the same samples and with the same combinations of growth media and culture conditions displayed similar microscopic and macroscopic profiles and ribose fermentation profile, only one clone was selected for subsequent identification steps. An enrichment step was added to verify the presence of thermophilic LAB species and particularly thermophile *Streptococci*, which might be present at very low levels. The Gwell samples were inoculated (10% [v/v]) in thermized and skimmed milk incubated at 43 °C, and the resulting samples were then plated on M17 agar plates incubated for 48 h at 43 °C, the resulting colonies being isolated for identification.

Identification and Phenotypic Characterization of Strains

API 50CH—Biochemical Characterization All the selected isolates were subjected to phenotypic characterization in order to determine a profile of their sugar fermentation abilities using API 50CH profiles (API System, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). The fresh culture was centrifuged and the pellets suspended in API medium according to the manufacturer's instructions. The Apilab Plus computer-assisted identification software (API-bioMerieux, Basingstoke, UK ; version 4.0) was used to analyze the carbohydrate fermentation profiles.

Identification of the Biovar *diacetylactis* Strains identified as *Lactococcus lactis* by API gallery were cultured on KCA medium [22] incubated at 30 °C for 3 days. KCA medium makes it possible to distinguish colonies as a function of their ability to use extracellular citrate. A translucent halo appears around a colony when it consumes the surrounding calcium citrate and this means that the strains belongs to the *Lactococcus lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* species.

DNA Extraction for 16S rDNA Sequencing and Species-Specific PCR The total DNA of selected isolates was extracted using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen ref 69504; Hilden, Germany). We followed the manufacture's protocol for Gram positive bacteria, but with two modifications : (i) the 1 mL pellet of pure culture was treated with a lysis buffer containing additional lysozyme and mutanolysin (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 1% Triton X100, 20 mg/mL lysozyme and 50 U/mL mutanolysine) at 37 °C for 1 hour ; (ii) the proteinase K step was achieved at 56 °C for

30 min. DNA concentrations were quantified at a wavelength of 260 nm using a Nanodrop DN-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France).

16S rDNA Sequencing The 16S rDNA gene of one atypical strain was amplified by W001 and W002 primers according to the method described by Godon et al. (1997) using a Thermal Cycler C1000™ (Bio-Rad, Gladesville, Australia). Amplified PCR products were sequenced using the Sanger method by LGC Genomics (Berlin, Germany). The sequences were assembled using VectorNTI software (Invitrogen, Carlsbad, United States) and submitted to the National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI, Bethesda MD, 20894 USA, www.ncbi.nlm.nih.gov). A basic local alignment (BLASTn) was performed to determine by homology the best identification of the isolates.

Species-Specific PCR In order to identify the isolates collected after phenotypic sorting and to differentiate subspecies of *Lactococcus lactis*, the specific primers used for *Lactococcus lactis* were : 5'-TTTGAGAGTTTGGATCCTGG-3' and 5'-GGGATCATCTTTGAGTGAT-3' according to Pu et al. [23] and 5'-TTATTTGAAAGGGGCAATTGCT5514-3' and 5'-GTGAACTTTCCACTCTCACAC-3' for *Streptococcus thermophilus*, according to Forsman et al. [24].

Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE) The clonal diversity of *Lactococcus lactis* was determined by PFGE analysis of the strains after phenotypic sorting. Bacterial cultures and agarose plugs were prepared, as described previously by Lortal et al. [25]. The plugs were equilibrated for one hour in a restriction buffer (CutSmart, New England Biolabs, Beverly, MA, USA) at 4 °C, and were then transferred to a fresh digestion buffer containing 15 units SmaI endonuclease (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) for one hour. The plugs were then incubated at 25 °C for 4 h. PFGE was performed in a Bio-Rad CHEF DRII electrophoretic cell on 1% (w/v) agarose gel (Ultrapur, Gibco-BRL, Inchinnan, Scotland) in 0.5x TBE buffer (45mM Tris, 45mM boric acid, 1mM EDTA, pH 8.0) at 200 V and 14 °C, under the following conditions : initial time—2 s, final time—25 s, total running time—21 h. Strain CIRM-BIA 127 was used as a home-made ladder for this study. After migration, the gels were stained with gelRed, visualized using UV light and then analyzed with GelCompar software (BioNumerics, Applied Math, Austin, TX, USA). Conversion, normalization, and further analysis were performed using the Pearson coefficient and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) cluster analysis with BioNumerics software (Applied Math, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Acidifying Capacity of Strains The strains selected after phenotypic sorting were grown overnight in M17 broth at 30 °C. They were then harvested by centrifugation for 5 min at 5000 g and washed with sterile tryptone water 1% (w/v) (HiMedia Laboratories, Einhausen, Germany). The acidifying curve of LAB was subsequently assayed in sterile UHT skimmed milk incubated at 30 °C (5% [v/v] in 20 mL) using the Cinac system (Ysebaert, Frépillon, France). A positive control was performed with

Gwell samples inoculated at 30 °C (10% [v/v]) in UHT skimmed milk incubated in the same conditions. The pH was recorded every 5 min for 24 h.

Metabarcoding

We analyzed 13 samples in November 2018 by metabarcoding, 18 months after the sensory and microbial analysis. Of the 10 Gwell producers who participated in the first part of this study, nine sent us a sample. Only GW8 did not send a sample as he was no longer producing Gwell. At this stage, four producers joined the research program. All samples were sent by post and frozen at –20 °C on reception.

DNA Extraction DNA was extracted from the Gwell samples using the Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). The samples were diluted 10-fold in 20 g/L citrate solution heated at 42 °C and homogenized in a filter bag (BagPage+, Interscience); 5 mL was then centrifuged at 5000 g for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1.5 mL citrate solution and centrifuged again. The pellet was then resuspended in 400 µL lysis buffer supplemented with 20 g/L lysozyme, 50 U/mL mutanolysine and 500 U/mL lyticase to break down the cell walls. The lysis suspension was incubated for 1 h at 37 °C and then the kit instructions were followed to extract the DNA. 50 µL elution buffer was heated to 70 °C and incubated for 5 min on the membrane before elution, which was performed twice in two different tubes. Eluted DNA was quantified in each tube using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France).

Sequencing on Illumina MiSeq DNA sequences were amplified in the 16S V3-V4 region for bacteria and the ITS2 region for yeasts. The primers used in this study were based on 16SV3V4 Forward-TACGGRAGGCAGCAG and 16SV3V4 Reverse-TACCAGGGTATCTAATCCT for bacteria [26] and ITS2 Forward-CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG and ITS2 Reverse-TTCCTSCGCTTATTGATATGC for fungi [27]. Primers targeting these regions were designed with an Illumina tail. In order to reduce interference during Illumina sequencing, we also added frame-shifts of 4, 6 or 8 random nucleotides for the forward primers and 4, 5 or 6 nucleotides for the reverse primers, between the target sequence and the Illumina tail. All the primers used are listed in Supplementary Materials Table S1. For each forward or reverse primer, an equal mix of the three primers containing the different frame-shifts was added to the PCR mix. For the preparation of multiplexed Illumina libraries, we employed a strategy based on a two-step PCR approach : a first PCR using the locus-specific primers including the Illumina adapter overhang (with 30 cycles), and a second PCR for the incorporation of Illumina dual-indexed adapters (with 12 cycles). Bead purifications were carried out after each PCR step. Quantification, normalization and pooling were carried out before sequencing on Illumina MiSeq [28].

Bioinformatics Analysis Reads were merged using Pear software v. 0.9.11, adapters removed with cutadapt v. 1.12 and Python 2.7.13 and the reads were trimmed with Sickle v. 1.33 with a quality threshold of 20 on a window of 20 nucleotides. The sequences were then analyzed using the frogs

pipeline [29], the Frogs preprocess tool v. r3.0-3.0 being used to dereplicate reads, while clustering was performed using frogs clustering v. 3.0-1.4 with a distance parameter of 3. Chimera were removed with frogs chimera v. 3.0-7.0 and Operational Taxonomic Units (OTU) were filtered on and abundance superior to 0.00005 total abundance. For ITS reads, conserved ITS regions were removed using ITSX v. 1.0.11 and affiliations were assigned to OTUs with frogs affiliation v. 3.0-2.0, using the Unite Fungi database v. 8.0 [30] for ITS and Silva 132 [31] for 16S. Multi-affiliations were partially resolved using frogs affiliation post-process tool v. 3.0-1.0 with identity and coverage parameters of 99.5%. Remaining multi-affiliations were treated by assigning the lowest common taxonomy level to multi-affiliated OTUs. The samples were rarefied to the minimum number of reads for each barcode (89,239 for 16S and 137,468 for ITS2), using the rarefy_even_depth function of the R (v. 3.6.3) phyloseq package v. 1.24.2. The random seed was set at 5907.

A Participatory Research Framework

This study was initiated by the Gwell producers. As well as performing the sensory analysis and submitting their samples and data, they participated in developing the research protocol throughout the study. Meetings with all the producers involved in the study were organized after each step in order to present the results and organize the next analysis. A monitoring committee comprising five Gwell producers followed the study more closely through frequent telephone discussions.

2.3.3 Results

Consensual Descriptors of Gwell Samples Considered to Be Typical

The first step in the sensory analysis consisted in determining from the tested samples those which could be considered as typical Gwell. This was performed by an expert jury whose 15 members knew the product well and consumed it regularly as most of them were Gwell producers. The panelists could be considered to be reliable because they gave the same classification to the duplicated samples on average in 62.5% of cases. The maximum of concordance was 100% for one panelist who gave the same classification to all duplicated samples, while the least reliable panelist gave the same classification to 30% of the duplicates. Four samples (GW6a, GW5a, GW9a and GW1a) were deemed to be typical Gwell by more than 50% of the panelists (53% to 63%). Five samples (GW2a, GW3a, GW4a, GW7a and GW11a) were deemed to be typical Gwell by between 30% to 47% of the panelists, and could not be considered as typical Gwell. One sample (GW8a) was deemed to be typical Gwell by 3.3% of the panelists, and was thus clearly considered as non-typical (Figure 2.7).

The associated descriptors generated are summarized in a wordcloud (Figure 2.8). These descriptors were standardized in 38 different categories so as to enable the statistical analysis. The Gwell judged to be typical were described as having a “tangy taste” by eight panelists, and a “dense” and “smooth” texture by seven and six panelists, respectively, while the non-typical Gwell had a “yogurt taste” and

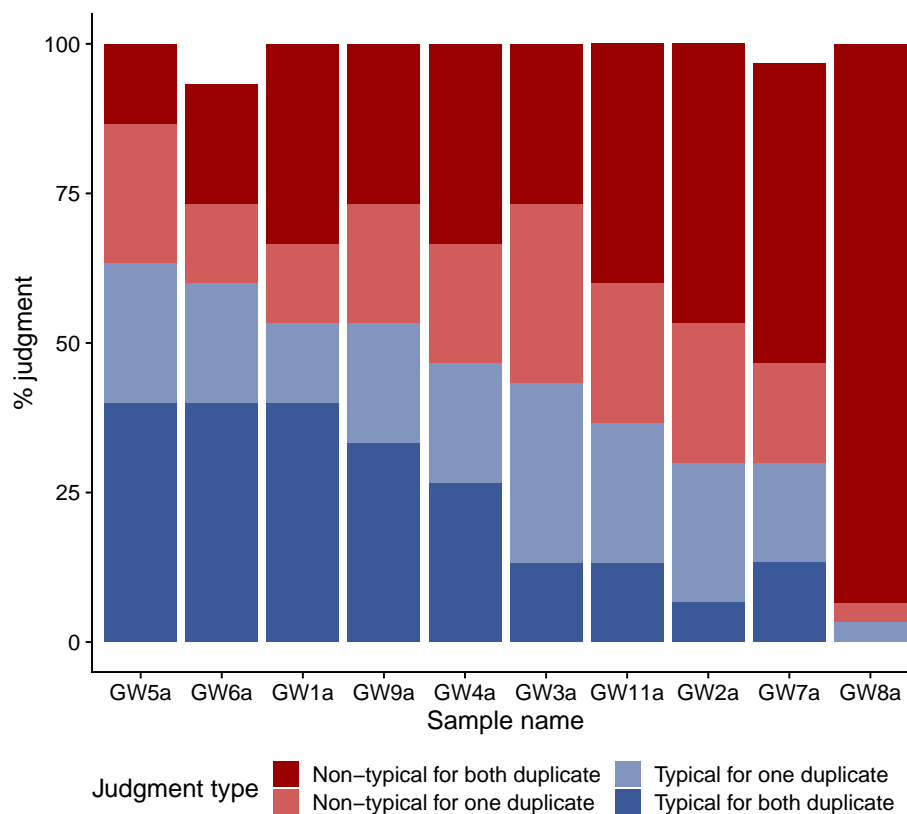
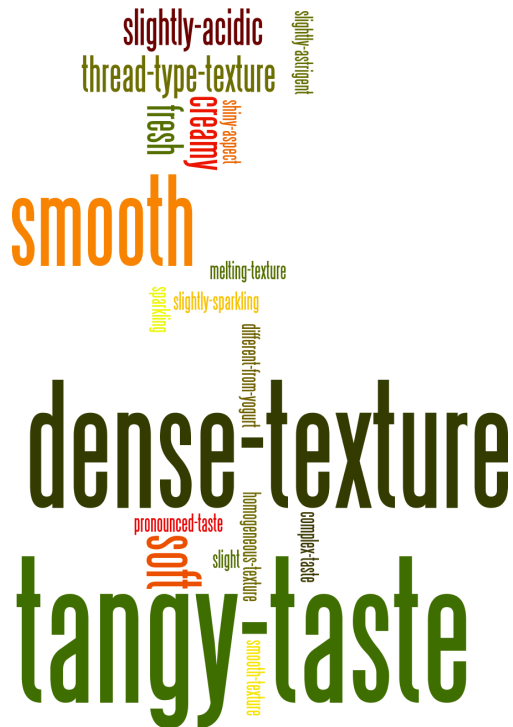


FIGURE 2.7 – Results of the first step of the sensory analysis performed with the expert panel of 15 judges. Bar height represents the percentage of judgements for each category. Dark blue bars represent typical judgments for both duplicate of a sample, light-blue bars typical judgments for one of the two duplicate of a sample, light-red bars non-typical judgements for one of the two duplicate of a sample and dark-red bars non-typical judgements for both duplicate of a sample.

were considered to be “too acidic” by seven and five panelists, respectively.

The second step of the sensory analysis consisted in a sorting task associated with a verbalization task, performed by the jury with 29 members who did not know the product. This revealed a distribution of eight samples in two distinctive groups and one isolated sample, as illustrated by the MCA analysis (Figure 2.9). The two MCA dimensions retained 41.2% of variance, with dimensions 1 and 2 accounting for 20.8% and 20.4% of variance, respectively. More than half of the panelists (57%) associated the duplicated samples in the same group so they were therefore very close on the MCA graph. Dimension 1 discriminated Gwell considered to be typical and non-typical, whereas dimension 2 discriminated the GW4 sample. The larger group comprised five samples (GW1a, GW5a, GW6a, GW7a and GW9a), four of which were considered to be typical according to the first sensory analysis. The second group comprised three samples (GW3a.1, GW3a.2 and GW8a) and contained both duplicated samples of GW3 and the Gwell considered as non-typical (GW8a). The isolated sample (GW4a) considered to be mildly typical during the first sensory analysis, was judged as being different from all other Gwell samples by 14 of the 28 panelists, and was thus clearly separated from both other groups.

(A)



(B)

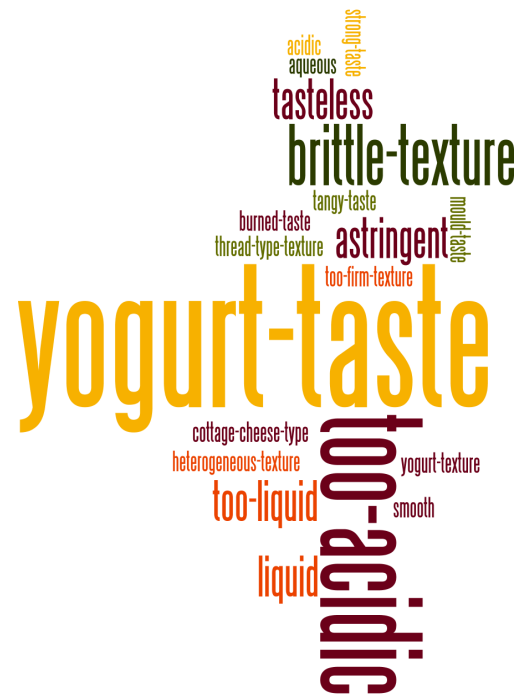


FIGURE 2.8 – Wordcloud of descriptors used for typical and non-typical Gwell. Word sizes are proportional to the number of citations. (A), Gwell considered as typical by panelists; (B), Gwell considered as non-typical by panelists.

Microbial Enumeration of Gwell

The enumeration results regarding nine Gwell on seven different media are presented in Figure 2.10. Lactic mesophilic bacteria enumerated on M17 and MRS media incubated at 30°C largely dominated the ecosystem with levels of 8 to 9 log CFU/mL (Colonies Forming Unit per mL). Yeasts enumerated on OGA were found in four out of ten Gwell (GW4a, GW5a, GW7a and GW10a) at levels between 4 and 6 log CFU/mL, whereas molds also enumerated on OGA were found in every Gwell tested but at lower levels (2 to 4.11 log CFU/mL). Presumptive thermophilic LAB (enumerated on MRS medium incubated at 43 °C under aerobiosis) were detected in seven Gwell samples (GW1a, GW2a, GW3a, GW6a, GW7a, GW8a and GW9a). Presumptive thermophilic *Streptococci* (enumerated on M17 medium incubated at 43 °C under aerobiosis) were detected in three Gwell samples (GW3a, GW2a and GW8a), which were considered to be mildly or non-typical during the first step of sensory evaluation. Gwell samples GW7a and GW2a displayed small quantities of coliforms, with 1.8 and 2.8 log CFU/mL respectively. Yeasts were never detected with thermophilic bacteria grown on MRS at 43 °C; only the GW7a sample contained both types of microorganisms. None of the Gwell considered as typical contained thermophilic *Streptococci*; either thermophilic lactic acid bacteria or yeasts were found, but never both.

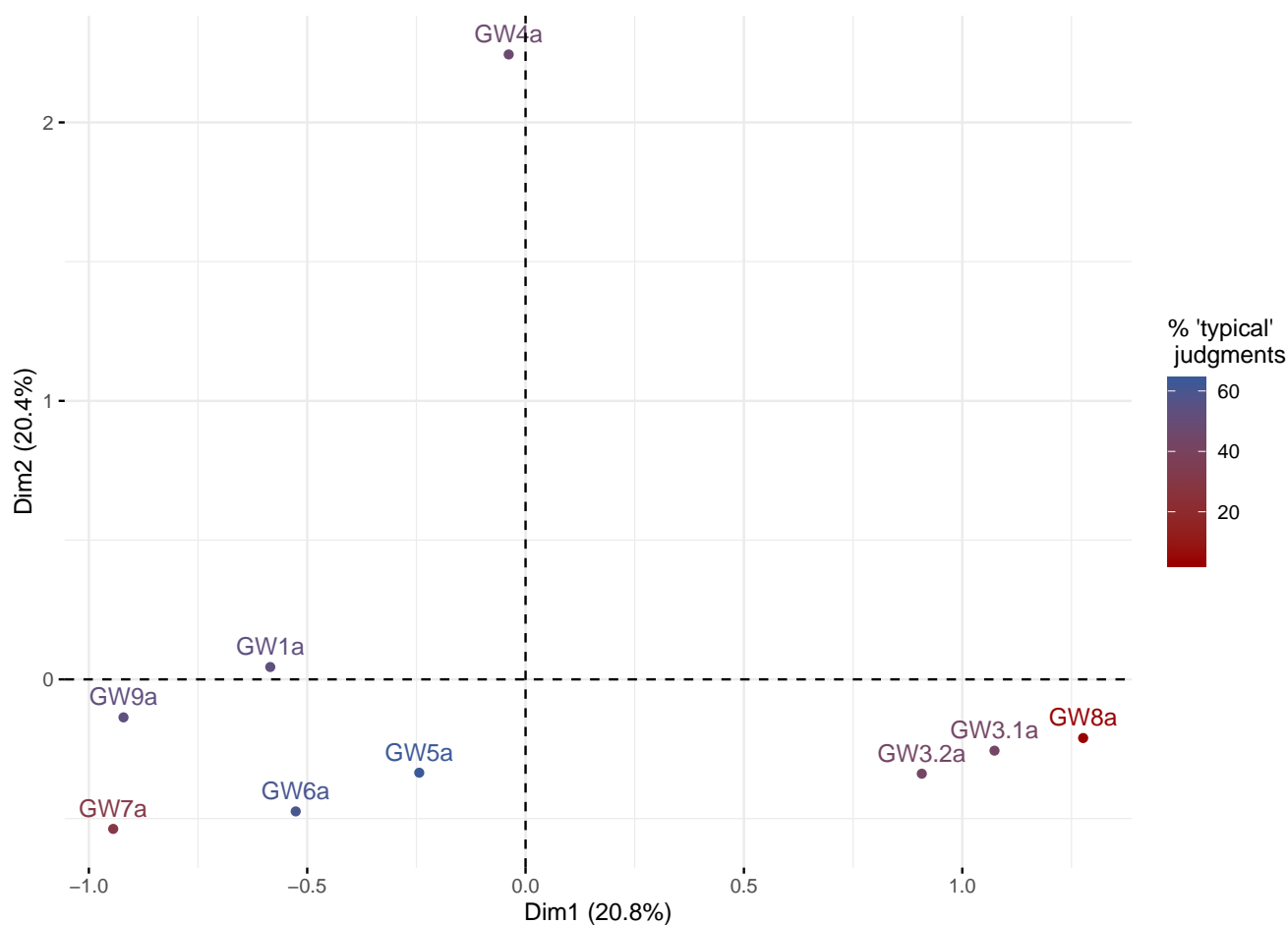


FIGURE 2.9 – Multiple Correspondence Analysis of the Gwell sorting task performed by the non-expert jury. Each sample is colored according to the percentage of times it had been considered to be typical during the previous analysis.

Gwell considered as non-typical could contain either thermophilic *Streptococci* or coliforms. The GW8a sample, which was unanimously considered as non-typical, displayed a different microbiological profile. This sample contained 8.9 times more *Lactococci*, and 50 times more thermophilic *Streptococci* and molds compared to the mean of other Gwell samples.

Selection of Five Gwell Samples for the Culture-Dependent Characterization of Lab Diversity

By combining the sensory and enumeration results, five Gwell samples, GW1a, GW4a, GW5a, GW6a and GW9a, were selected for the characterization of LAB diversity using culture-dependent methods. These five samples shared the following characteristics : they were judged as typical at a threshold superior or close to 50% and levels of mesophilic LAB ranging from 8.1–8.9 log CFU/mL and possibly also yeasts at a level of around 5 log CFU/mL, but no streptococci or coliforms.

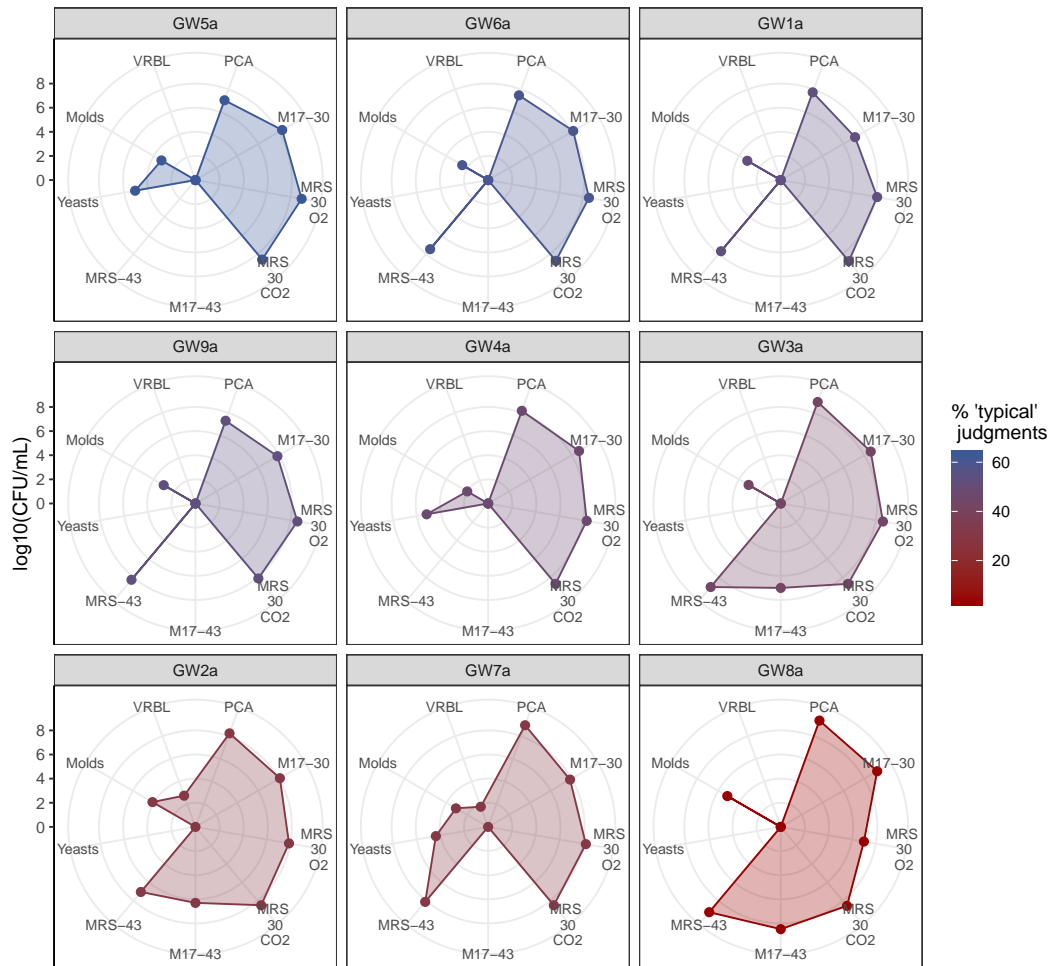


FIGURE 2.10 – Radar graph of microbial counts. Each radar axis shows the enumeration results expressed in log CFU/mL for one medium. The name of each medium is followed if necessary by the incubation temperature (30 °C or 43 °C), and the aerobic (O₂) or anaerobic (CO₂) conditions applied. Yeasts and molds were cultured on OGA medium. All radar axes had the same scale. Samples are ordered and colored according to the typicality score obtained during the first sensory analysis.

Characterization of LAB Diversity

Selection and identification of isolates representative of LAB diversity For the five previously selected Gwell samples, 100 clones were picked from the M17 and MRS agar plates. In order to eliminate duplicated clones, they were subjected to a sorting task according to their macroscopic and microscopic characteristics as described in Materials and Methods. They were discriminated in terms of their colonies, planctonic growth and cell morphology. Strains isolated from the same medium and having similar macroscopic and microscopic characteristics were considered to be identical; 26 different strains were thus selected as a result of sorting (Table 2.3).

Following the enrichment step, it was found that 23 isolates came from cultures under mesophilic conditions and three from thermophilic conditions after the enrichment step. Among the 23 mesophilic

Tableau 2.3 – Identification results obtained for the 26 strains isolated from the typical Gwell samples.

| Gwell sample | clone ID | API strips profile | Species-specific PCR identification | KCA positive strains | PFGE profile type | Validated identification |
|--------------|----------|--------------------|--------------------------------------|----------------------|-------------------|---|
| GW1 | B | - | - | - | - | <i>Staphylococcus warneri</i> (Identified by 16S sequencing) |
| | Q | 2 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P13 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | C | 2 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P13 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | R | 13 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P10 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | D | 4 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P15 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | A | 12 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P6 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | GW1 | - | <i>S. thermophilus</i> | - | - | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| GW4 | F | 9 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P2 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | S | 11 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P3 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | E | 5 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P14 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| GW5 | H | 6 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P11 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | I | 4 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P1 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | U | 6 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P12 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | Jp | 9 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P4 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | Jg | 9 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P5 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | V | 11 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P4 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | G | 4 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P1 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| GW6 | L | 8 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P7 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | M | 7 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P13 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | K | 3 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P13 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | GW6 | - | <i>S. thermophilus</i> | - | - | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| GW9 | W | 10 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P9 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | P | 3 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P13 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | N | 9 | <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i> | Yes | P8 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> |
| | O | 1 | <i>L. lactis</i> sp. <i>cremoris</i> | No | P15 | <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>cremoris</i> |
| | GW9 | - | <i>S. thermophilus</i> | - | - | <i>Streptococcus thermophilus</i> |

strains, 22 were identified as a function of their metabolic sugar fermentation abilities using API 50CH profiles. Ten strains were identified as *Lactococcus lactis* sp. *lactis*, 12 as *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* (with a total for both subspecies of 13 different API profiles). One strain was identified as *Staphylococcus warnerii* by rDNA 16S sequencing. All the *Lactococcus* strains also underwent species-specific PCR in order to confirm the identification results. The three thermophilic strains were identified as *Streptococcus thermophilus* using species-specific PCR. All the results are summarized in Table 2.3.

The culture of *Lactococcus* strains on KCA medium revealed that all the *L. lactis* sp. *lactis* isolated were citrate positive, which means that all *L. lactis* sp. *lactis* belonged to the biovar *diacetylactis*. PFGE profiles were determined for the 22 *L. lactis* strains in order to evaluate intra-species genetic diversity. Fifteen different patterns were obtained and revealed a high level of intra-species diversity for both subspecies. Nine different PFGE patterns were identified for the ten *L. lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* strains and six for the 12 *L. lactis* sp. *cremoris* strains. Isolates displaying the same API & PFGE profile and isolated from the same Gwell sample were considered to be a single strain. This was the case for isolates Q&C (GW1a samples) and I&G (GW5a samples). Thus among the 22 *L. lactis* isolates sorted, 20 could be considered as single strains. The same PFGE profile was found in two different Gwell samples (GW6a and GW9a) associated with the K and P strains, respectively, and they also shared the same API pattern, so both isolates very probably corresponded to the same strain. We also noted that the same PFGE pattern could correspond to different API patterns; for example, strains D and O shared the PFGE pattern P15 but varied in terms of three different substrates on the API pattern, so those isolates could therefore be considered as different strains with different functionalities. Among the five Gwell samples analyzed, GW5a displayed the highest level of diversity in terms of the number of strains (six different strains) associated with four different API patterns and five different PFGE patterns.

Acidifying Capacity of *Lactococcus lactis* Strains The milk acidifying capacity was measured for all *Lactococci* strains (Figure 2.11). Two groups could easily be distinguished: one fast-acidifier group, containing only sup-species *cremoris* strains, and a slow-acidifier group containing all subspecies *lactis* biovar *diacetylactis* strains and four *cremoris* strains with an intermediary acidification phenotype (O, U, H and K strains). The mean acidification rate between 0 and 5 h was 0.18 (standard deviation = 0.069) u.pH/h for *cremoris* strains and 0.08 (sd = 0.0078) u.pH/h for *lactis* strains, and the mean final pH after 24 h was 4.44 (sd = 0.48) for *cremoris* strains and 5.18 (sd = 0.080) for *lactis* strains. *S. thermophilus* strains displayed similar acidifying capacities for the three isolated strains, with an acidifying rate that was intermediate between *lactis* and *cremoris* strains at 0.10 (sd = 0.016) u.pH/h.

Culture-Independent Characterization of Gwell Microbial Communities

The 13 Gwell samples collected in the second test batch were analyzed using the metabarcoding approach in order to obtain an overview of the bacterial diversity associated with Gwell and to supplement

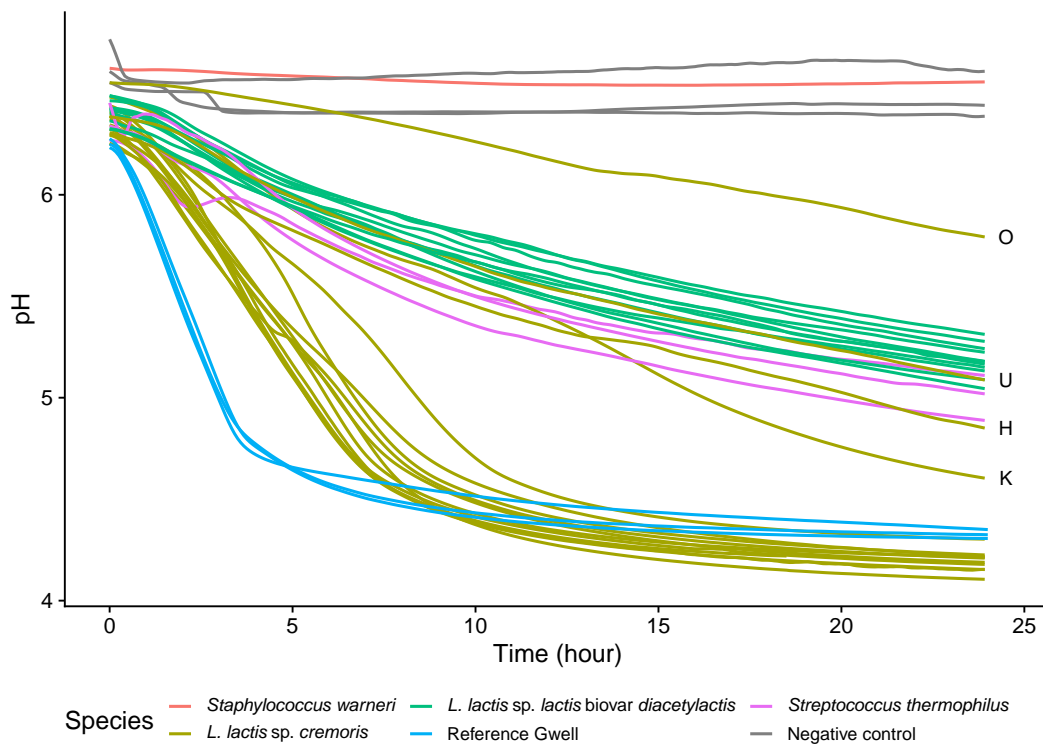


FIGURE 2.11 – Acidification curves for the 26 isolated and selected strains inoculated (5% [v/v]) in sterilized skimmed milk incubated at 30 °C for 24 h. The pH curves are colored according to the species. Acidification curves of reference Gwell are shown in blue. Atypical slow-acidifier *L. lactis* sp. *cremoris* strains are labeled with their clone ID letter.

our results obtained using a culture-dependent approach. Each producer whose Gwell was analyzed using the culture-dependent method submitted a sample, except for GW8 who had meanwhile stopped producing Gwell.

The results are presented in Figure 2.12 B,C. We obtained between 89,239 and 113,555 reads for 16S and between 137,468 and 180,774 reads for ITS2 sequencing. The mean Shannon indices were 1.04 (sd = 0.57) and 0.15 (sd = 0.22) with 16S and ITS2 sequencing, respectively. After filtering only Operational Taxonomic Units (OTUs) accounting for more than 0.5% of sample abundance, thus retaining more than 96% of reads for bacteria and 99.5% of reads for fungi, the mean numbers of species per sample were 4.53 and 1.40 for bacteria and fungi, respectively. *Lactococcus lactis* was found in every sample and it was the most abundant species. Three OTUs belonging to the genus *Lactococcus* could not be identified at the genus level. Two *Streptococcus* species were identified in eight samples : *S. salivarius* and *S. salivioxodontae*. The *Streptococcus salivarius* OTU corresponds to the subspecies *thermophilus*, which is synonymous with *Streptococcus thermophilus* (Farrow and Collins, 1984). *Lactobacillus helveticus* was detected in two samples and *Lactobacillus acidophilus* in one. *Geotrichum candidum* was the only filamentous fungal species to be identified ; it was found in all samples and was by far the most abundant fungal species. Concerning yeasts, *Kazachstania servazii* was detected in three samples (GW4, GW5 and GW10) and *Yarrowia lipolytica* in only one sample (GW7b). As for intraspecific diversity, we found a total of eight *Lactococcus* OTU and five *Streptococcus* OTU. The mean numbers of *Lactococcus*

and *Streptococcus* OTU per sample were both 3.51 (Supplementary Table S2). The most abundant *L. lactis* OTU was found in every sample. The five less abundant *Lactococcus* OTUs were found in one to five different samples. Interestingly, two other *Lactococcus* OTUs were only found in the eight Gwell (GW1b, GW2b, GW3b, GW6b, GW9b, GW12b, GW13b and GW14b) that contained *Streptococcus*. We detected one *G. candidum* and one *K. servazii* OTU across all samples.

The History of Gwell Exchanges between Producers Explains Their Microbial Composition

When they start a new production or have lost their Gwell ferment, producers obtain their ferment from one of their colleagues. By integrating the history of ferment exchange data between producers, we were able to draw a genealogy for Gwell (see Figure 2.12A). Two clusters could be distinguished based on Gwell exchanges and the times of in-farm differentiation. Cluster 1 grouped nine Gwell whose common ancestor was a Gwell from producer GW9. Cluster 2 comprised four Gwell that all derived from GW16 production. All samples containing *S. thermophilus* were in cluster 1, and only GW7b (which had diverged from GW9b 17 months before analysis) did not have it. The GW5b and GW11b samples in cluster 2 were the only ones to contain *Lactobacillus helveticus*, whose abundance was higher in GW11b than in its parent GW5b. The GW4b, GW5b and GW10b samples all contained the same *K. servazii* OTU, which was consistent with the common origin of these Gwell. This species was not detected in GW11b even though it had only diverged from the GW5b Gwell ten days prior to the analysis, indicating that it had undergone a maximum of four back-slopping processes since the GW11 producer received his ferment from GW5.

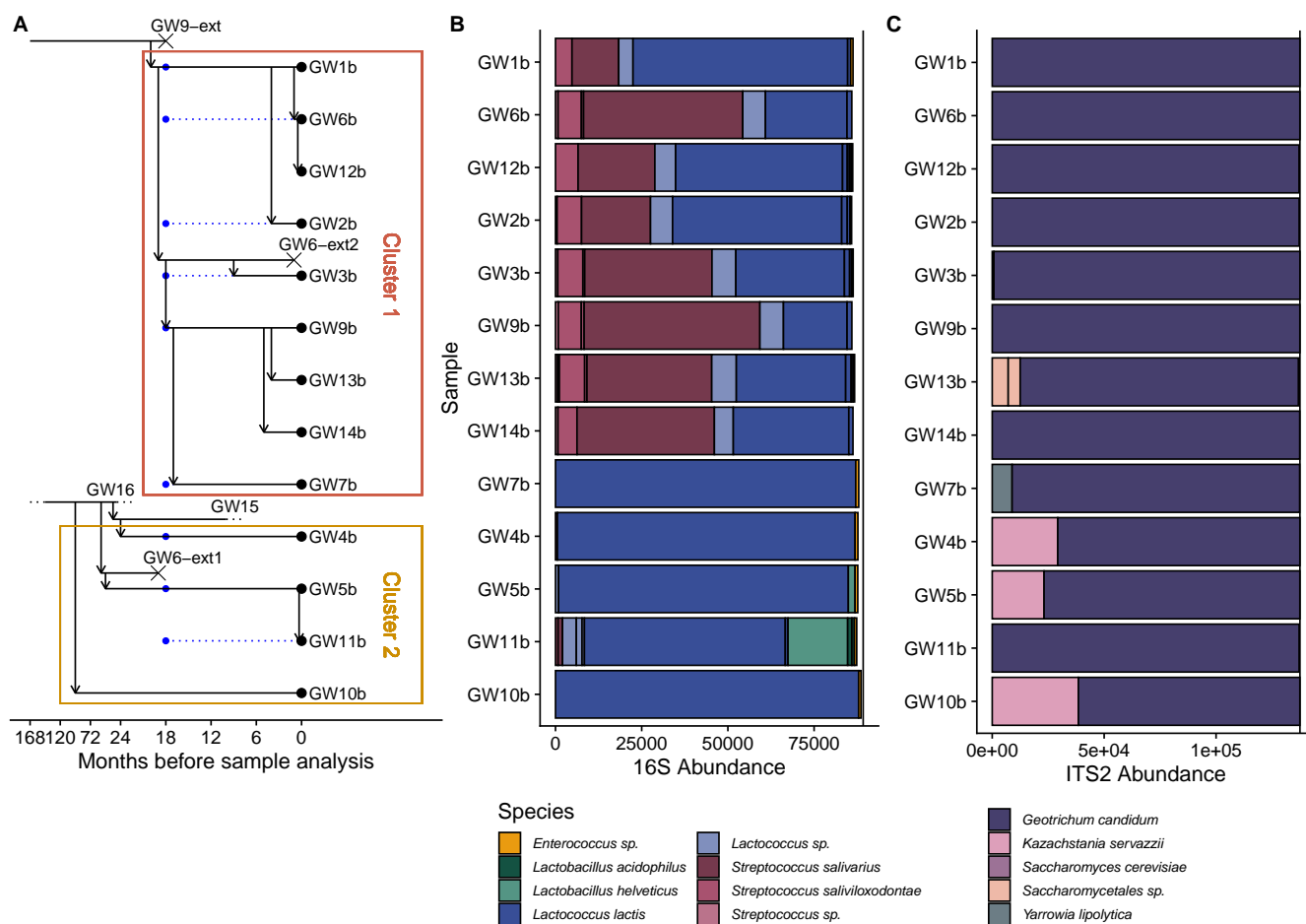


FIGURE 2.12 – History of ferment exchanges and species identified in Gwell using 16S and ITS2 metabarcoding. **(A)** Gwell exchange diagram. The horizontal axis represents the time in months. The scale has a 6-month step between 0 and 24 months, and a 48-month step between 24 and 168 months. Horizontal lines represent the period of time during which each producer continuously back-slopped his Gwell. A vertical arrow pointing from producer X to producer Y represents the acquisition of a ferment by producer Y from producer X. Samples that were analyzed during this study are symbolized by a point. Blue points represent Gwell that were analyzed using culture-dependent methods and black points represent samples that were analyzed with culture-independent methods. Gwell that became extinct are marked with a cross and labeled “ext” after the producer’s name. **(B,C)** Abundance of species identified by 16S V3V4 and ITS2 regions, respectively. All Operational Taxonomic Units (OTUs) whose abundance was lower than 0.5% of total sample abundance were discarded, and only the five most abundant species are shown. Species are differentiated by color and black lines inside the bars delimit different OTU. The vertical line represents the total rarefied sample abundance.

2.3.4 Discussion

The first step in this study consisted in defining a typical Gwell and describing it from an organoleptic point of view, so that its microbial composition could then be analyzed. Because the product had not previously been precisely characterized and production processes could still be quite diverse, we wanted to ensure that we studied samples that were representative of what the product should be. The study therefore enabled farmers to define consensual descriptors of their product, which constituted an important step in their collective efforts to revive this traditional fermented milk, while at the same time offering us an opportunity to document its microbial composition and the effects of exchanges

between farmers.

Microbiological Characterization of Gwell

The analysis of microbial composition permitted by cultures on selective media revealed that *L. lactis* and a fungus with the morphology of *G. candidum* were found in all the samples. Studies performed by a private laboratory had already identified both *L. lactis* and *S. thermophilus* in Gwell [32]. Species diversity was low in all samples. Indeed, even with stringent filters retaining only the most abundant OTU and the five most abundant species, we recovered almost all reads in every sample (more than 99.5% for fungi and more than 96% for bacteria). It is relevant to apply the concepts developed in ecology and community assembly to understand this observation. Gänzle et al. showed for another fermented product, sourdough, that selection was the principal evolving force that determines microbial composition [33], thus explaining the low level of species diversity by competitive exclusion. As Gwell is produced using a similar process of back-slopping, we can suppose that the same explanation applies. Moreover, dispersal is presumably even lower insofar as Gwell is produced using pasteurized milk. This means that the only source of microorganisms inoculated in addition to the ferment is the processing environment via the equipment used and the atmosphere. Although at relatively low levels, *G. candidum* was found in all the samples analyzed, using both culture-dependent and culture-independent approaches. Of the 13 producers who participated in the study, 12 produced cheese containing *G. candidum* in the same room as that used for Gwell (data missing for one producer). This mold probably arises from cross-contamination between production runs and may be stably selected at a low level throughout successive back-slopping procedures, or always reinoculated into Gwell from the production environment. The five Gwell samples considered to be typical were analyzed further using a culture approach. Their ecosystem was largely dominated by *Lactococcus lactis* with both subspecies *lactis* biovar *diacetylactis* and *cremoris*. This species is found in other back-slopped mesophilic fermented milks throughout the world. For example, it has been detected in Viili, which is very similar to Gwell in terms of the technologies employed, involving back-slopping inoculation and mesophilic fermentation. Its microbial composition is very close to that of Gwell, with strains of *L. lactis* sp. *cremoris*, *L. lactis* sp. *lactis* and *G. candidum* dominating its microbial ecosystem. The main difference is that all subspecies *lactis* belong to the biovar *diacetylactis* in Gwell, whereas some strains were identified as subspecies *lactis* but not biovar *diacetylactis* in Viili [13]. Both subspecies of *L. lactis*, *lactis* and *cremoris*, have also been identified in back-slopped goat cheese and in goat's milk from different regions of France where they represent the dominant bacterial population [5]. In their study, the authors found a predominance of *lactis* subspecies strains which accounted for 80% of the *L. lactis* strains isolated when compared to *cremoris*. The *L. lactis* species has also been identified as the principal LAB species in the South African and Indian fermented milks aMasi, Dahi and Dadhi, whose technologies are very similar to Gwell [16, 34, 35]. The two subspecies were distinguished using metabolic and molecular tests and displayed different characteristics. *L. lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* produced volatile compounds that are generally associated

with aroma and flavors [36]. Using GC-Mass Spectrometry analysis, we confirmed that the subspecies *lactis* biovar diacetylatics produced diacetyl and aroma-related compounds whereas subspecies *cremoris* did not; these aroma-related compounds were also found in all the Gwell samples analyzed (data not shown). The presence of *S. thermophilus* in Gwell samples was revealed by both metabarcoding analysis and culture-dependent analysis in some samples; this was quite surprising since the mesophilic technology used for this product should disadvantage the growth of thermophilic LAB. However, it could be explained by cross-contamination from yogurt or cheese production, which is performed in parallel by most of the Gwell producers.

Microbial Composition of Typical and Non-Typical Gwell

Gwell judged as typical never contained coliforms or thermophilic streptococci. Moreover, Gwell deemed to be non-typical were described as having a yogurt taste. *S. thermophilus* is a LAB species that is used to produce yogurt [37] and it was identified in typical Gwell samples following an enrichment step. We can hypothesize that the thermophilic streptococci identified in non-typical Gwell were *S. thermophilus* and were present at excessively high levels, thus giving it a yogurt taste. *Streptococcus* species were however identified by metabarcoding on 16S V3V4 rDNA in eight out of 13 samples, sometimes with a greater abundance than that of *L. lactis*. The differences observed in the composition of microbial species may probably only partly explain the sensory differences seen between typical and non-typical products. The production process is an important factor determining the organoleptic properties of fermented milks [38]. For example, the fermentation temperature may determine the quantity and quality of exopolysaccharides [39] or aroma [40] produced by LAB, thereby influencing the texture and taste of Gwell. Variations in the fermentation temperature occur between producers as they use different systems to maintain temperature during fermentation. Some use professional grade or homemade ovens with temperature control, while others use isothermal recipients that only maintain the initial temperature. This factor could be more important than differences in the microbial species composition of Gwell to explain their organoleptic differences.

The Evolution of Gwell over Time and Exchanges between Producers

We were able to identify two Gwell clusters based on Gwell exchanges where the microbial composition was markedly homogeneous in each cluster. In cluster 1, *Streptococcus* species were found in all but one sample and yeasts in only one, whereas in cluster 2, yeasts were identified in all but one sample and no *Streptococcus* species were found. The main *L. lactis* OTU was shared among all samples, but cluster 1 had two specific OTUs that were not found in cluster 2. These results were consolidated by PFGE analysis of the isolated strains, and indeed the PFGE profile P14 was found in GW1a, GW6a and GW9a, which all belonged to cluster 1 while it was not found in GW4a and GW5a which were part of cluster 2. The microbial composition of Gwell is thus highly conserved throughout Gwell exchanges and over time. *S. thermophilus* was also maintained throughout the Gwell exchanges. It was detected

in all the samples in cluster 1, the only exception being GW7b, which diverged for 17 months from GW9b. It did not contain *S. thermophilus* but a yeast was detected, so a different environment may have modulated the microbial community. Yeasts were found in both typical and non-typical Gwell. The three Gwell (GW4a, GW5a and GW7a) in which yeasts were detected using culture-dependent methods in the first analysis were continuously back-slopped by the producers until collection of the sample for the culture-independent analysis 18 months later. Yeasts were still found in these samples at an abundance ranging from 8000 to 38,000 reads, for a total of 137,000 reads per sample. They were identified as the same OTU of *K. servazii*, suggesting that this yeast stably colonized the ecosystem. This species had already been identified in various fermented foods, including beer [4], or sourdough [41, 42]. The *Kazachstania* genus is often detected in the sourdough used for bread production [41] and can also be found at low levels in grape must where it may be involved in the formation of wine aroma [43]. More generally, however, it has been associated with spoilage in dairy fermented products and more specifically cheese [44] although *K. servazii* was nevertheless found at a significant level in camembert-like cheese by Mei et al. [45]. The presence of yeast was probably specific to the producer's practices as *K. servazii* were detected in the GW5b sample but are not recovered in that GW11b sample that had come from the GW5 sample back-slopped for 10 days (fewer than four successive back-slopping processes). These yeasts had probably been counter-selected by the technological process used by GW11.

Gwell Loss

This study may help us to understand the dynamics of Gwell in the context of regular back-slopping over a long period of time. Indeed, producers sometimes experience slowed-down acidification, leading to the loss of their ferment as it cannot be used safely to inoculate the next production run. According to our results, this reduction in acidification rate could be explained by a drop in the number of *cremoris* subspecies strains, as they acidify milk faster than *lactis* strains. Several hypotheses might explain a decrease in a specific strain population, for example a phage attack. Phage attacks have been reported during the production of many fermented milks [46]. Community susceptibility to phages is dependent on the diversity of their host resistance mechanisms [47]. We were unable to assess this diversity, but we observed between two and five different PFGE profiles of *Lactococcus lactis cremoris* in the same Gwell. Different *Lactococcus* OTUs could be identified by metabarcoding on the 16S rDNA V3V4 region, even though this region is highly conserved. These observations suggest that different *Lactococcus lactis* lineages coexist in a Gwell sample. If different *L. lactis* sp. *cremoris* strains with different resistance mechanisms coexist, then phages could not be a threat to the Gwell ecosystem. Another hypothesis concerns the dynamic balance between the two subspecies, with sp. *lactis* out-competing sp. *cremoris* and causing a reduced acidification rate. A loss of Gwell could also be explained by a loss of sp. *lactis*, or even *G. candidum* if a mechanism of nutritional exchanges exists between them and sp. *cremoris*, as has been demonstrated between *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* in yogurt [48]. Abiotic factors controlled by the production process, such as the fermentation or conservation temperatures or the

frequency of back-slopping, and biotic factors such as the inoculation rate, may also affect the respective proportions and activity of the different species in a Gwell microbial community and thus explain its evolution over time. Interactions between *sp. lactis*, *sp. cremoris*, *G. candidum* and their environment need to be studied in order to understand how and whether they can coexist over the long-term in the Gwell ecosystem.

2.3.5 Conclusions

During this work, participatory sensory analysis was able to produce a consensual definition of the organoleptic properties of a typical Gwell. We identified *L. lactis* as the main species in the Gwell ecosystem, with both subspecies systematically being associated : *L. lactis sp. cremoris* and *L. lactis sp. lactis* biovar *diacetylactis*. *G. candidum* was also identified in all the samples. Using complementary metabarcoding experiments, we identified two separate Gwell lineages by reconstructing the history of Gwell exchanges. We showed that each lineage had a different microbial composition, with the presence of *K. servazii* and *S. thermophilus* depending on the lineage considered. Describing the microbial community in Gwell enabled us to formulate the hypothesis that episodic losses of the product are caused by an imbalance between *L. lactis sp. cremoris* and *L. lactis sp. lactis*, and possibly *G. candidum*. The next stage in this study will therefore consist in identifying factors that influence the development of both *L. lactis* subspecies in the Gwell ecosystem.

Author Contributions

Conceptualization, F.V., M.-N.M., C.M., S.L. (Stanislas Lubac) and L.v.G. ; methodology, M.-N.M., F.V., V.C. and S.S. ; formal analysis, S.L. (Sébastien Lé) and L.v.G. ; investigation, L.v.G., M.-N.M. and V.C. ; resources, L.v.G., M.-N.M. and V.C. ; writing—original draft preparation, L.v.G. and F.V. ; writing—review and editing, F.V., L.v.G., M.-N.M., V.C., S.L. (Stanislas Lubac), and D.S. ; visualization, L.v.G. and F.V. ; supervision, F.V. and D.S. ; project administration, F.V. ; funding acquisition, C.M., S.L. (Stanislas Lubac) and F.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the European Commission (DG Agriculture and Rural Development) under the second Preparatory action on EU plant and animal genetic resources in agriculture (2016 – 2018)

Acknowledgments

We would like to thank Anne Thierry for her advice and support with respect to the sensory analysis, and all the farmers who participated in this study by giving their time, elaborating the research protocol and supplying us with samples. We are also grateful to Diego Segond for his advice in DNA quantifications, to Olivier Rué for writing the original script for the metabarcoding analysis and to Frédéric Bigey for his help in adapting it to our data.

Conflicts Of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Conclusion du chapitre

J'ai montré dans ce chapitre que les échanges de matière première entre boulangers ne sont pas susceptibles de modifier drastiquement la composition microbienne de leur levain, on ne trouve en effet que dans de très rares cas des ASV identiques entre la farine et le levain. Je me suis également intéressé à la dispersion de communautés microbiennes entières. La composition d'une communauté microbienne est conservée lors d'échanges de ferments entre producteurs, comme cela a été observé dans un unique cas de don de levain, ainsi que dans la composition microbienne des différentes lignées de Gwell. La dispersion de microorganismes dans le levain, ou de communautés entières dans le cas du Gwell a donc un effet limité sur la composition des communautés microbiennes. Je m'intéresse dans le chapitre suivant à l'effet de la sélection par les pratiques des producteurs sur la dynamique des communautés microbiennes.

Bibliographie

- [1] W.H. HOLZAPFEL. "Use of Starter Cultures in Fermentation on a Household Scale". en. In : *Food Control*. Fermented Food Safety 8.5 (oct. 1997), p. 241-258. ISSN : 0956-7135. DOI : [10.1016/S0956-7135\(97\)00017-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00017-0) (cf. p. 69).
- [2] W. H. HOLZAPFEL. "Appropriate Starter Culture Technologies for Small-Scale Fermentation in Developing Countries". en. In : *International Journal of Food Microbiology*. Small-Scale Fermentation in Developing Countries 75.3 (mai 2002), p. 197-212. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/S0168-1605\(01\)00707-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00707-3) (cf. p. 69).
- [3] J.P. TAMANG et K. KAILASAPATHY. *Fermented Foods and Beverages of the World*. CRCNET Books. CRC Press, 2010. ISBN : 978-1-4200-9496-1 (cf. p. 69, 70).
- [4] Freek SPITAELS, Anneleen D. WIEME, Maarten JANSSENS, Maarten AERTS, Heide-Marie DANIEL, Anita VAN LANDSCHOOT, Luc DE VUYST et Peter VANDAMME. "The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer". In : *PLoS One* 9.4 (avr. 2014). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0095384](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384) (cf. p. 69, 89).
- [5] Hélène TORMO, Djamila ALI HAIMOUD LEKHAL et C. ROQUES. "Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat Milk and Effect of Farming Practices on the Dominant Species of Lactic Acid Bacteria". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 210 (oct. 2015), p. 9-15. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002) (cf. p. 69, 70, 87).
- [6] Peter R. STERNES, Danna LEE, Dariusz R. KUTYNA et Anthony R. BORNEMAN. "A Combined Meta-Barcoding and Shotgun Metagenomic Analysis of Spontaneous Wine Fermentation". In : *Gigascience* 6.7 (juin 2017), p. 1-10. ISSN : 2047-217X. DOI : [10.1093/gigascience/gix040](https://doi.org/10.1093/gigascience/gix040) (cf. p. 69).
- [7] Yann DEMARIGNY et Pauline GERBER. "Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread". en. In : *Food and Nutrition Sciences* 05.17 (2014), p. 1679-1691. ISSN : 2157-944X, 2157-9458. DOI : [10.4236/fns.2014.517181](https://doi.org/10.4236/fns.2014.517181) (cf. p. 69).
- [8] John G GIBBONS et David C RINKER. "The Genomics of Microbial Domestication in the Fermented Food Environment". en. In : *Current Opinion in Genetics & Development* 35 (déc. 2015), p. 1-8. ISSN : 0959437X. DOI : [10.1016/j.gde.2015.07.003](https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003) (cf. p. 69).

- [9] Armelle LEBORGNE. *Étude Géographique et Socio-Historique Du Gros Lait*. 1998 (cf. p. 69).
- [10] Clémence MORINIÈRE. "Quand la valorisation alimentaire encourage la conservation d'une race: le cas de la race bretonne pie-noir". fre. In : *Ethnozootechnie* 103 (2017), p. 13-18. ISSN : 0397-6572 (cf. p. 69).
- [11] Chandra Utami WIRAWATI, Mirnawati Bachrum SUDARWANTO, Denny Widaya LUKMAN, letje WIENTARSIH et Eko Agus SRIHANTO. "Diversity of Lactic Acid Bacteria in Dadih Produced by Either Back-Slopping or Spontaneous Fermentation from Two Different Regions of West Sumatra, Indonesia". In : *Vet World* 12.6 (juin 2019), p. 823-829. ISSN : 0972-8988. DOI : [10.14202/vetworld.2019.823-829](https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.823-829) (cf. p. 70).
- [12] R. AKUZAWA, T. MIURA et I.S. SURONO. "Fermented Milks | Asian Fermented Milks". en. In : *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, p. 507-511. ISBN : 978-0-12-374407-4. DOI : [10.1016/B978-0-12-374407-4.00186-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00186-2) (cf. p. 70).
- [13] M. KAHALA, M. MÄKI, A. LEHTOVAARA, J.-M. TAPANAINEN, R. KATISKA, M. JUURUSKORPI, J. JUHOLA et V. JOUTSJOKI. "Characterization of Starter Lactic Acid Bacteria from the Finnish Fermented Milk Product Viili". en. In : *Journal of Applied Microbiology* 105.6 (2008), p. 1929-1938. ISSN : 1365-2672. DOI : [10.1111/j.1365-2672.2008.03952.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03952.x) (cf. p. 70, 87).
- [14] Amr M BAKRY. "Mini-Review on Functional Characteristics of Viili and Manufacturing Process". en. In : (2018), p. 6 (cf. p. 70).
- [15] Md. HARUN-UR-RASHID, Kaname TOGO, Minoru UEDA et Taku MIYAMOTO. "Identification and Characterization of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk Dahi in Bangladesh". en. In : *World J Microbiol Biotechnol* 23.1 (jan. 2007), p. 125-133. ISSN : 1573-0972. DOI : [10.1007/s11274-006-9201-x](https://doi.org/10.1007/s11274-006-9201-x) (cf. p. 70).
- [16] K. VENEMA et I.S. SURONO. "Microbiota Composition of Dadih – a Traditional Fermented Buffalo Milk of West Sumatra". In : *Lett Appl Microbiol* 68.3 (mar. 2019), p. 234-240. ISSN : 0266-8254. DOI : [10.1111/lam.13107](https://doi.org/10.1111/lam.13107) (cf. p. 70, 87).
- [17] Hélène TORMO. *Personal Communication*. 2019 (cf. p. 70).
- [18] Marine CADORET, Sébastien LÊ et Jérôme PAGÈS. "A Factorial Approach for Sorting Task Data (FAST)". en. In : *Food Quality and Preference* 20.6 (sept. 2009), p. 410-417. ISSN : 0950-3293. DOI : [10.1016/j.foodqual.2009.02.010](https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.010) (cf. p. 72).
- [19] R CORE TEAM. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2020. URL : <https://www.R-project.org/> (cf. p. 72).
- [20] Sébastien LÊ, Julie JOSSE et François HUSSON. "FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis". In : *Journal of Statistical Software* 25.1 (2008), p. 1-18. DOI : [10.18637/jss.v025.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01) (cf. p. 72).

- [21] Alboukadel KASSAMBARA et Fabian MUNDT. *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*. R package version 1.0.6. 2019. URL : <https://CRAN.R-project.org/package=factoextra> (cf. p. 73).
- [22] Christian NICKELS et Hans LEESMENT. *Methode Zur Differenzierung Und Quantitativen Bestimmung von Säureweckerbakterien*. Carl, 1964 (cf. p. 74).
- [23] Z. Y. PU, M. DOBOS, G. K. Y. LIMSOWTIN et I. B. POWELL. "Integrated Polymerase Chain Reaction-Based Procedures for the Detection and Identification of Species and Subspecies of the Gram-Positive Bacterial Genus *Lactococcus*". en. In : *Journal of Applied Microbiology* 93.2 (2002), p. 353-361. ISSN : 1365-2672. DOI : [10.1046/j.1365-2672.2002.01688.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01688.x) (cf. p. 75).
- [24] Päivi FORSMAN, Anu TILSAIA-TIMISJÄRVI et Tapani ALATOSSAVA. "Identification of Staphylococcal and Streptococcal Causes of Bovine Mastitis Using 16S-23S rRNA Spacer Regions". In : *Microbiology*, 143.11 (1997), p. 3491-3500. ISSN : 1350-0872, DOI : [10.1099/00221287-143-11-3491](https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3491) (cf. p. 75).
- [25] Sylvie LORTAL, Annette ROUAULT, Stéphane GUEZENEC et Michel GAUTIER. "Lactobacillus Helveticus: Strain Typing and Genome Size Estimation by Pulsed Field Gel Electrophoresis". en. In : *Curr Microbiol* 34.3 (mar. 1997), p. 180-185. ISSN : 1432-0991. DOI : [10.1007/s002849900165](https://doi.org/10.1007/s002849900165) (cf. p. 75).
- [26] Zongzhi LIU, Catherine LOZUPONE, Micah HAMADY, Frederic D. BUSHMAN et Rob KNIGHT. "Short Pyrosequencing Reads Suffice for Accurate Microbial Community Analysis". en. In : *Nucleic Acids Research* 35.18 (sept. 2007), e120-e120. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gkm541](https://doi.org/10.1093/nar/gkm541) (cf. p. 76).
- [27] Leho TEDERSOO, Sten ANSLAN, Mohammad BAHRAM, Sergei PÕLME, Taavi RIIT, Ingrid LIIV, Urmas KÕLJALG, Veljo KISAND, Henrik NILSSON, Falk HILDEBRAND, Peer BORK et Kessy ABARENKOV. "Shotgun Metagenomes and Multiple Primer Pair-Barcode Combinations of Amplicons Reveal Biases in Metabarcoding Analyses of Fungi". en. In : *MycKeys* 10 (mai 2015), p. 1-43. ISSN : 1314-4049. DOI : [10.3897/mycokeys.10.4852](https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852) (cf. p. 76).
- [28] Rupesh Kanchi RAVI, Kendra WALTON et Mahdiah KHOSROHEIDARI. "MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis". en. In : *Disease Gene Identification: Methods and Protocols*. Sous la dir. de Johanna K. DiSTEFANO. Methods in Molecular Biology. New York, NY : Springer, 2018, p. 223-232. ISBN : 978-1-4939-7471-9. DOI : [10.1007/978-1-4939-7471-9_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12) (cf. p. 76).
- [29] Frédéric ESCUDIÉ, Lucas AUER, Maria BERNARD, Mahendra MARIADASSOU, Laurent CAUQUIL, Katia VIDAL, Sarah MAMAN, Guillermina HERNANDEZ-RAQUET, Sylvie COMBES et Géraldine PASCAL. "FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution". en. In : *Bioinformatics*

- 34.8 (avr. 2018), p. 1287-1294. ISSN : 1367-4803. DOI : [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791) (cf. p. 77).
- [30] Rolf Henrik NILSSON, Karl-Henrik LARSSON, Andy F. S. TAYLOR, Johan BENGTTSSON-PALME, Thomas S. JEPPESEN, Dmitry SCHIGEL, Peter KENNEDY, Kathryn PICARD, Frank Oliver GLÖCKNER, Leho TEDERSOO, Irja SAAR, Urmas KÕLJALG et Kessy ABARENKOV. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications". en. In : *Nucleic Acids Research* 47.D1 (jan. 2019), p. D259-D264. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022) (cf. p. 77).
- [31] Christian QUAST, Elmar PRUESSE, Pelin YILMAZ, Jan GERKEN, Timmy SCHWEER, Pablo YARZA, Jörg PEPLIES et Frank Oliver GLÖCKNER. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools". In : *Nucleic Acids Research* 41.Database issue (jan. 2013), p. D590-D596. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219) (cf. p. 77).
- [32] ADRIA QUIMPER. *Caractérisation et Maîtrise de La Fabrication d'un Produit Régional, "le Gros Lait"*. Nov. 1995 (cf. p. 87).
- [33] Michael GÄNZLE et Valery RIPARI. "Composition and Function of Sourdough Microbiota: From Ecological Theory to Bread Quality". In : *International Journal of Food Microbiology*. Special Issue: 6th Sourdough Symposium: Understanding Natural Complexity 239 (déc. 2016), p. 19-25. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004) (cf. p. 87).
- [34] Renate DOSLASH, Ving OSVIK, Sigmund SPERSTAD, Eva BREINES, Ellinor HAREIDE, Jacques GODFROID, Zhigang ZHOU, Pengfei REN, Claire GEOGHEGAN, Wilhelm HOLZAPFEL et Einar RINGOSLASH. "Bacterial Diversity of aMasi, a South African Fermented Milk Product, Determined by Clone Library and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis". en. In : *AJMR* 7.32 (août 2013), p. 4146-4158. ISSN : 1996-0808. DOI : [10.5897/AJMR12.2317](https://doi.org/10.5897/AJMR12.2317) (cf. p. 87).
- [35] H. N. J. SHANGPLIANG, Sharmila SHARMA, Ranjita RAI et Jyoti P. TAMANG. "Some Technological Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Dahi and Datshi, Naturally Fermented Milk Products of Bhutan". In : *Front Microbiol* 8 (fév. 2017). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2017.00116](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00116) (cf. p. 87).
- [36] Delphine PASSERINI, Valérie LAROUTE, Michèle CODDEVILLE, Pascal LE BOURGEOIS, Pascal LOUBIÈRE, Paul RITZENTHALER, Muriel COCAIGN-BOUSQUET et Marie-Line DAVERAN-MINGOT. "New Insights into Lactococcus Lactis Diacetyl- and Acetoin-Producing Strains Isolated from Diverse Origins". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 160.3 (jan. 2013), p. 329-336. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023) (cf. p. 88).
- [37] Kayanush J. ARYANA et Douglas W. OLSON. "A 100-Year Review: Yogurt and Other Cultured Dairy Products". en. In : *Journal of Dairy Science* 100.12 (déc. 2017), p. 9987-10013. ISSN : 0022-0302. DOI : [10.3168/jds.2017-12981](https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981) (cf. p. 88).

- [38] P. F. FOX, Timothy P. GUINEE, Timothy M. COGAN et Paul L. H. MCSWEENEY. *Fundamentals of Cheese Science*. en. Second. Springer US, 2017. ISBN : 978-1-4899-7679-6. DOI : [10.1007/978-1-4899-7681-9](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9) (cf. p. 88).
- [39] F. VANINGELGEM, M. ZAMFIR, T. ADRIANY et L. De VUYST. "Fermentation Conditions Affecting the Bacterial Growth and Exopolysaccharide Production by *Streptococcus Thermophilus* ST 111 in Milk-Based Medium". en. In : *Journal of Applied Microbiology* 97.6 (2004), p. 1257-1273. ISSN : 1365-2672. DOI : [10.1111/j.1365-2672.2004.02418.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02418.x) (cf. p. 88).
- [40] E.J. SMID et M. KLEEREBEZEM. "Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations". In : *Annual Review of Food Science and Technology* 5.1 (2014), p. 313-326. DOI : [10.1146/annurev-food-030713-092339](https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092339) (cf. p. 88).
- [41] Emilie LHOMME, Anna LATTANZI, Xavier DOUSSET, Fabio MINERVINI, Maria DE ANGELIS, Guylaine LACAZE, Bernard ONNO et Marco GOBBETTI. "Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of Sixteen French Traditional Sourdoughs". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 215 (déc. 2015), p. 161-170. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015) (cf. p. 89).
- [42] Raffaella DI CAGNO, Erica PONTONIO, Solange BUCHIN, Maria DE ANGELIS, Anna LATTANZI, Francesca VALERIO, Marco GOBBETTI et Maria CALASSO. "Diversity of the Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiota in the Switch from Firm- to Liquid-Sourdough Fermentation". eng. In : *Applied and Environmental Microbiology* 80.10 (mai 2014), p. 3161-3172. ISSN : 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.00309-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00309-14) (cf. p. 89).
- [43] Illse JOOD, Justin Wallace HOFF et Mathabatha Evodia SETATI. "Evaluating Fermentation Characteristics of *Kazachstania* Spp. and Their Potential Influence on Wine Quality". en. In : *World J Microbiol Biotechnol* 33.7 (juin 2017), p. 129. ISSN : 1573-0972. DOI : [10.1007/s11274-017-2299-1](https://doi.org/10.1007/s11274-017-2299-1) (cf. p. 89).
- [44] John I. PITT et Ailsa D. HOCKING. *Fungi and Food Spoilage*. en. Third. Springer US, 2009. ISBN : 978-0-387-92206-5. DOI : [10.1007/978-0-387-92207-2](https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2) (cf. p. 89).
- [45] Jun MEI, Qizhen GUO, Yan WU et Yunfei LI. "Microbial Diversity of a Camembert-Type Cheese Using Freeze-Dried Tibetan Kefir Coculture as Starter Culture by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods". In : *PLoS One* 9.10 (oct. 2014). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0111648](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111648) (cf. p. 89).
- [46] Josiane E GARNEAU et Sylvain MOINEAU. "Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria and Their Impact on Milk Fermentations". In : *Microbial Cell Factories* 10.Suppl 1 (août 2011), S20. ISSN : 1475-2859. DOI : [10.1186/1475-2859-10-S1-S20](https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20) (cf. p. 89).

- [47] Oylum ERKUS, Victor CL DE JAGER, Maciej SPUS, Ingrid J. VAN ALEN-BOERRIGTER, Irma MH VAN RIJSWIJCK, Lucie HAZELWOOD, Patrick WM JANSSEN, Sacha AFT VAN HIJUM, Michiel KLEEREBEZEM et Eddy J. SMID. "Multifactorial Diversity Sustains Microbial Community Stability". en. In : *The ISME Journal* 7.11 (nov. 2013), p. 2126-2136. ISSN : 1751-7370. DOI : [10.1038/ismej.2013.108](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.108) (cf. p. 89).
- [48] Luciana HERVE-JIMENEZ, Isabelle GUILLOUARD, Eric GUEDON, Samira BOUDEBBOUZE, Pascal HOLS, Véronique MONNET, Emmanuelle MAGUIN et Françoise RUL. "Postgenomic Analysis of *Streptococcus Thermophilus* Cocultivated in Milk with *Lactobacillus Delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus*: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism". In : *Appl Environ Microbiol* 75.7 (avr. 2009), p. 2062-2073. ISSN : 0099-2240. DOI : [10.1128/AEM.01984-08](https://doi.org/10.1128/AEM.01984-08) (cf. p. 89).

Chapitre 3

Dynamique des communautés au cours du temps

3.1 Introduction

La composition des communautés microbiennes de produits fermentés peut évoluer au cours du temps du fait d'autres facteurs que la dispersion. On peut distinguer les facteurs d'origine exogène, en réponse à des éléments abiotiques comme la température, la quantité de nutriments apportés à la communauté, la disponibilité de l'eau, etc., et ceux d'origine endogène, qui sont le fait des interactions biotiques au sein de la communauté [1].

Les paramètres environnementaux et leur variabilité peuvent influencer sur la dynamique des communautés, en sélectionnant certains taxons mieux adaptés que d'autres. Ces paramètres environnementaux sont définis par les pratiques des producteurs dans le cas des produits fermentés. Ils peuvent affecter la dynamique des communautés microbiennes en définissant des contraintes environnementales qui peuvent sélectionner différentes espèces ou souches au sein de ces espèces. Ces évolutions peuvent affecter les caractéristiques physico-chimiques des produits.

Les interactions entre espèces constituent un facteur d'origine endogène qui détermine la dynamique de la communauté microbienne. Ces interactions peuvent être de différents types, en fonction de leur caractère bénéfique ou délétère pour les organismes qui y prennent part [2] (tableau 3.1).

| Type d'interaction | Nom |
|--------------------|--------------------------|
| négative/négative | compétition |
| négative/neutre | ammensalisme |
| négative/positive | prédation ou parasitisme |
| positive/neutre | commensalisme |
| positive/positive | mutualisme |

Tableau 3.1 – Type et nom des différentes interactions biologiques

Types d'interactions biologique

Comme présenté dans le tableau 3.1, les interactions entre deux taxons peuvent être négatives, neutres ou positives pour chacun des partenaires. Cette caractéristique dépend de l'effet de l'interaction sur la valeur sélective de chacun des partenaires. Une interaction positive pour un taxon augmente sa valeur sélective, une interaction négative la diminue et une interaction neutre ne l'influence pas. Pour évaluer le type d'interaction entre deux taxons, on peut mesurer leur fitness respective lorsqu'ils sont séparés et en interaction. En microbiologie, ceci se fait par exemple en cultivant des souches de chacun des taxons séparément et en co-culture dans un milieu donné. On peut évaluer leur fitness en mesurant leur taux de croissance ou leur densité de population maximale, et conclure quant au type d'interaction en jeu entre les deux taxons dans les conditions de l'expérience. Dans les faits, il est en général très difficile de montrer qu'une interaction est neutre entre deux taxons, et des interactions de compétition très déséquilibrées avec un effet légèrement négatif pour l'un des deux partenaires et fortement négatif pour l'autre sont parfois considérées comme de l'ammensalisme, l'effet légèrement négatif étant considéré comme neutre.

Les conséquences écologiques de ces différents types d'interaction sont variées. Par exemple dans un modèle simple de compétition, deux taxons en compétition auront tendance à s'exclure, l'un finissant par supplanter l'autre [3]. A l'inverse, une relation de prédation ou de parasitisme peut entraîner une évolution cyclique de la taille des populations prédateurs et de leur proie ou des parasites et de leur hôte, menant à la coexistence des deux dans un équilibre cyclique [4]. Ces dynamiques ont notamment été observées sur des interactions de prédation entre lynx et lièvres [5], ou de parasitisme entre phages et bactéries [6]. Des relations mutualistes peuvent également mener à une coexistence stable entre plusieurs espèces [7]. Les interactions biologiques sont sujettes à évoluer du fait de la sélection naturelle et entraînent une adaptation perpétuelle des différents organismes qui y prennent part, il importe donc de prendre en compte les aspects écologiques mais également évolutifs dans leur étude [4]. Elles peuvent également changer de nature en fonction des conditions environnementales, une relation mutualiste pouvant tourner à la compétition ou inversement, par exemple en fonction de la disponibilité des ressources, comme cela a été montré pour les associations mycorhiziennes [8] ou pour des relations d'échanges de nutriments (*cross-feeding*) entre microorganismes [7]. Les facteurs abiotiques et biotiques

sont donc liés, les caractéristiques du milieu pouvant modifier le type d'interaction entre les espèces.

La composition d'une communauté microbienne et son évolution au cours du temps est donc déterminée par l'inter-relation entre les facteurs abiotiques et les interactions entre les différentes espèces. Cette composition est susceptible d'évoluer en fonction de l'identité des souches et des pratiques des producteurs, qui déterminent donc la stabilité de la communauté microbienne. Il convient à ce stade de donner quelques précisions concernant le terme *stabilité*.

Celui-ci revêt en effet de nombreuses significations en écologie. Il accepte un grand nombre de définitions, GRIMM et WISSEL [9] en ont dénombré pas moins de 163, qu'ils attribuent à 70 concepts différents. Les auteurs proposent de distinguer les cas où le terme stabilité fait référence à la *constance* (rester essentiellement inchangé), à la *résilience* (revenir à un état de référence après une perturbation passagère) ou à la *persistance* (conserver des caractéristiques définissant l'identité d'un système biologique). Les deux premiers termes font référence à l'état du système et à ses dynamiques, tandis que le troisième concerne son identité. Appliqué au levain ou au Gwell, poser la question de la constance revient à se demander si leurs caractéristiques physico-chimique (pH, potentiel redox, CO₂ dégagé, etc.) ou microbiologique (densité des différents taxons) restent constantes ou évoluent de manière cyclique régulièrement au cours du temps. Leur résilience concerne le retour de ces caractéristiques à une valeur de référence après une perturbation épisodique, qui pourrait être par exemple l'introduction d'une nouvelle espèce ou d'un nouveau substrat, ou la modification de la température. Enfin, la persistance au cours du temps du Gwell ou du levain concerne le maintien des caractéristiques qui permettent de les définir comme du Gwell ou du levain. On peut par ailleurs distinguer la constance de la *résistance*, qui est le fait de rester essentiellement inchangé en réponse à une perturbation, ce qui implique implicitement que la constance concerne l'évolution d'un écosystème en l'absence de perturbation. Je me suis intéressé principalement à la constance du levain et du Gwell, en étudiant leurs caractéristiques microbiologiques (constance des espèces présentes) ou physico-chimiques (pH et vitesse d'acidification du Gwell). Dans la suite de ce manuscrit, je ferai un usage indifférencié des termes constance et stabilité.

J'ai ainsi évalué la constance des communautés microbiennes de levain au cours du temps, en prenant en compte d'éventuels changements dans les pratiques des producteurs (partie 3.2). Je me suis également intéressé à la résistance de la communauté microbienne du Gwell (partie 3.3), en étudiant l'effet de changements dans la fréquence de repiquage sur la composition de la communauté microbienne à travers un essai d'évolution expérimentale participatif.

3.2 Évaluation de la stabilité des levains de panification sur plusieurs années

3.2.1 Revue bibliographique

La stabilité microbiologique des levains fait débat au sein de la communauté scientifique. On peut émettre l'hypothèse que les souches qui le composent s'y reproduisent de manière continue sans être remplacées par d'autres, extérieures au levain, étant donné qu'un levain peut être maintenu par un boulanger pour de nombreuses années. Certains boulangers ayant participé au projet BAKERY entretiennent un levain initié il y a plus de 80 ans, en obtenant toujours un résultat satisfaisant du point de vue de la levée de la pâte (donc de la production de CO_2), ou de l'acidification. Les boulangers arrivent à maintenir leur levain suffisamment actif en adaptant leurs pratiques à la saison, au climat ou à d'autres paramètres pour s'adapter à l'état de leur levain. Ils peuvent ainsi jouer par exemple sur le taux d'hydratation, la température ou encore la fréquence de rafraîchi du levain. Cependant, ces observations ne suffisent pas pour conclure que les levains sont stables d'un point de vue microbiologique, puisque les espèces présentes peuvent être remplacées par d'autres qui sont équivalentes d'un point de vue fonctionnel.

Certains auteurs se sont intéressés à la persistance de souches ou d'espèces de microorganismes dans des levains au cours du temps. La grande majorité des études concerne les bactéries, et peu de levains ont été analysés [10, 11, 12, 13, 14].

SCHEIRLINCK et al. [10] ont montré que les espèces de bactéries retrouvées dans 11 levains collectés en Belgique restaient les mêmes sur une période d'un an. Les rares cas où la composition en bactéries des levains était modifiée pouvaient être expliqués par des changements dans le processus de fabrication (proportion de farine de blé et de seigle, température, conservation à 6°C ou non). VENTURI, GUERRINI et VINCENZINI [11] ont analysés pendant une période de trois ans un levain de *Pannetone* et un de *Lagaccio*, deux produits traditionnels italiens qui se rapprochent d'une brioche au levain. La méthode d'entretien de ces levains est particulière et relativement complexe avec plusieurs étapes de rafraîchi par jour à des températures différentes, mais le levain reste un levain de type I entretenu par *back-slopping*. Les auteurs ont identifié les espèces *L. sanfranciscensis*, *K. humilis* (nommée *Candida milleri* à l'époque de la publication) et de *S. cerevisiae*, qui se maintiennent dans les levains sur toute la période de l'étude. VIIARD et al. [12] ont analysés les populations bactériennes de levains de quatre boulangeries pendant 28 mois. Chaque levain contenait les mêmes espèces au cours du temps, mais il y avait des variations saisonnières de taille de population dans les levains entretenus à température ambiante, alors que ce n'était pas le cas dans les levains entretenus à température contrôlée. À l'inverse, d'autres études montrent une certaine instabilité de la communauté microbienne des levains. MINERVINI et al. [13] ont entretenus sept levains pendant 80 jours au fournil et au laboratoire et se sont intéressés au maintien des bactéries lactiques. Les levains entretenus au fournil étaient stables du point de vue du maintien des espèces, mais les souches identifiées n'étaient pas les mêmes selon

le point de prélèvement. L'environnement d'entretien du levain joue un rôle important concernant sa stabilité. En effet, la composition en espèces de bactéries de la communauté microbienne des levains entretenus au laboratoire variait plus au cours du temps que celle des levains entretenus au fournil. Enfin, ROSENQUIST et HANSEN [14] ont étudiés les bactéries et levures de deux levains pendant sept mois. De manière étonnante, les auteures n'ont pas trouvé de bactérie du genre *Lactobacillus* dans les levains. *S. cerevisiae* était la seule espèce de levure, qui présentait plusieurs phénotypes. Dans un des levains, le phénotype détecté des souches de *S. cerevisiae* a changé au cours de l'expérimentation.

D'après ces études, les espèces de bactéries des communautés microbiennes de levain semblent donc se maintenir, mais les souches peuvent varier au cours du temps, et des changements dans l'environnement ainsi que les méthodes de fabrication semblent pouvoir perturber la communauté microbienne du levain. On dispose cependant de très peu de données concernant les levures, à ma connaissance les deux seules études qui s'y rapportent sont celles de VENTURI, GUERRINI et VINCENZINI [11] et de ROSENQUIST et HANSEN [14].

J'ai collecté le levain de 20 boulangers et paysans-boulangers afin de comparer la composition de leur communauté microbienne à celle qui avait décrite lors d'une collecte 4 ans auparavant en 2015 par Elisa Michel [15]. Afin d'expliquer les éventuelles variations observées concernant la flore microbienne des levains, j'ai retenu trois variables : l'initiation d'un nouveau levain, l'emménagement dans un nouveau fournil, et le recrutement d'un nouveau boulanger s'occupant du levain. Ces trois variables présentaient suffisamment de variations dans les réponses des boulangers, et semblent fondamentales concernant la stabilité du levain. En effet, si un nouveau levain a été initié il n'y a pas de continuité de propagation de la communauté microbienne et de nouveaux microorganismes peuvent potentiellement se développer. Les microorganismes présents dans le fournil déterminent souvent la composition microbienne du levain [16, 17], et le microbiote des mains du boulanger ressemble à celui de son levain et il est probable qu'il y ait des échanges entre les deux [18]. Je n'ai pas pris en compte les variables concernant les changements de type de farine ou le moulin car j'ai montré dans la partie 2.2 (**Microbial Community Dispersal In Sourdough**) que les farines ne sont pas une source de microorganismes pour un levain mature. Les paramètres d'entretien du levain (température de maintien, taux d'hydratation, fréquence de rafraîchi, etc.) pourraient déterminer sa composition microbienne, mais il y a eu peu de changements importants concernant ces paramètres et ils n'ont donc pas été retenus.

3.2.2 Méthodes

20 levains ont été collectés en juin et juillet 2019 chez les boulangers et paysans boulangers, dont le protocole de collecte, l'extraction de l'ADN, le protocole de préparation pour le séquençage Illumina MiSeq ainsi que le processus d'analyses bioinformatique ont été décrits dans la partie 2.2. Les analyses bioinformatiques ont été menées de la même manière pour les données issues de MICHEL et al. [15], dont les échantillons ont été collectés en 2015. Pour rappel, les données de séquençage Illumina MiSeq ont été analysées avec l'algorithme dada2 [19]. Il utilise un modèle statistique pour inférer les erreurs

de séquençage et reconstituer des groupes de *reads* nommés *Amplicon Sequence Variants* (ASV), qui peuvent différer d'un seul nucléotide. C'est donc une méthode plus précise que celles basées sur la construction d'*Operational Taxonomic Unit* (OTU), qui regroupent des *reads* potentiellement plus éloignés que dans un ASV, et on peut ainsi avoir accès dans une certaine mesure à la diversité intra-spécifique du marqueur étudié.

Questionnaire envoyé aux boulangers

Les boulangers ont répondu à un questionnaire concernant leurs pratiques de boulangerie afin de savoir si des changements importants étaient intervenus entre les deux collectes de levain. Une première partie du questionnaire a permis de recueillir des données concernant les paramètres techniques jugés les plus importants pour différencier les différents groupes de boulangers [15]. Les informations demandées concernaient la farine utilisée (variétés anciennes ou modernes, utilisation de seigle dans le levain, type de moulin), l'entretien du levain (âge du levain, réutilisation du levain depuis un levain chef ou depuis la pâte à pain) et la panification (temps total de fermentation, utilisation ou non de levure pour le pain, utilisation ou non de levure dans le fournil, quantité de pain produit par semaine). Dans une deuxième partie, les boulangers ont indiqués si des changements importants étaient intervenus dans la composition de leur farine, au niveau du moulin, du procédé d'entretien du levain ou de la panification et s'ils avaient initié un nouveau levain ou changé de fournil ou de boulanger depuis la dernière collecte.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été menées sous R (v. 4.1.0), avec les packages tidyverse (v. 1.3.1) et les graphiques générés avec ggplot2 (v. 3.3.3) et ggpubr (v. 0.4.0).

3.2.3 Résultats

Localisation géographique des boulangers

La collecte a été réalisée chez des boulangers de toute la France, et leur localisation est donnée figure 3.1.

Comparaison des levains entre les deux collectes

La diversité alpha des levains de la collecte de 2015, calculée sur la base du nombre d'espèces détectées (richesse), est supérieure à celle des levains de la collecte de 2019 (Wilcoxon, $W = 358$, $p = 1.9 * 10^{-5}$ pour les champignons; $W = 118.5$, $p = 7.2 * 10^{-3}$ pour les bactéries), cf figure 3.2. Cependant, les indices de Shannon, où l'abondance des différentes espèces est prise en compte, ne sont pas significativement différents d'une collecte à l'autre (Wilcoxon, $W = 166$, $p = 0.37$ pour les champignons; $W = 93$, $p = 0.21$ pour les bactéries). Cela signifie que des espèces de champignons

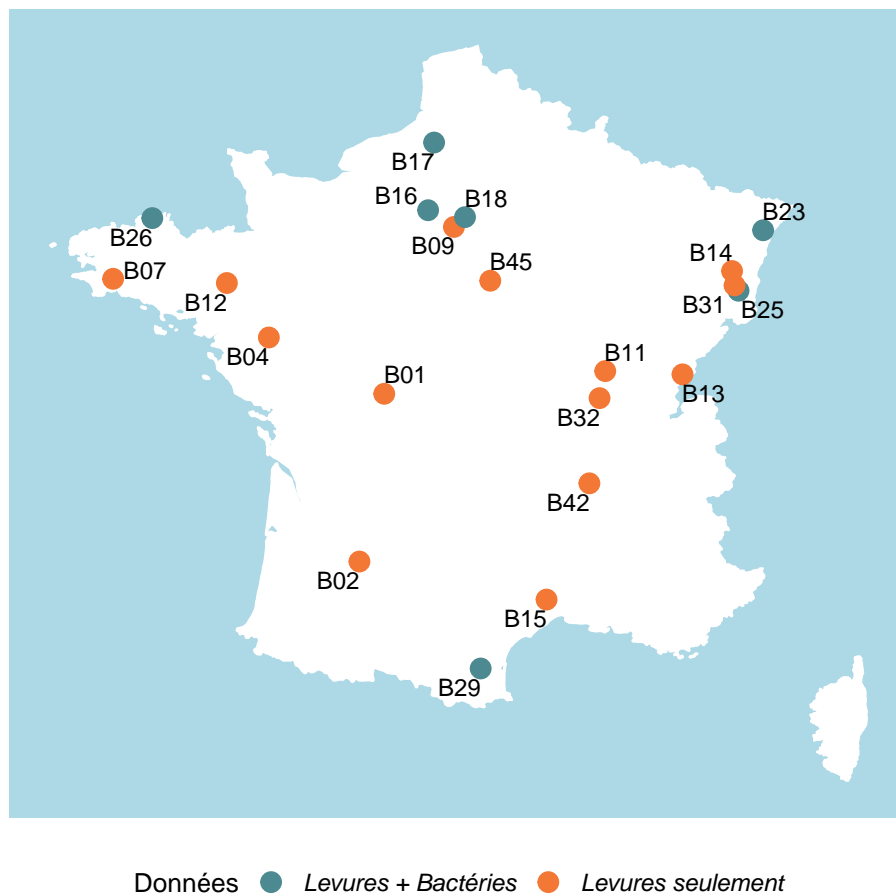


FIGURE 3.1 – Carte localisant les boulangers ayant fourni un échantillon de levain. La couleur indique la disponibilité des données de la collecte de 2015 sur les levures uniquement (orange) ou sur les levures et les bactéries (bleu).

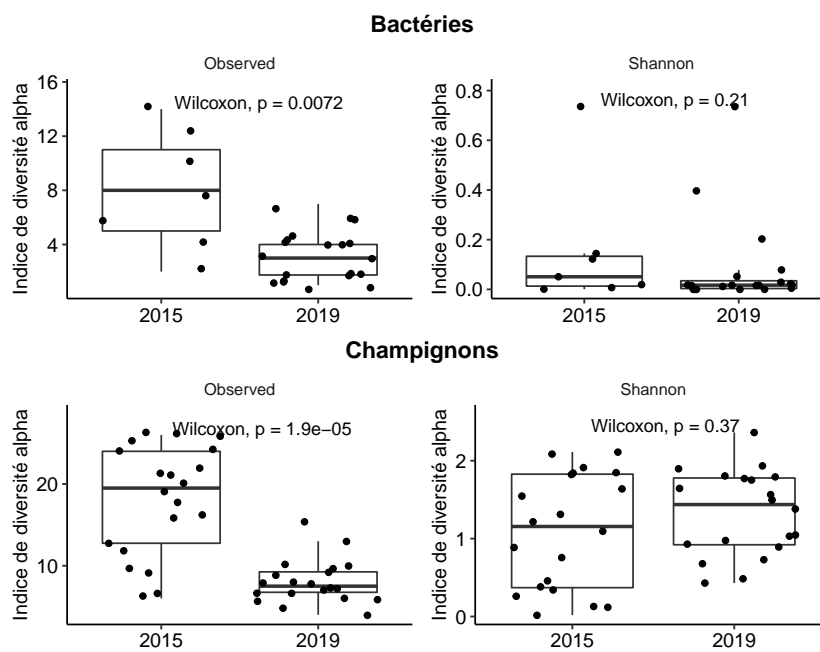


FIGURE 3.2 – Diversité alpha calculée sur l'abondance des différentes espèces, pour la collecte de 2015 (à gauche) et de 2019 (à droite). La diversité observée est présentée en haut, et l'indice de Shannon en bas.

peu abondantes ont été détectées dans les levains issus de la collecte de 2015 mais pas dans ceux de la collecte de 2019. 32 espèces de champignons et 29 espèces de bactéries comptant pour moins de 5% de l'abondance totale n'ont pas été détectées en 2019 alors qu'elles l'étaient en 2015. Il s'agit d'espèces des genres *Enterococcus*, *Fructilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Levilactobacillus*, *Massilia*, *Methylophilus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pediococcus*, *Pedobacter*, *Pseudomonas* ou *Sphingomonas* pour les bactéries. Pour les champignons, il s'agit d'espèces des genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Blumeria*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Epicoccum*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Kazachstania*, *Monographella*, *Mycosphaerella*, *Neoascochyta*, *Nigrospora*, *Pyrenophora*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Stemphylium*, *Udeniomyces* et *Vishniacozyma*. Sur l'ensemble des 20 échantillons de la collecte de 2019, 18 avaient *F. sanfranciscensis* comme espèce de bactérie majoritaire (> 95% du nombre de reads de l'échantillon), et *C. paralimentarius* a été détecté dans 3 levains et était majoritaire dans 2. En ce qui concerne les levures, les espèces majoritaires dans un levain étaient *S. cerevisiae*, *K. humilis*, *K. bulderi* ou une autre espèce du genre *Kazachstania*, quelle que soit la collecte (Figure 3.3).

Les espèces de bactéries majoritaires sont conservées d'une collecte à l'autre

La comparaison des compositions en bactéries et en levures des levains est présentée figure 3.3.

Les bactéries avaient été identifiées en 2015 pour seulement sept des levains que j'ai collecté. C'est donc un échantillon réduit, mais on peut tout de même constater que dans la majeure partie des cas, *F. sanfranciscensis* est toujours l'unique espèce détectée. Dans un levain qui contenait majoritairement *Levilactobacillus brevis*, cette espèce est toujours retrouvée en 2019 mais dans une proportion infé-

rière, *L. paralimentarius* étant majoritaire. Un levain qui contenait *F. sanfranciscensis* en 2015 avait principalement *C. paralimentarius* en 2019.

La stabilité des espèces de levures dépend de celle de l'environnement

En ce qui concerne les levures, j'ai pu comparer 20 levains entre 2015 et 2019. On peut comparer la composition des *Saccharomycetaceae*, cette famille contenant l'ensemble des levures majoritaires des levains dans cette étude. Les espèces de levure retrouvées varient beaucoup plus que pour les bactéries entre les deux collectes. Seulement 12 boulangers ont au moins une espèce de levure maintenue entre 2015 et 2019, 12 en acquièrent au moins une, et 8 en perdent au moins une (figure 3.4).

On peut observer un lien entre les changements de pratiques entre 2015 et 2019 et les pertes d'espèce de levure. On observe que les 10 boulangers qui ne rapportent pas de changement pour les trois variables retenues ne perdent généralement pas d'espèce de levure, sauf pour deux exceptions, avec le boulanger B02 qui perd l'espèce *Kazachstania unispora* et le boulanger B13 qui perd l'espèce *Kazachstania barnettii*. Ces espèces étaient majoritaires dans leur levain en 2015. Il s'agit cependant d'espèces relativement rares dans les levains, on peut supposer qu'elles ne sont pas particulièrement adaptées à ce milieu et qu'elles peuvent donc se faire remplacer. Dans les autres cas, on trouve toujours au moins une espèce qui se maintient et éventuellement une ou deux espèces acquises. Pour les 10 boulangers qui rapportent au moins un changement pour une des trois variables, 6 perdent au moins une espèce de levure. Par ailleurs, à part *S. cerevisiae*, aucune espèce ne se maintient chez les boulangers qui ont eu au moins un changement concernant les trois variables considérées, alors que parmi les 10 boulangers qui ne rapportent aucun changement concernant ces trois variables, 7 ont une espèce autre que *S. cerevisiae* qui se maintient.

La stabilité des espèces de levure dépend de l'espèce considérée

Toutes les espèces de levure ont été perdues par au moins un boulanger, à l'exception de *S. cerevisiae* et de *Kazachstania bozae*. *S. cerevisiae* a été acquise par six boulangers, et douze boulangers avaient ainsi cette espèce dans leur levain en 2019. Elle semble être particulièrement compétitive dans le levain et s'y maintient à partir du moment où elle est présente. *Kazachstania bozae* s'est maintenue dans deux levains et a été acquise dans un autre. Les autres espèces étaient présentes dans un à quatre levains en 2015, et ont été perdues dans un à deux levains. Les espèces *Kazachstania saulgeensis* et *Kazachstania exigua* n'étaient ainsi plus détectées dans aucun levain en 2019.

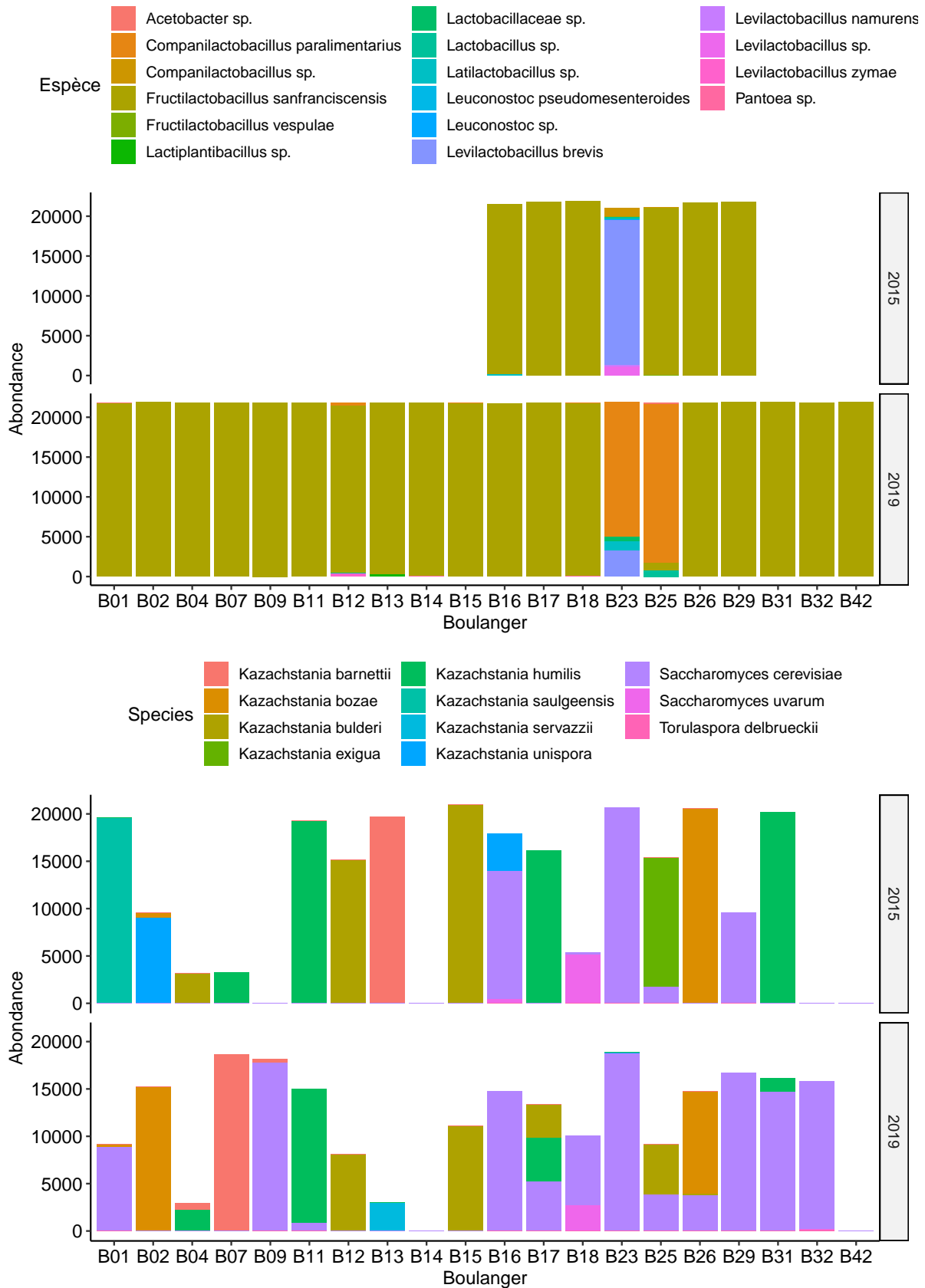


FIGURE 3.3 – Composition en bactéries (en haut) et en levures (en bas) des levains en 2015 et en 2019. Chaque espèce est représentée par une couleur. Pour les bactéries, seules les espèces représentant plus de 0.2% du nombre total de reads d'un échantillon sont représentées, et pour les levures, seules les espèces de *Saccharomycetaceae* sont représentées.

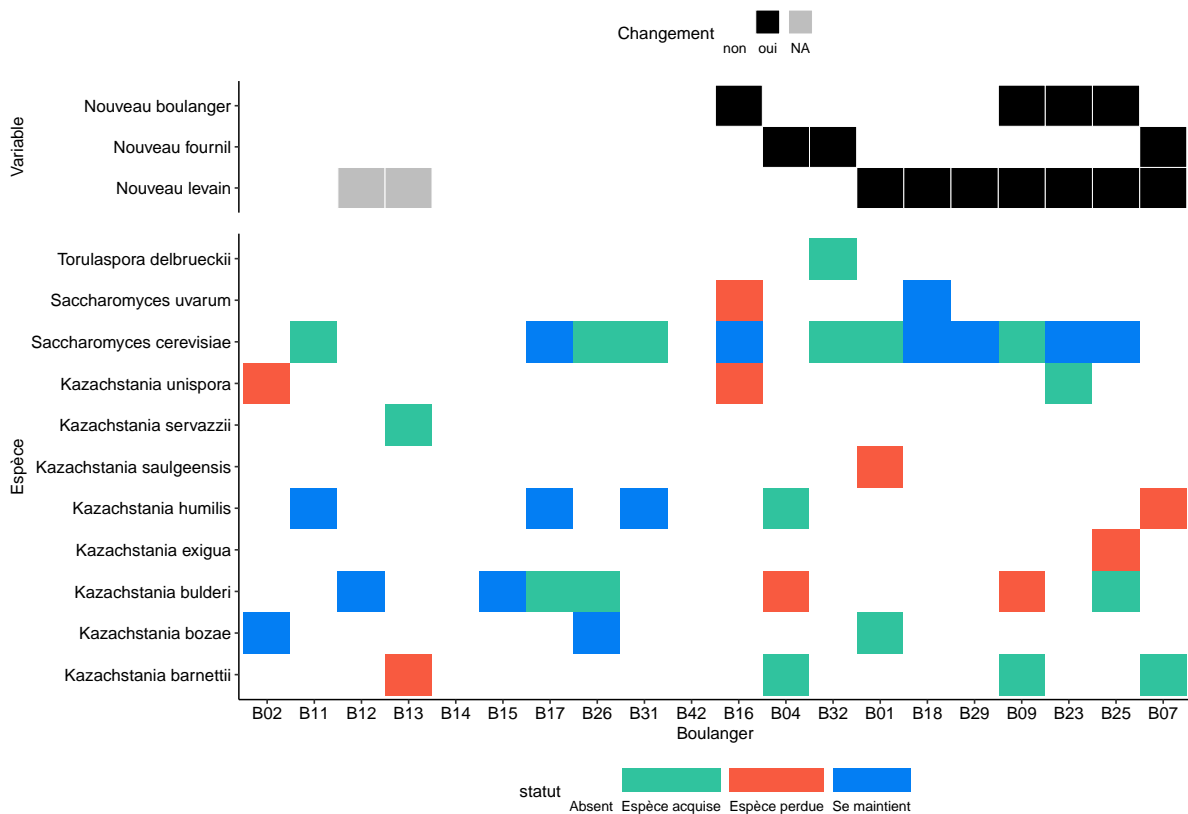


FIGURE 3.4 – Acquisition, perte et maintien d'espèces de levure dans les levains et changements de pratiques entre les collectes de 2015 et 2019. Les codes des boulangers sont donnés sur l'axe des abscisses. Trois variables ont été retenues concernant les changements de pratiques des boulangers : la préparation d'un nouveau levain, la construction d'un nouveau fournil et le recrutement de nouveaux boulangers préparant le levain. Une case noire à l'intersection de la colonne d'un boulanger et de la ligne d'une variable indique un changement concernant cette variable, une case blanche indique une absence de changement, et une case grise indique des données manquantes. Le graphique du bas présente les noms d'espèces de levure sur l'axe des ordonnées. Les cases à l'intersection de la colonne d'un boulanger et de la ligne d'une espèce indiquent par un code couleur si l'espèce est acquise (vert), perdue (rouge) ou si elle se maintient entre 2015 et 2019 (bleu), ou si elle n'a été détectée lors d'aucune des deux collectes (blanc).

Bibliographie

- [1] Giorgio GIRAFFA. "Studying the Dynamics of Microbial Populations during Food Fermentation". en. In : *FEMS Microbiology Reviews* 28.2 (mai 2004), p. 251-260. ISSN : 0168-6445. DOI : [10.1016/j.femsre.2003.10.005](https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005) (cf. p. 98).
- [2] Frédéric THOMAS, Thierry LEFÈVRE et Michel RAYMOND. *Biologie évolutive*. fr. Second. De Boeck Supérieur, 2016 (cf. p. 98).
- [3] Kevin R. FOSTER et Thomas BELL. "Competition, Not Cooperation, Dominates Interactions among Culturable Microbial Species". en. In : *Current Biology* 22.19 (oct. 2012), p. 1845-1850. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2012.08.005](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.005) (cf. p. 99).
- [4] Mary K. BURAK, Julia D. MONK et Oswald J. SCHMITZ. "Eco-Evolutionary Dynamics: The Predator-Prey Adaptive Play and the Ecological Theater". In : *The Yale Journal of Biology and Medicine* 91.4 (déc. 2018), p. 481-489. ISSN : 0044-0086 (cf. p. 99).
- [5] Charles ELTON et Mary NICHOLSON. "The Ten-Year Cycle in Numbers of the Lynx in Canada". In : *Journal of Animal Ecology* 11.2 (1942), p. 215-244. ISSN : 0021-8790. DOI : [10.2307/1358](https://doi.org/10.2307/1358) (cf. p. 99).
- [6] Laura HOBLEY et al. "Dual Predation by Bacteriophage and Bdellovibrio Bacteriovorus Can Eradicate Escherichia Coli Prey in Situations Where Single Predation Cannot". In : *Journal of Bacteriology* 202.6 (fév. 2020), e00629-19. ISSN : 0021-9193. DOI : [10.1128/JB.00629-19](https://doi.org/10.1128/JB.00629-19) (cf. p. 99).
- [7] Tim A. HOEK, Kevin AXELROD, Tommaso BIANCALANI, Eugene A. YURTSEV, Jinghui LIU et Jeff GORE. "Resource Availability Modulates the Cooperative and Competitive Nature of a Microbial Cross-Feeding Mutualism". In : *PLoS Biology* 14.8 (août 2016), e1002540. ISSN : 1544-9173. DOI : [10.1371/journal.pbio.1002540](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002540) (cf. p. 99).
- [8] Nancy Collins JOHNSON, Gail W. T. WILSON, Jacqueline A. WILSON, R. Michael MILLER et Matthew A. BOWKER. "Mycorrhizal Phenotypes and the Law of the Minimum". en. In : *New Phytologist* 205.4 (2015), p. 1473-1484. ISSN : 1469-8137. DOI : [10.1111/nph.13172](https://doi.org/10.1111/nph.13172) (cf. p. 99).

- [9] V. GRIMM et Christian WISSEL. "Babel, or the Ecological Stability Discussions: An Inventory and Analysis of Terminology and a Guide for Avoiding Confusion". en. In : *Oecologia* 109.3 (fév. 1997), p. 323-334. ISSN : 0029-8549, 1432-1939. DOI : [10.1007/s004420050090](https://doi.org/10.1007/s004420050090) (cf. p. 100).
- [10] Ilse SCHEIRLINCK, Roel VAN DER MEULEN, Ann VAN SCHOOR, Marc VANCANNEYT, Luc DE VUYST, Peter VANDAMME et Geert HUYS. "Taxonomic Structure and Stability of the Bacterial Community in Belgian Sourdough Ecosystems as Assessed by Culture and Population Fingerprinting". In : *Applied and Environmental Microbiology* 74.8 (avr. 2008), p. 2414-2423. ISSN : 0099-2240. DOI : [10.1128/AEM.02771-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02771-07) (cf. p. 101).
- [11] Manuel VENTURI, Simona GUERRINI et Massimo VINCENZINI. "Stable and Non-Competitive Association of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Candida Milleri* and *Lactobacillus Sanfranciscensis* during Manufacture of Two Traditional Sourdough Baked Goods". en. In : *Food Microbiology* 31.1 (août 2012), p. 107-115. ISSN : 07400020. DOI : [10.1016/j.fm.2012.02.011](https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.011) (cf. p. 101, 102).
- [12] Ene VIIARD, Marianna BESSMELTSEVA, Jaak SIMM, Tiina TALVE, Anu AASPÖLLU, Toomas PAALME et Inga SARAND. "Diversity and Stability of Lactic Acid Bacteria in Rye Sourdoughs of Four Bakeries with Different Propagation Parameters". en. In : *PLOS ONE* 11.2 (fév. 2016), e0148325. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0148325](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148325) (cf. p. 101).
- [13] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Raffaella DI CAGNO et Marco GOBBETTI. "Influence of Artisan Bakery- or Laboratory-Propagated Sourdoughs on the Diversity of Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas". In : *Applied and Environmental Microbiology* 78.15 (août 2012), p. 5328-5340. DOI : [10.1128/AEM.00572-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00572-12) (cf. p. 101).
- [14] Hanne ROSENQUIST et Åse HANSEN. "The Microbial Stability of Two Bakery Sourdoughs Made from Conventionally and Organically Grown Rye". en. In : *Food Microbiology* 17.3 (juin 2000), p. 241-250. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1006/fmic.1999.0313](https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0313) (cf. p. 101, 102).
- [15] Elisa MICHEL, Estelle MASSON, Sandrine BUBBENDORF, Léocadie LAPICQUE, Judith LEGRAND, Stéphane GUÉZENEC, Thibault NIDELET, Thérèse MARLIN, Olivier RUÉ, Bernard ONNO, Delphine SICARD et The Participating BAKERS. "Artisanal and Farmers Bread Making Practices Differently Shape Fungal Species Diversity in French Sourdoughs". en. In : *bioRxiv* (juin 2019), p. 679472. DOI : [10.1101/679472](https://doi.org/10.1101/679472) (cf. p. 102, 103).
- [16] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Giuseppe CELANO et Marco GOBBETTI. "House Microbiotas as Sources of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Italian Sourdoughs". en. In : *Food Microbiology* 52 (déc. 2015), p. 66-76. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009) (cf. p. 102).
- [17] Andrea COMASIO, Marko VERCE, Simon VAN KERREBROECK et Luc DE VUYST. "Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins". In : *Frontiers in Microbiology* 11 (juil. 2020). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2020.01212](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01212) (cf. p. 102).

- [18] Aspen T. REESE, Anne A. MADDEN, Marie JOOSSENS, Guylaine LACAZE et Robert R. DUNN. "Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread". en. In : *mSphere* 5.1 (fév. 2020). ISSN : 2379-5042. DOI : [10.1128/mSphere.00950-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00950-19) (cf. p. 102).
- [19] Benjamin J. CALLAHAN, Paul J. MCMURDIE, Michael J. ROSEN, Andrew W. HAN, Amy Jo A. JOHNSON et Susan P. HOLMES. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". en. In : *Nature Methods* 13.7 (juil. 2016), p. 581-583. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869) (cf. p. 102).

3.3 Dynamics of fermented milk microbial communities under fluctuating environments

Lucas von Gastrow^{1,2}, Marie-Noëlle Madec¹, Yu-Xiao Xu¹, Delphine Sicard² and Florence Valence¹

Article à finaliser pour soumission.

Affiliations

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

² : SPO, Univ Montpellier, INRAE, Montpellier SupAgro, Montpellier 34000, France

Abstract

We studied microbial community evolution in response to different fluctuating environments. We used Gwell, a fermented milk from Brittany region as a model system. Its microbial community is quite simple, composed mainly of *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Geotrichum candidum*. It is produced by back-slopping with an incubation phase of four hours at 30°C before being conserved several days at 4°C. This alternance of phases constitutes environmental fluctuations. We tested the effect of different back-slopping frequencies (one and three back-slopping per week) on the evolution of the microbial community in an in-farm experimental evolution assay. To begin with, the microbial community of control Gwell back-slopped and maintained at 4°C or at 30°C was strongly modified, thus showing that the fluctuation of environments is necessary to maintain Gwell microbial community. Then, we showed that changing the frequency of back-slopping did not lead to species loss or gain. However, *L. cremoris* population density was higher in Gwell back-slopped three times per week than in Gwell back-slopped once per week, and the opposite pattern was observed for *G. candidum*. *L. lactis* population density was unaffected by the back-slopping frequency. Lastly, we showed that *L. cremoris* was more resistant to cold shocks than *L. lactis*, thus explaining the higher population density of the former when Gwell is back-slopped more frequently.

Keywords

Lactococcus, fermented milk, back-slopping, microbial community, fluctuating environment, experimental evolution

3.3.1 Introduction

Microbial community dynamics

Different species coexist in a given ecosystem. These species are interconnected notably by resource competition and cross-feeding. In a given ecosystem with few limiting resources, many more species coexist than classical competition models predict. This paradox is known as the Hutchinson's paradox [1]. A variety of mechanisms leading to stable coexistence of multiple species have been identified. Biotic mechanisms include negative density-dependent selection. For example, a given population size can be controlled by predators, typically phages in bacterial communities [2]. Stable coexistence of multiple organisms can also be promoted by mutualistic interactions, such as cross-feeding. Cross-feeding can evolve *de novo* in a microbial community, where two species are in competition for the same resource [3]. Stabilizing evolution can occur when one species begin to feed on the by-products of the other's metabolism [4].

Abiotic mechanisms can also promote stable coexistence of multiple species. Spatial heterogeneity in environmental factors for example can lead to several species coexisting by niche partitioning [5]. Spatially distributed resources can play the same role as cross-feeding, as the different species do not compete for the same resource anymore [6]. To finish with, temporal heterogeneity in environmental factors can also promote stable coexistence of different kinds in an ecosystem [7]. We focus in this study on the latter type of mechanism.

Community evolution in fluctuating environments

Competition models assume that the ecosystem is at equilibrium. Non-equilibrium have thus been proposed as an explanation for the paradox of the plankton [8]. Temporal variability of environmental conditions could indeed deplete the ecosystem equilibrium [1]. Temporal variation can happen if the adaptation to the different conditions is subjected to a trade-off, and so different species can adapt to the different conditions [9]. Moreover, the rate of environment change is important to determine if coexistence can occur or not [10]. The idea is that the frequency of environment change must be low enough so the adapted species can increase in frequency, but not too low so the equilibrium is not reached and exclusion does not happen. Fluctuating environments and coexistence have been studied in plant or animal communities [11, 12]. Microbial communities have been studied too, but mainly through modelization, or simplified laboratory ecosystems [10].

Fermented products as models in community evolution

Fermented food can be good models to study microbial community evolution. They are indeed generally rather simple communities with few dominant species [13]. Their complexity is thus intermediary between natural environment and synthetic laboratory communities. There is a degree of environmental control, as the producers need to drive the fermentation process to get the desired functionalities. Mo-

reover, some fermented food are maintained for a long time, and the microbial communities composing them have the time to evolve and adapt to the environmental conditions [14]. It is typically what we can observed in fermented food produced by back-slopping. Back-slopping is a process where a part of a previous production is used to inoculate raw materials and initiate a new fermentation. Examples of back-slopped fermented food are sourdough used to make bread [15], vinegar [16] or different fermented milks like kefir or home-made or traditional yogurt before the use of selected pure strains [17]. In this work we studied a product called Gwell, a traditional mesophilic fermented milk from the Brittany region in France exclusively obtained by back-slopping without any use of commercial starters.

Gwell description and origin of our study

Gwell has been described in a previous study [18]. It is a fermented cow milk produced by back-slopping. Milk comes only from local breed of cows from Brittany produced by small scale farmers who breed the cows and transform the milk. For Gwell production they pasteurize the milk, let it cool down and inoculate it with 3 to 10% of a previous Gwell production and incubate it around 30°C for 4 to 6 hours. Then the resulting Gwell is conserved at 4°C before consumption or re-use as starter. The Gwell is thus both the final product for consumption and the starter. Gwell microbial community is quite simple, it is composed mainly of *Lactococcus lactis* sp. *lactis* and *Lactococcus cremoris* (previously named *L. lactis* sp. *cremoris* [19]) and *Geotrichum candidum*. *L. lactis* sp. *lactis* identified in Gwell were always of the biovar *diacetylactis*. *L. cremoris* acidifies the milk, reaching a pH between 4 and 4.5, leading to its coagulation. *L. lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* acidifies slower than *L. cremoris*, but it is responsible for the production of aroma which are typical of fermented milks [20]. Sometimes *Streptococcus thermophilus* and different yeast species, notably *Kazachstania servazii* are found as well.

The producers suffer from the instability of the community. They report a quite frequent absence of coagulation caused by a default in acidification. The Gwell is said "lost", and the only way producers can initiate a new Gwell is to get a new one from another producer. They have made observations about the default of acidification and observed that the loss can be rapid, with a functional Gwell being lost from one production to the other. However they generally observe a slow decay, the acidification rate progressively reducing during successive productions on a variable time scale. When it takes too long to acidify the milk, the Gwell is considered as improper for sell because not safe enough from a sanitary perspective safe and it is considered as lost by the producers. The farmers have observed different causes of loss of the ferment. If the ferment is conserved for too long, typically more than three weeks, they generally observe that *G. candidum* develops excessively and the acidification rate is reduced. This is most probably a simple case of microbial succession bacterial mortality and *G. candidum* growth through time. The producers also observed repeated loss of the Gwell if the back-slopping frequency was too high. As an example three producers lost their Gwell after having inoculated it one day to the other for three days.

This observation suggests that a change in the frequency of environmental fluctuation may be

responsible for the collapse of the Gwell microbial community. Gwell production conditions consist in a fermentation phase of 4 to 6 hours at 30°C and a conservation phase of several days, typically one week, at 4°C. Changing the back-slopping frequency means changing the frequency of these environmental fluctuations. We hypothesize that *L. cremoris* and *L. lactis* are better adapted to a different phase, thus explaining their coexistence. They are closely related from a genetic point of view and they feed on the same substrate in Gwell, they can thus be supposed to compete in this ecosystem [21], but the temperature fluctuating environment could explain their coexistence. This goal of this study was to test whether changing the frequency of environmental fluctuations could lead to the loss of one or the other species or lead to the adaptation of each species to different temperature fluctuations.

Participatory approach

This research was conducted with a participatory approach. Three farmers, who already participated in previous research study, were involved in the experiments from the formulation of the research questions to the realization of the experiments and the interpretation of the results. The experiments were thus performed in-farm, with minimal perturbations compared to normal Gwell production. This collaboration allows to share knowledge with the producers, who work with the ferment on a daily basis and observe the evolution through time, but don't have the tools to know it from a microbiological point of view.

3.3.2 Material and methods

In-farm Gwell experimental evolution

Gwell were back-slopped in three farms for one month. In each farm, three replicates were back-slopped once a week and three others were back-slopped three times per week. Each week, each replicate was sampled for microbiological analysis, conservation for DNA extraction, and the pH and temperature was monitored during the incubation step at 30°C. The experiment is schematized figure 3.5.

Gwell preparation in dairy farm The milk used for each Gwell fabrication came from the morning's milking. 10L were heated to 90°C for 1 minute in a stainless steel pot. Once hot, 4L were poured in sterile 1L glass bottles, cooled-down in cold water and maintained at 4°C until use for controls at the laboratory. The remaining 6L in the pot were then cooled-down to 37°C. For each sample, 1kg of this milk was poured in a 2L pitcher, 100mL Gwell was added and the mix was homogenized vigorously. Mix was then poured in two 500mL plastic pots with lids. One of the lids was pierced for the pHmetre electrode. Once all the plastic pots were filled, they were put in a polystyrene box to maintain their temperature. Three 1L bottle filled with 33°C water were added above the Gwell plastic pots, and the whole was covered with an insulating material before the polystyrene box's lid was closed. Once pH reached between 4.8 and 4.6, the box was opened. For each sample, the pot with a pH electrode was

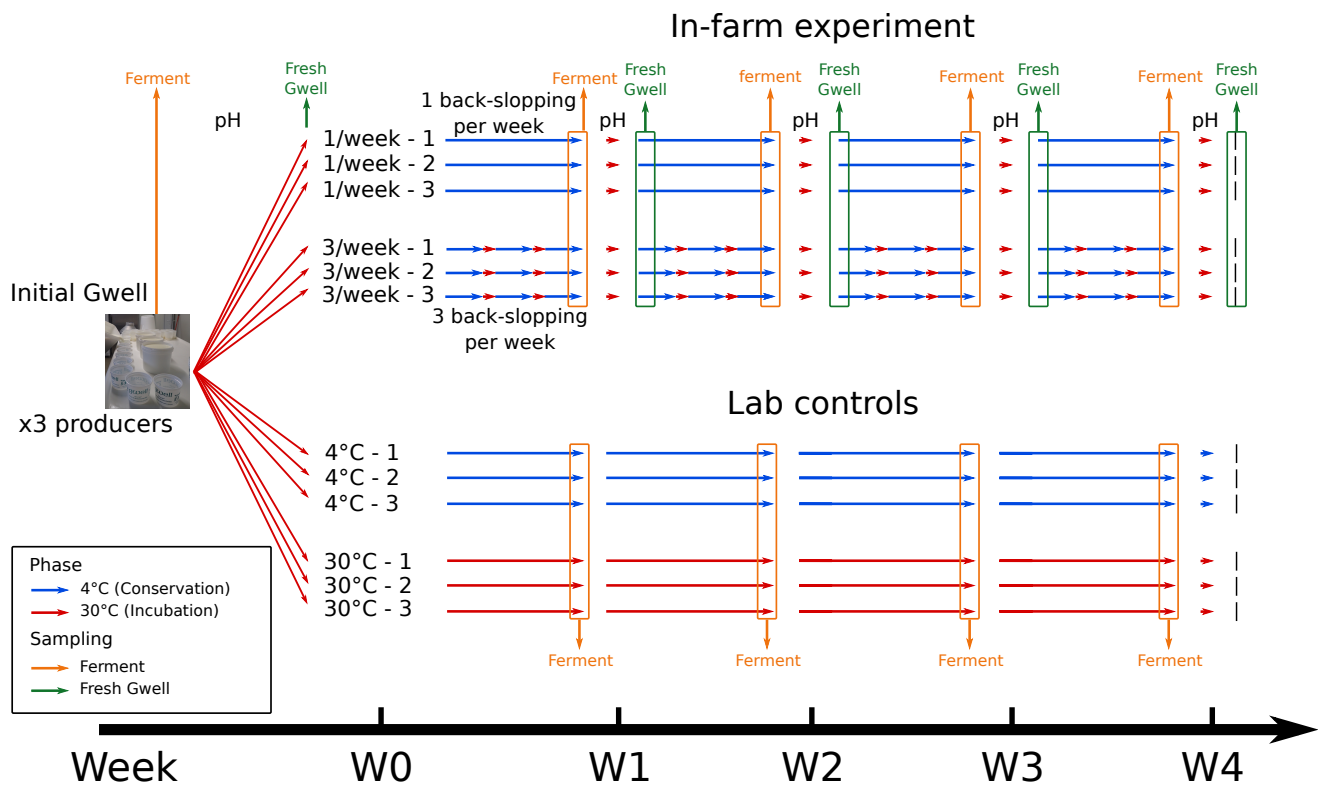


FIGURE 3.5 – Schematization of the in-farm experimental evolution, with sampling and measures realized

kept at 4°C until analysis at the laboratory, and the pot without pH electrode was kept at 4°C in the farm's cold room to be used as a ferment for the next preparation.

Temperature monitoring Temperature kinetic in the polystyrene box during fermentation and in the cold room during conservation were monitored with a Thermobouton (ref) programmed to monitor temperature every one minute and 30 minutes respectively. Temperature in the samples was followed with the built-in thermometer in the pH-metre (see following).

pH monitoring pH kinetic was followed all along fermentation with a wireless iCINAC (KPM Analytics, Westborough, USA) in 6 samples in parallel. One measure was saved every five minutes. A compensation was applied to compensate the temperature difference in the samples and in the calibration buffers. Acidification rate was calculated at each measurement on a ten minutes time interval, with the following formula : $V(t) = \frac{pH(t+5) - pH(t-5)}{10}$

With t the time in minutes.

V(t) the acidification rate at the time t, in pH unit/min.

Laboratory produced controls

In order to assess community dynamics without environmental fluctuation, 4°C and 30°C controls were prepared weekly in the lab using the pasteurized milk stored in sterile bottles. 500g milk maintained

at 4°C or heated to 30°C in hot-water bath was inoculated directly in the plastic pot with 50g sample kept at 4°C in a cold room or at 30°C. The mix was homogenized and the new samples placed at their respective temperature. 9 Gwell pots from the initial production were kept and maintained at 4°C in the cold room. Three of them were analyzed each week after two, three and four weeks.

Samples conservation

Gwell samples were transferred into plastic freezing bags after sampling for microbiological analysis and kept at -20°C.

Microbial enumeration

Ten grams of each sample were mixed with 90 ml of sterile citrated water (20 g/L citrate) at 42°C and homogenized in a filter bag (bagpage+ Interscience) then serially diluted in tryptone salt water (tryptone 1g/L, NaCl 8,5g/L). 100µL of each dilution was plated in duplicate onto an agar medium petri dish with a spiral plater (Easy spiral pro Interscience, France).

Media used :

Brain Heart Infusion (BHI) : nutrient-rich medium, non selective. (ref, compo) Calcium Citrate Agar (KCA) : selective medium for *Lactococcus lactis*, allowing to distinguish colonies based on their extracellular citrate consumption. A translucent halo can be seen around a colony when it has used the surrounding calcium citrate. This medium allows to distinguish the species *L. cremoris*, who does not uses citrate, from *L. lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* who uses it. See NICKELS et LEESMENT [22]. Oxytetracycline Glucose Agar (OGA) : To identify yeasts and molds. Composition : glucose 10g/L, yeast extract 5g/L, agar 15g/L, oxytetracycline 0,05g/L. Petri dishes with less than 400 colonies were counted after 48h at 30°C for BHI medium, 48h at 25°C for OGA, and 48h at 30°C followed by 5 days at room temperature for KCA. All plates were incubated in aerobic conditions.

Metabarcoding analysis

DNA extraction and 16S and ITS2 Illumina sequencing was detailed in [18].

Bioinformatic analysis The resulting sequences were analyzed using a R [23] workflow combining dada2 v.1.2.0 [24] and FROGS 3.2.2 [25] softwares. Reads were filtered, merged and assigned to ASV with dada2 and the ASV were assigned to species using FROGS affiliation tool. Adapters were first removed using cutadapt v. 1.12 with Python 2.7.13. Reads were then filtered using dada2 filterAndTrim function, with a truncation length of 220 bp for ITS2 forward and reverse reads and 275 and 200 bp for 16S forward and reverse reads respectively. This truncation reduced the error rate while still allowing the merging of the majority of the reads. The error model was then calculated using learnErrors function. Reads were dereplicated using derepFastq and the dada2 core sample inference algorithm was executed. Forward and reverse reads were then merged with a minimum overlap of 12 bp. The resulting sequences were saved in a sequence table using makeSequenceTable. Chimera were removed

using `removeBimeraDenovo` function. The Amplicon Sequence Variants (ASV) in the sequence table were then assigned to species using FROGS affiliation v3.2.2 with silva 138 [26] for 16S and Unite 8.0 [27] for ITS2. Multi-affiliations were treated by assigning the lowest common taxonomy level to multi-affiliated ASVs. Samples were rarefied to the minimum number of reads for each barcode, using `rarefy_even_depth` function of the `phyloseq` package (v. 1.24.2) [28]. If not otherwise specified, the analysis were conducted on the rarefied data.

Strains phenotyping for cold shocks resistance

Strain selection and plates preparation Strains were isolated from samples of all farmers, at the beginning of the experiment (W0) from all three replicates of the Gwell used, and at the end of the evolution for the Gwell back-sloped once (W4_1) and three times (4_3) per week. 23 colonies were isolated from the KCA plates for each sample, 12 being citrate+ (a translucent halo could be seen around the colony) and 11 citrate- (no translucent halo). If not enough colonies could be found on KCA plates, they were taken from BHI media. In any case, each colony was purified by spreading on a BHI plate, incubated for 48h at 30°C, re-suspended in 1mL liquid BHI medium in a 96 well plate and incubated for 24h at 30°C. Half of the culture was transferred to a new plate to duplicate it and 500µL glycerol 30% was added in each well. All plates were kept at -80°C until use. Out of these isolated strains, 270 (10 strains per sample, 5 citrate+ and 5 citrate-) were tested in cold choc assays. The strains were randomly distributed on three plates of 96 wells with a capacity of 2mL per well. One citrate+ and one citrate- strain for each farmer were replicated on all three plates. They were cultivated at 28°C for 24h in 1.5mL of M17 medium (ref Terzaghi, the lactose was only added before use). For each plate, 409µL of 70% glycerol was added to each well (final concentration 15% glycerol), and 400µL of the mix was then distributed in four plates and stored at -80°C until use.

Cold shocks culture conditions After defrost of the -80°C stored 96 well-plate, 15µL of each well were inoculated in 1.5mL M17 medium and incubated at 28°C for 24h. 15µL of this preculture were then inoculated in 1.5mL M17. During four days, each plate was recurrently placed at 28°C for 4h, then transferred and kept at 4°C for 20h.

Viable cells counting Before each change of temperature, 10µL of culture were transferred in a microplate after homogenization for cell counting. They were diluted in 190µL sterile 0.8% NaCl water and 2µL propidium iodide (PI, 100µg/mL) was added. The plates were kept in the dark for 15 minutes and was passed in a flow cytometer Attune NxT (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Maximum 50µL or 10000 events per sample were recorded with a flow of 100µL/min. PI fluorescence was measured with an excitation wavelength of xxx to xxx nm and emission filter of xxx to xxx nm.

Flow cytometer analysis Flow cytometer data were compiled with R package flowCore [29] (v. 2.4.0). Alive and dead cells were distinguished based on the algorithmic detection of a local minimum in the density function of PI fluorescence intensity. This density function was calculated on the basis of the histogram of PI fluorescence intensity with the density() function of the stats package (v. 4.1.0). If no minimum could be detected, the threshold distinguishing alive and dead cells was manually set by visual inspection of the histograms. It was set to the mean threshold found by the algorithm (3.25) if no local minimum could be detected by any method (*i.e.* when the PI intensity distribution was not bimodal).

Statistical analysis

Statistical analysis were conducted with R [23] v. 4.1.0.

We measured different fitness proxies during the in-farm experimental evolution and during a laboratory cold-shock assay.

During the in-farm experimental evolution, each farmer carried out six experimental evolutions, with three replicates of Gwell back-slopped three times a week and three replicates of Gwell back-slopped once a week. For each experimental evolution, we measured the population density of *L. cremoris* and *L. lactis* at each change of temperature by plate counting (CFU/mL). The rate of population density increase during each phase (Incubation 30°C, conservation 4°C) was also quantified as follows : $R = \frac{D_{fin} - D_{init}}{D_{init}}$, with R the rate of population density increase and D_{init} and D_{fin} the population density respectively at the beginning and at the end of the considered phase. For each experimental evolution, we thus obtained four rates of population density increase at 4°C (conservation phase) and four rates of population density increase at 30°C (incubation phase). To evaluate the effect of the farmer, backslopping frequency (treatment), and time (week) on the population density and rate of increase of bacteria, a linear model was computed .

$$V_{ijt} = \mu + (Farmer_i + Treatment_j + Week_t)^2 \quad (3.1)$$

With V the variable (rate of population density increase at 4°C or 30°C, or log(population density)),
 $i = 1, 2$ or 3 (farmer)
 $j = 1$ or 3 back-slopping per week (treatment)
 $t = 1, 2, 3$ or 4 (week).

To estimate the resistance of each ancestral and evolved strain to cold shock, two fitness proxies were used, the growth rate and the relative population density. Each strain was phenotyped during four days in a temperature fluctuating environment (4-28°C). At each change of temperature, the population density was estimated by flow cytometry leading to eight points of measure. These data were used to estimate the growth rate during cold shocks. The growth of each strain was modeled with a segmentation procedure, thanks to the segmented package [30]. The log transformed growth curves

of the cold shock assay were modeled with two segments corresponding to the exponential growth and the stationary phase. The growth rate was estimated as the slope of the line corresponding to the exponential growth using a linear model.

The relative population density was estimated as the log ratio of the final to the initial density. This relative measure of population density allowed us to take into account the initial growth rate of the bacteria in the medium. These two variables (the slope of the first line in the segmentation model or the final to initial population density ratio) were modeled as follows :

$$V_{ijk_r} = \mu + (Farmer_i + Treatment_j + Species_k + Farmer/Treatment/Replicate_{ijr})^2 \quad (3.2)$$

with V the variable,

i = 1, 2 or 3 (farmer)

j = W0 (initial ferment), W4_1 (Week 4 sample back-slopped once a week) or W4_3 (Week 4 sample back-slopped three times per week)

k = *L. cremoris* or *L. lactis* (species)

r = 1, 2 or 3 (replicate).

3.3.3 Results

The dynamic of microbial community was followed during four weeks in three farms. Each producer maintained Gwell under two selection regimes, "one back-slopping per week" and "three back-slopping per week".

Gwell have typical microbiological and physico-chemical characteristics

For the three farmers, Gwell from the beginning of the experiment had typical Gwell characteristics. Their pH was comprised between 4.2 and 4.4. In agreement with a previous study [18], we found the following species : *L. lactis* sp. *lactis* ($2.0 * 10^8$ to $2.8 * 10^8$ CFU/mL), *L. cremoris* ($2.4 * 10^7$ to $3.2 * 10^8$), and *G. candidum* ($2.3 * 10^3$ to $1.4 * 10^5$ CFU/mL). Yeasts were also detected in the samples from farmer 2, at $1.2 * 10^2$ CFU/mL. Putative *S. thermophilus* colonies were detected, and the presence of this species in all samples was confirmed by the metabarcoding results (Figure S1).

L. cremoris to *L. lactis* ratio was different between farmers, with a mean of 0.38 (sd = 0.06), 0.72 (sd = 0.05) and 0.08 (sd = 0.02) for farmer 1, 2 and 3 respectively. The only discrepancy with previous studies concerned *L. cremoris* population density in farmer 3 samples ($2.4 * 10^7$ CFU/mL), which was ten times lower than the typical population density of this species in Gwell.

Species development in non fluctuating conditions

In order to test if the change of environment was necessary to maintain the species found in Gwell, control Gwell were back-slopped once a week and maintained at either 30°C or 4°C during the whole experiment.

Metabarcoding analysis revealed that 30°C control Gwell replicates generally showed the same pattern (Figure 3.6) but differed between farmers. In all farmer samples, *L. lactis* and *S. thermophilus* remained dominant on the first week but their population frequency decreased with time. *L. lactis* was undetected after 3 weeks (except in farmer 1 replicate 1 where the species is present during the 4 weeks), and *S. thermophilus* was detected at less than 10% abundance at week 4 except in two samples (farmer 3 replicates 2 and 3). They were replaced by other species : in all samples, a *Lacticaseibacillus* species appeared during back-slopping at either week 1, 2 or 3 and was maintained at week 4, except in farmer 1 replicate 1. In all replicates of farmer 2 and 3, *Bifidobacterium mongoliense* was detected from week 3, and it represented more than 50% of the reads in farmer 2 week 4 samples. In two replicates of farmer 1, *Lactobacillus delbrueckii* appeared and represented more than 90% of the reads at week 4. Other species such as *Levilactobacillus brevis*, an unidentified *Lactobacillaceae* species or *Lactobacillus delbrueckii* were transiently detected.

Fungal species successions were different between farmers. In farmer 1 samples, only *G. candidum* was detected, except at week 3 and 4 where *Aureobasidium pullulans* was also found at a frequency below 5% of the reads. In farmer 2 samples, *Candida inconspicua*, and in farmer 3, an unidentified *Saccharomyces* species appeared at week 1 in all three replicates and was maintained during the four weeks of back-slopping. A *Saccharomyces* species, *Kluyveromyces lactis* and *Candida sake* appeared transiently in farmer 2 or 3.

Bacterial population density, measured by colony forming unit counting, showed different pattern between farmers but were similar between replicates of the same farmer. For farmer 1, bacterial population density grew from 10^6 to 10^9 CFU/mL between week 1 and 3, and slightly decreased at week 4. For farmer 2, it grew regularly from 5×10^7 to 10^9 CFU/mL, and for farmer 3, it was more erratic, with a general decrease from 5×10^7 to 10^7 CFU/mL between week 1 and 4.

Two types of controls were performed at 4°C. First, samples were back-slopped once per week for four weeks at 4°C. Second, they were conserved at 4°C without back-slopping and analyzed after two, three or four weeks (figure 3.7). These two types of controls could be analyzed only for farmer 1 because of a cold room failure impacting the samples from the other farmers. In the samples back-slopped at 4°C, metabarcoding results showed that *Lactococcus* species were detected all over the experiment and *S. thermophilus* abundance diminished and was null from week 3 in the three replicates. Replicate 3 showed a discrepancy, with *S. thermophilus* detected again at week 4 after disappearing at week 3. Numeration results showed that *L. lactis* sp. *lactis* disappeared from week 3, whereas in parallel *L. cremoris* reached 2×10^8 CFU/mL. Fungi population stayed stable with only *G. candidum* detected by metabarcoding, except in one replicate at week 1 where *Candida sake* was surprisingly the main species.

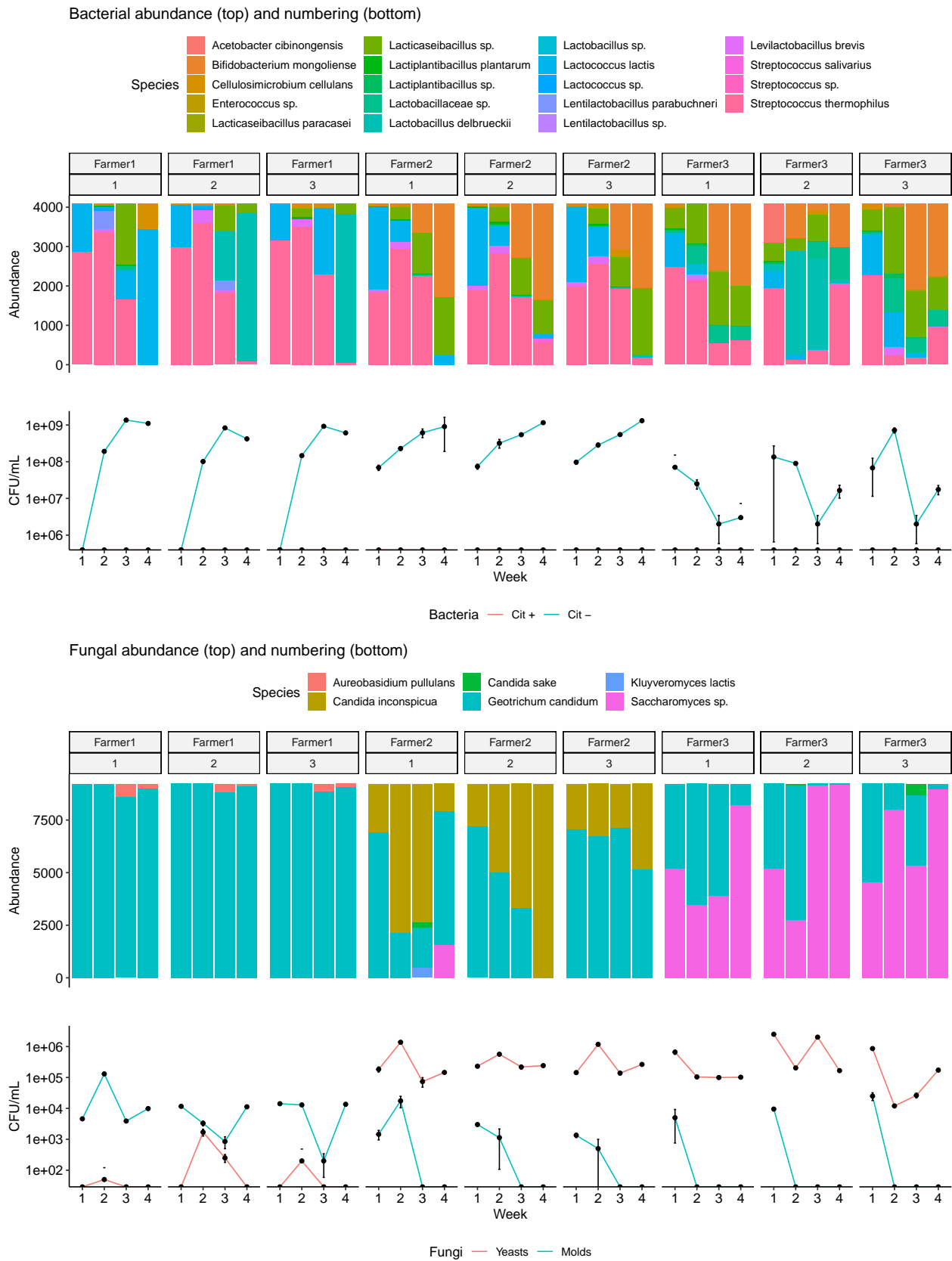


FIGURE 3.6 – Species relative abundance and colony forming unit of bacteria and fungi in 30°C control condition. Bacteria were enumerated on KCA and fungi on OGA. Bacteria were distinguished based on their ability to metabolize extracellular citrate on KCA (Cit+ and Cit-), and fungi based on their morphology. Each color represents a species. Replicates 1, 2 and 3 are shown for each farmer. Abundance and microbial counts graphics share the same x axis scale.

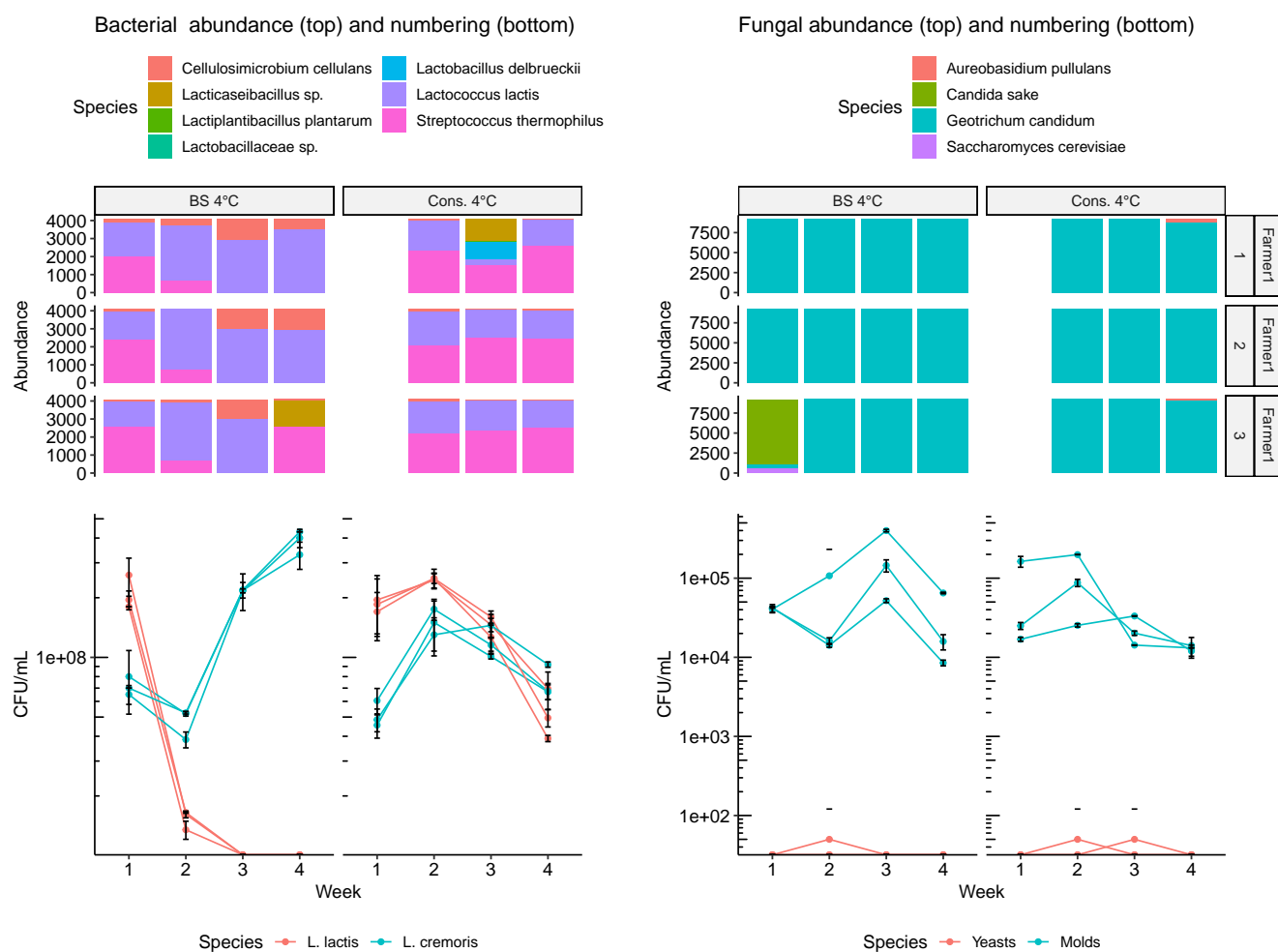


FIGURE 3.7 – Species relative abundance and number of colony forming unit (CFU) of bacteria and fungi in 4°C control conditions. Each color represents a species. BS = Back-slopping. Data are available only for farmer 1. Error bars on the numbering graphics show the standard deviation to the mean of the CFU counts in the different plates.

The samples conserved at 4°C without back-slopping were more stable. The *Lactococcus* and *Streptococcus* populations were detected by metabarcoding at the same abundance during the whole experiment. Bacterial counts showed however that they grew until week 2, *L. lactis* sp. *lactis* population size decreasing faster than *L. cremoris*. Replicate 2 week 3 was atypical with *Lactobacillus delbrueckii* and a *Lactocaseibacillus* species detected. The fungal populations were represented only by *G. candidum* in the metabarcoding assay, and their numbers counted on plates were divided by ten between week 1 and week 4 in one replicate and stayed more stable in the two others (less than two times diminution).

Gwell acidification rate

A linear model was computed to analyze the Gwell maximum acidification rate :

$$Vmax_{ij} = (D_{cremoris} + D_{lactis} + Farmer_i + SelectionRegime_j)$$

with V_{max} the maximum acidification rate,

$D_{cremoris}$ and D_{lactis} the population density of *L. cremoris* and *L. lactis* sp. *lactis* respectively, i in 1, 2, 3 (Farmer),

j in 0 (initial Gwell), 1 (one back-slopping per week), 3 (three back-slopping per week).

The Gwell acidification rate was explained by the *L. cremoris* population density (anova, 5.6% variance explained, $P = 0.02$) and the frequency of back-slopping applied to the Gwell (anova, 15.9% variance explained, $P = 0.007$). The other variables did not significantly explain the variations in Gwell acidification rate (anova, $P > 0.05$). *L. cremoris* population density was indeed correlated with the maximum acidification rate (figure 3.8, Pearson correlation, $R^2=0.22$, $P = 6.7 * 10^{-6}$), a higher number of *L. cremoris* CFU/mL leading to a faster acidification rate, thus a faster decrease of pH.

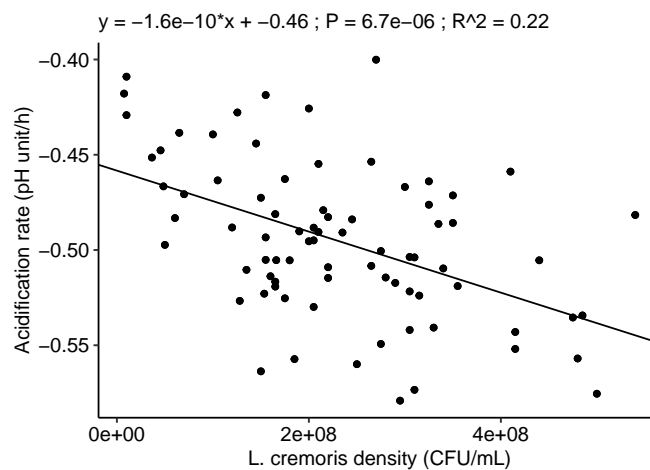


FIGURE 3.8 – Correlation between *L. cremoris* density (CFU/mL) and maximum acidification rate in pH unit per hour. A regression was computed and the Pearson's correlation coefficient as well as the test's p-value are shown

Effect of back-slopping frequency on Gwell microbial community composition

Gwell alpha diversity remained constant during the in-farm experimental evolution independently of the back-slopping frequency. The microbial community included three bacterial species (*L. lactis*, *L. cremoris* and *S. thermophilus*) and one fungal species (*G. candidum*) (Supplementary figure S1).

The effect of the back-slopping frequency on the population density of the *Lactococcus* species, yeasts and molds was investigated (figure 3.9) by classical microbiological analysis. Population density of yeasts never exceeded $1.5 * 10^3$ CFU and thus no further analysis was done on yeasts population density.

For both *L. cremoris* and *L. lactis* population density (table 3.2), the farmer explained the largest part of the variance. The mean *L. cremoris*/*L. lactis* ratio at the end of the evolution was of 0.44 (sd = 0.09), 0.68 (sd = 0.04) and 0.41 (sd = 0.06) for farmer 1, 2 and 3 respectively. The back-slopping frequency effect was also significant but it explained a small part of the variance. The back-slopping frequency :farmer interaction effect explained a higher part of the variance than the effect of

| Variable | <i>L. cremoris</i> density | | <i>L. lactis</i> density | |
|--------------------------|----------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | % variance explained | P value | % variance explained | P value |
| Farmer | 30.0 | $1.8 * 10^{-10}$ | 58.7 | $5.5 * 10^{-16}$ |
| Selection Regime | 5.09 | $1.2 * 10^{-3}$ | 1.8 | $4.5 * 10^{-2}$ |
| Week | 17.7 | $9.4 * 10^{-7}$ | 5.2 | $1.1 * 10^{-2}$ |
| Farmer :Selection Regime | 17.9 | $2.1 * 10^{-7}$ | 4.4 | $8.6 * 10^{-3}$ |
| Farmer :Week | 2.7 | 0.42 | 4.7 | 0.11 |
| Selection Regime :Week | 1.2 | 0.43 | 0.46 | 0.78 |

Tableau 3.2 – Summary of the anova on the linear model on *L. cremoris* and *L. lactis* density. The different variables shown are those that were used in the linear model, to explain the density of both species separately. Farmer : 1, 2 or 3; Selection Regime : 1 or 3 back-slopping per week; Week : 1, 2, 3 or 4.

back-slopping alone, especially for *L. cremoris* population density (3.9). Indeed, *L. cremoris* population density was significantly higher in Gwell back-slopped three times a week than in Gwell back-slopped once a week for farmer 1 (pairwise comparison, ratio = 2.2, Bonnféronni P.adj = $4.6 * 10^{-5}$) and farmer 3 (pairwise comparison, ratio = 1.77, Bonnféronni P.adj = $7.2 * 10^{-3}$). There was not significant difference between selection regimes for farmer 2 (pairwise comparison, Bonnféronni P.adj = 0.06). For farmer 2, *L. cremoris* population density was lower in Gwell back-slopped three times compared to Gwell back-slopped once a week during the first 3 weeks of the evolution experiment and became higher only the fourth week.

The back-slopping frequency :farmer interaction effect was less contrasted for *L. lactis*. For farmer 2, and 3, there were no population density difference between Gwell back-slopped once and three times a week (pairwise comparison, Bonnféronni P.adj = 0.99 and 0.93 respectively). For farmer 1, *L. lactis* had a higher population density in Gwell back-slopped three times than Gwell back-slopped once a week (pairwise comparison, ratio = 1.34, Bonnféronni P.adj = 0.007).

Molds population density were higher in gwell backslopped once a week than in Gwell backslopped three times a week in two farms. .

To sum up with, *L. cremoris* density was higher in Gwell back-slopped three times a week than in Gwell back-slopped once a week in all samples after four weeks of experiment, while *L. lactis* density was closer between the two selection regimes.

***L. cremoris* and *L. lactis* rate of population density increase**

We analysed the rate of population density increase during each conservation and incubation phase, over the four weeks of evolution. The rate of population density increase during the incubation step (30°C) and during the conservation step (4°C) depended on the species (Table 3.3). *L. lactis* rate of population density increase was higher than *L. cremoris* at 30°C (*L. lactis* = 13.6, *L. cremoris* = 9.97), while it was the opposite at 4°C (*L. lactis* = -0.11, *L. cremoris* = 0.93). The species explained more

| Variable | 4°C | | 30°C | |
|----------------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | % variance explained | P value | % variance explained | P value |
| Farmer | 1.46 | 0.225 | 3.46 | $4.03 * 10^{-2}$ |
| Selection Regime | 0.03 | 0.789 | 0.04 | 0.775 |
| Species | 20.09 | $2.81 * 10^{-9}$ | 5.35 | $1.80 * 10^{-3}$ |
| Week | 2.93 | 0.114 | 6.59 | $7.46 * 10^{-3}$ |
| Farmer : Selection Regime | 1.03 | 0.348 | 3.70 | $3.25 * 10^{-2}$ |
| Farmer : Species | 1.38 | 0.243 | 7.03 | $1.76 * 10^{-3}$ |
| Farmer : Week | 13.75 | $2.37 * 10^{-4}$ | 10.35 | $5.02 * 10^{-3}$ |
| Selection Regime : Species | 0.06 | 0.734 | 0.02 | 0.854 |
| Selection Regime : Week | 0.89 | 0.607 | 4.09 | 0.055 |
| Species : Week | 3.89 | $4.99 * 10^{-2}$ | 0.21 | 0.939 |
| Residuals | 54.50 | | 59.16 | |

Tableau 3.3 – Summary of the anova on the linear model on *L. cremoris* and *L. lactis* rate of population density increase at 4°C and 30°C. The different variables shown are those that were used in the linear model, to explain the rate of population density increase of the bacteria. Farmer : 1, 2 or 3; Selection Regime : 1 or 3 back-slopping per week; Species : *L. cremoris* or *L. lactis*; Week : 1, 2, 3 or 4

than 20% of the variance for the rate of population density increase at 4°C (Table 3.3).

The rate of population density increase at 30°C depended also on the week, on the farmer, and on the farmer :selection regime, farmer :species and farmer :week interaction effects, all explaining only a small part of the variance (5 to 10 %). The rate of population density increase at 4°C depended also on the farmer :week and species :week interaction effects, explaining respectively 13.75% and 3.89% of the variance.

To sum up with, *L. cremoris* rate of population density increase was higher than *L. lactis* at 4°C while it was the opposite at 30°C (Figure 3.10).

Strains resistance to cold shocks

We tested if *L. lactis* and *L. cremoris* differences in rate of population density increase during the in-farm experimental evolution could be explained by their resistance to cold shocks.

Five strains of each samples from the initial Gwell (ancestral strains) and from the week 4 Gwells (evolved strains) were cultivated for four days with a four hour period at 28°C and a 20h period at 4°C. Their density was measured before each temperature change, and their growth rate along the whole experiment was modeled. The strain fitness was estimated using two proxy, the growth rate and the population density at the end of the cold shock assay.

Overall strains, *L. cremoris* had a higher growth rate than *L. lactis* (figure 3.11 C).

Ancestral strains from farmer 2, who produced his own Gwell using three back-slopping per week,

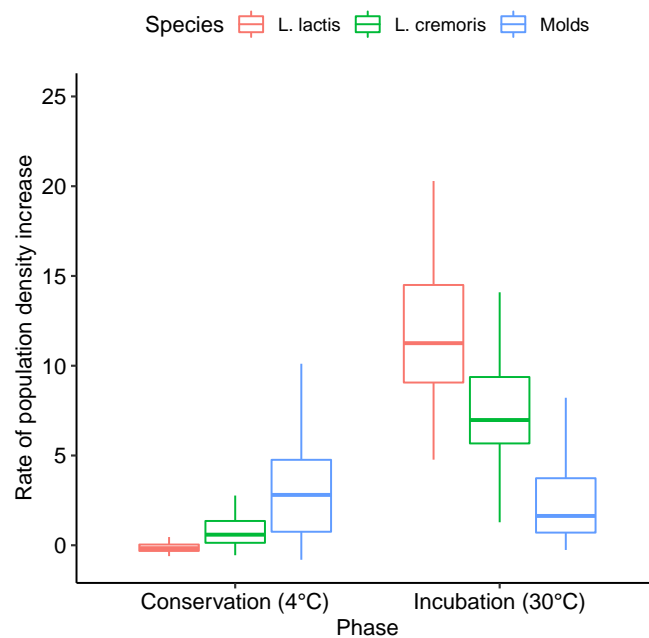


FIGURE 3.10 – Rate of population density increase of *L. lactis* (red), *L. cremoris* (green) and *G. candidum* (blue) during the conservation phase at 4°C and the incubation phase at 30°C. Outliers are not displayed.

had a higher growth rate than the ancestral strains from farmers that generally back-slopped once a week (Figure 3.11 B). No difference in growth rate was detected between farmer 2 ancestral strains and strains evolved under the three back-slopping a week regime. By contrast the growth rate of strains evolved under the once a week back-slopping regime was lower.

The analysis of the final population density after the cold shock did not reveal any differences between *L. cremoris* and *L. lactis*. Its variation was explained only by the treatment, the evolved strains having a higher population density than the initial ones (Figure 3.11 E).

We did not detect an effect of the back-slopping frequency on the final population density, neither on the growth rate, thus we can not conclude that the strains evolved during the in farm evolution experiment

3.3.4 Discussion

Fluctuating environments allows multiple species coexistence

We analyzed the evolution of microbial community during an in farm-experimental evolution to test whether environmental fluctuation may explain the co-existence of microbial species. We used Gwell as a model system, as this fermented product contained two main bacterial species (*L. lactis* and *L. cremoris*), as well as *S. thermophilus* and is maintained in a fluctuating environment (conservation phase at 4°C and incubation phase at 30°C).

In order to confirm that the fluctuation of environments maintains the different species in Gwell, control Gwell were back-slopped once a week and maintained at either 30°C or 4°C during the whole

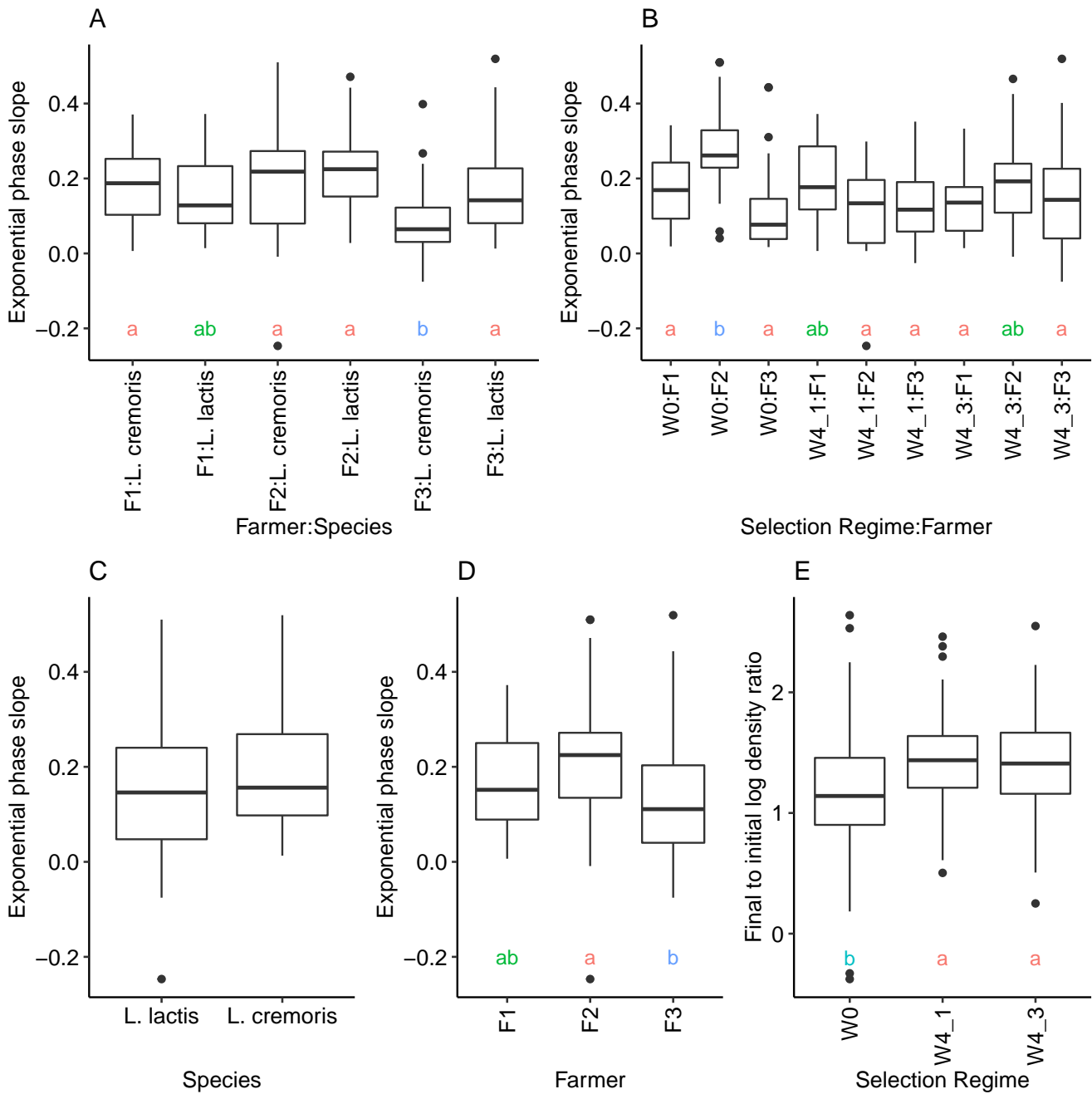


FIGURE 3.11 – Boxplot of the variables significantly explaining variance of the exponential phase growth rate (A, B, C, D) and of the final to initial log density ratio (E). Farmer : F1, F2 and F3 = Farmer 1, 2 and 3 respectively, Selection Regime : W0 = ancestral strains, W4_1 = Strains from week 4 samples back-sloped once a week, W4_3 = Strains from week 4 samples back-sloped three time per week.

experiment. In control conditions where Gwell was back-slopped at 4°C, *L. lactis* and *S. thermophilus* disappeared while *L. cremoris* was maintained, and when Gwell was back-slopped at 30°C, the initial bacterial community was replaced mainly with *Bifidobacterium mongoliense* and/or *Lactobacillaceae* species. The fluctuation of environments maintains the community in a non-equilibrium state, where maintenance at 4°C tends towards elimination of *L. lactis* and *S. thermophilus*, and maintenance at 30°C tends towards total replacement of the microbial community by other species. This results confirmed the well-known theory of Hutchinson's paradox of the plankton [8], where fluctuations of environment prevents any equilibrium to be reached and maintains different microbial species.

We compared the evolution of the microbial community in two selection regimes differing by the frequency of environmental changes (back-slopping once or three times per week). We did not detect species loss or acquisition when the Gwell back-slopping frequency was modified. However we found an effect of the back-slopping frequency on the population density of the different species in Gwell. A higher count of *L. cremoris* and a lower count of *G. candidum* was detected in most of the samples back-slopped three times per week compared to samples back-slopped once per week. It depended however on the farmer, as this pattern was the opposite for farmer2, except in the last week of experiment. The negative correlation between *G. candidum* and *L. cremoris* density may be explained by competition between the two species. Here, niche partitioning can explain their coexistence: *G. candidum* develops at the surface of Gwell and can feed on the milk lipids and proteins but not on lactose [31], while the *Lactococcus* and *Streptococcus* species develop inside the milk matrix and feed mainly on lactose [32, 33].

***L. lactis* and *L. cremoris* adaptation to the two phases of Gwell production**

In the in-farm experimental evolution, *L. cremoris* had a higher rate of population density increase than *L. lactis* during the conservation phase at 4°C while it was the opposite during the incubation phase at 30°C. Moreover, *L. cremoris* mortality was lower than *L. lactis* in control Gwell maintained at 4°C without back-slopping, and its population size did not evolve in control Gwell back-slopped at 4°C while *L. lactis* was not detected anymore. This seems to correspond to a trade-off between short term performances (rate of population density increase at 30°C) and long-term survival (long time conservation at 4°C). This type of trade-off has been shown to affect evolutionary rescue in response to temperature variations [34]. Our study shows that it also matters for species coexistence.

We tested if the higher density of *L. cremoris* in Gwell back-slopped three times per week could be explained by a higher resistance than *L. lactis* to cold shocks. We found a differential growth rate of *L. cremoris* and *L. lactis* in response to the cold shocks treatment, *L. cremoris* growth rate being slightly higher than *L. lactis*. *L. cremoris* is thus not only better adapted than *L. lactis* to conservation at 4°C, but also to cold shocks.

These findings can explain the coexistence of these species with a mechanism that can be considered as temporal niche partitioning [35]. Here, the different environments are heterogeneously distributed in

time and not in space, with the succession of incubation and conservation phases. The adaptation of each *Lactococcus* species to one of these phases allows them to coexist and the frequency of environmental change determines their respective population density.

Evolution of strains during the experimental evolution

Evolved strains reached a higher population density at the end of a laboratory cold shocks experiment than ancestral strains. However, the final population density of strains evolved under a frequency of one or three back-slopping per week could not be distinguished. We could thus not detect divergent phenotypic evolution in response to the change in back-slopping frequency. The number of generations during the experimental evolution may have been too low to detect a phenotypic effect. During the in farm-experimental evolution, the population size increased by approximately ten times during each fermentation phase, which corresponds to less than four generations. There were five fermentation steps for the Gwell back-slopped once per week and 15 for the Gwell back-slopped three times per week, which leads to maximum 20 and 60 generations for the Gwell back-slopped once and three times per week respectively. Even though rapid evolution can occur [36, 37], this number of generations and/or the difference of strength of selection between the two back-slopping conditions may be too low. Moreover, this test was performed in synthetic M17 medium which differs a lot from milk. This medium was chosen as we were only interested on resistance to cold stress. Stress resistances are however inter-related [38], and there may be an interplay between acidic and cold stress resistances, leading to different results in a medium allowing the pH to change.

We can however suspect that there is adaptation to the frequency of back-slopping. Farmer2 strains indeed had a higher growth rate in the cold shocks assay than almost all other strains. This farmer usually makes three Gwell productions per week, it is thus back-slopped three times per week in normal conditions, while the two others generally make one Gwell production per week. Moreover, farmer 2 strains growth rate during the cold shocks assay could not be distinguished from the strains from the same farmer evolved under the three back-slopping per week condition, whereas its strains back-slopped once per week had a lower growth rate. Its strains may thus have been adapted to a higher frequency of cold shocks and be better adapted than the others to the cold shocks assay conditions. Interestingly, farmer 2 Gwell also contained the higher proportion of *L. cremoris*, it was the only one to be superior to 0.5, thus comforting the observation that a higher back-slopping frequency favors *L. cremoris*.

Adaptation to fluctuating temperature has already been shown, for example for bacteria in lakes submitted to fluctuating temperature [39]. *Lactococcus* domestication has been studied concerning adaptation of the species *L. lactis* or *L. cremoris* to the dairy environment with studies showing genomic phenotypic signatures of adaptation [40, 41, 42]. Here, strains adaptation to back-slopping frequency would constitute domestication at a finer scale, with adaptation to a producer's specific practices.

We found a strong farmer effect on the count of the different species in Gwell and on their reaction to the different back-slopping frequencies. This may be linked to intra-specific diversity of *L. cremoris*

and *L. lactis* strains between Gwell, which may be assessed by genomic assays.

Disentangling the effect of fluctuations in temperature and in nutrients availability

We found a higher population density of *L. cremoris* in Gwell back-slopped three times per week than in Gwell back-slopped once per week. In our study, temperature fluctuation from 4°C to 30°C was associated with dilution and input of nutrients (unfermented milk), and the effect of back-slopping frequency on the population density of *L. cremoris* may be explained more by nutrient availability than temperature. The back-slopping is indeed in itself a perturbation, notably because the population size is abruptly lowered and nutrients become available [43]. VRANCKEN et al. [44] have studied sourdough maintained at constant temperature and back-slopped at different frequencies. They have found differences in bacterial community composition depending on the back-slopping frequency, with notably more species in sourdoughs back-slopped less frequently. It was not the case in our study, this difference may be caused by the fluctuations in temperature associated with Gwell back-slopping. In bioreactors used for anaerobic fermentation of food wastes, the short terms fluctuations in temperature did not affect the community composition, but rather its biological activity, while shifts in the community composition were more related to nutrients availability [45]. The effects of back-slopping frequency we observed on community composition are both the results of shifts in temperature and re-feeding, and we cannot directly distinguish both effects. However, the fact that *L. cremoris* was more adapted than *L. lactis* to cold shocks suggests that temperature is relevant to explain its higher density when Gwell is back-slopped more frequently.

Evolution of strains during the experimental evolution

Evolved strains reached a higher population density at the end of the laboratory cold shocks experiment than ancestral strains. However, the final population density of strains evolved under a frequency of one or three back-slopping per week could not be distinguished. We could thus not detect divergent phenotypic evolution in response to the change in back-slopping frequency. Adaptation to fluctuating temperature has already been shown, for example for bacteria in lakes submitted to fluctuating temperature [39]. In our case, the number of generations during the experimental evolution may have been too low to detect a phenotypic effect. During the in farm-experimental evolution, the population size increased by approximately ten times during each fermentation phase, which corresponds to less than four generations. There were five fermentation steps for the Gwell back-slopped once per week and 15 for the Gwell back-slopped three times per week, which leads to maximum 20 and 60 generations for the Gwell back-slopped once and three times per week respectively. Even though rapid evolution can occur [36, 37], this number of generations and/or the difference of strength of selection between the two selection regimes may be too low. Moreover, the cold shock test was performed in synthetic M17 medium which differs a lot from milk. This medium was chosen as we were only interested on resistance to cold stress. The M17 medium is highly buffered and ph only slightly vary. Stress resistances are

inter-related [38], and there may be an interplay between acidic and cold stress resistances, leading to different results than in milk where the pH can change.

We can however suspect that there is a long term adaptation to the frequency of back-slopping. Farmer2 strains indeed had a higher growth rate in the cold shocks assay than almost all other strains. This farmer usually makes three Gwell productions per week (three backslopping per week) , while the two others generally make one Gwell production per week. Moreover, farmers 2 strains growth rate during the cold shocks assay could not be distinguished from the strains from the same farmer evolved under the three back-slopping per week condition suggesting that they were already adapted. By contrast, strains back-slopped once per week had a lower growth rate suggesting they have lost part of their performance in resistance to cold shock. Interestingly, farmer 2 Gwell also contained the higher proportion of *L. cremoris*, it was the only one to have *L. cremoris* at a frequency higher than 0.5, thus comforting the observation that a higher back-slopping frequency favors *L. cremoris*.

Adaptation of *L. lactis* or *L. cremoris* to the dairy environment has been already studied and have shown genomic and phenotypic signatures of domestication by comparing dairy and non dairy strains [40, 41, 42]. Here, we analyzed adaptation to a change of producer's specific practices (back-slopping frequency). We did not find any clear signature of adaptation to different backslopping frequency after 4 weeks of evolution. However, our results suggest that the *Lactococcus* species were adapted to the farmer practices prior the experimental evolution, suggesting long term adaptation to the gwell production process.

To conclude, we showed that Gwell conservation at 4°C and fermentation at 30°C with back-slopping allowed *L. cremoris* and *L. lactis* to coexist. The farmer back-slopping frequency shapes the microbial community by changing species frequency. Finally, we showed that fermenting milk production process can select for cold stress tolerant microbial populations. Overall, our results showed that the diversity of back-slopping practices for the production of fermented food may promote the maintenance of bacterial species and phenotypic diversity.

Acknowledgments

We would like to thank Diego Segond for its help in measuring population densities by flow cytometry, Sylvain Santoni and Audrey Weber for the Illumina sequencing and their valuable advices, as well as Anne-Sophie Bage and Victoria Chuat for their support in the experimental evolution assay.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Bibliographie

- [1] G. E. HUTCHINSON. "The Paradox of the Plankton". In : *The American Naturalist* 95.882 (mai 1961), p. 137-145. ISSN : 0003-0147. DOI : [10.1086/282171](https://doi.org/10.1086/282171) (cf. p. 113).
- [2] B. R. LEVIN, J. ANTONOVICS, H. SHARMA, Bryan Campbell CLARKE, Linda PARTRIDGE, Alan ROBERTSON, Bryan Campbell CLARKE et Linda PARTRIDGE. "Frequency-Dependent Selection in Bacterial Populations". In : *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 319.1196 (juil. 1988), p. 459-472. DOI : [10.1098/rstb.1988.0059](https://doi.org/10.1098/rstb.1988.0059) (cf. p. 113).
- [3] Nick W. SMITH, Paul R. SHORTEN, Eric ALTERMANN, Nicole C. ROY et Warren C. McNABB. "The Classification and Evolution of Bacterial Cross-Feeding". In : *Frontiers in Ecology and Evolution* 7 (2019), p. 153. ISSN : 2296-701X. DOI : [10.3389/fevo.2019.00153](https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00153) (cf. p. 113).
- [4] Melanie GHOUL et Sara MITRI. "The Ecology and Evolution of Microbial Competition". en. In : *Trends in Microbiology* 24.10 (oct. 2016), p. 833-845. ISSN : 0966-842X. DOI : [10.1016/j.tim.2016.06.011](https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.06.011) (cf. p. 113).
- [5] Thomas W. SCHOENER. "Resource Partitioning in Ecological Communities". In : *Science* 185.4145 (juil. 1974), p. 27-39. DOI : [10.1126/science.185.4145.27](https://doi.org/10.1126/science.185.4145.27) (cf. p. 113).
- [6] Zackary I. JOHNSON, Erik R. ZINSER, Allison COE, Nathan P. McNULTY, E. Malcolm S. WOODWARD et Sallie W. CHISHOLM. "Niche Partitioning Among Prochlorococcus Ecotypes Along Ocean-Scale Environmental Gradients". en. In : *Science* 311.5768 (mar. 2006), p. 1737-1740. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1118052](https://doi.org/10.1126/science.1118052) (cf. p. 113).
- [7] Erin J. QUESTAD et Bryan L. FOSTER. "Coexistence through Spatio-Temporal Heterogeneity and Species Sorting in Grassland Plant Communities". en. In : *Ecology Letters* 11.7 (2008), p. 717-726. ISSN : 1461-0248. DOI : [10.1111/j.1461-0248.2008.01186.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01186.x) (cf. p. 113).
- [8] Alexandru HENING et Dang H. NGUYEN. "The Competitive Exclusion Principle in Stochastic Environments". eng. In : *Journal of Mathematical Biology* 80.5 (avr. 2020), p. 1323-1351. ISSN : 1432-1416. DOI : [10.1007/s00285-019-01464-y](https://doi.org/10.1007/s00285-019-01464-y) (cf. p. 113, 130).

- [9] Brendan J.M. BOHANNAN, Ben KERR, Christine M. JESSUP, Jennifer B. HUGHES et Gunnar SANDVIK. "Trade-Offs and Coexistence in Microbial Microcosms". en. In : *Antonie van Leeuwenhoek* 81.1 (déc. 2002), p. 107-115. ISSN : 1572-9699. DOI : [10.1023/A:1020585711378](https://doi.org/10.1023/A:1020585711378) (cf. p. 113).
- [10] Alejandra RODRÍGUEZ-VERDUGO, Clément VULIN et Martin ACKERMANN. "The Rate of Environmental Fluctuations Shapes Ecological Dynamics in a Two-Species Microbial System". en. In : *Ecology Letters* 22.5 (2019), p. 838-846. ISSN : 1461-0248. DOI : [10.1111/ele.13241](https://doi.org/10.1111/ele.13241) (cf. p. 113).
- [11] J. FARGIONE et D. TILMAN. "Competition and Coexistence in Terrestrial Plants". en. In : *Competition and Coexistence*. Sous la dir. d'Ulrich SOMMER et Boris WORM. Ecological Studies. Berlin, Heidelberg : Springer, 2002, p. 165-206. ISBN : 978-3-642-56166-5. DOI : [10.1007/978-3-642-56166-5_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56166-5_7) (cf. p. 113).
- [12] Peter L. CHESSON et Robert R. WARNER. "Environmental Variability Promotes Coexistence in Lottery Competitive Systems". In : *The American Naturalist* 117.6 (juin 1981), p. 923-943. ISSN : 0003-0147. DOI : [10.1086/283778](https://doi.org/10.1086/283778) (cf. p. 113).
- [13] Jyoti P. TAMANG, Koichi WATANABE et Wilhelm H. HOLZAPFEL. "Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages". In : *Frontiers in Microbiology* 7 (mar. 2016). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2016.00377](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377) (cf. p. 113).
- [14] Yann DEMARIGNY, Marion DALMASSO, Aline TONLEU, Véronique RIGOBELLO, Eric BEUVIER, Maï Huong LY-CHATAIN et Yvette BOUTON. "Influence of the Backslopping Practice on the Microbial Diversity of the Lactococcus Population in a Model Cheesemaking". en. In : *Food and Nutrition Sciences* 02.06 (août 2011), p. 618. DOI : [10.4236/fns.2011.26087](https://doi.org/10.4236/fns.2011.26087) (cf. p. 114).
- [15] Martha D. CALVERT, Anne A. MADDEN, Lauren M. NICHOLS, Nick M. HADDAD, Jacob LAHNE, Robert R. DUNN et Erin A. MCKENNEY. "A Review of Sourdough Starters: Ecology, Practices, and Sensory Quality with Applications for Baking and Recommendations for Future Research". In : *PeerJ* 9 (mai 2021), e11389. ISSN : 2167-8359. DOI : [10.7717/peerj.11389](https://doi.org/10.7717/peerj.11389) (cf. p. 114).
- [16] Charles W. BAMFORTH. *Food, Fermentation, and Micro-Organisms*. en. Oxford ; Ames, Iowa : Blackwell Science, 2005. ISBN : 978-0-632-05987-4 (cf. p. 114).
- [17] Kayanush J. ARYANA et Douglas W. OLSON. "A 100-Year Review: Yogurt and Other Cultured Dairy Products". en. In : *Journal of Dairy Science* 100.12 (déc. 2017), p. 9987-10013. ISSN : 0022-0302. DOI : [10.3168/jds.2017-12981](https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981) (cf. p. 114).

- [18] Lucas VON GASTROW, Marie-Noëlle MADEC, Victoria CHUAT, Stanislas LUBAC, Clémence MORINIÈRE, Sébastien LÉ, Sylvain SANTONI, Delphine SICARD et Florence VALENCE. "Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter". en. In : *Microorganisms* 8.7 (juil. 2020), p. 982. DOI : [10.3390/microorganisms8070982](https://doi.org/10.3390/microorganisms8070982) (cf. p. 114, 117, 120).
- [19] Ting Ting LI, Wen Li TIAN et Chun Tao GU. "Elevation of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* to the Species Level as *Lactococcus Cremoris* Sp. Nov. and Transfer of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Tructae* to *Lactococcus Cremoris* as *Lactococcus Cremoris* Subsp. *Tructae* Comb. Nov." en. In : *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (mar. 2021). ISSN : 1466-5026, 1466-5034. DOI : [10.1099/ijsem.0.004727](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004727) (cf. p. 114).
- [20] Delphine PASSERINI, Valérie LAROUTE, Michèle CODDEVILLE, Pascal LE BOURGEOIS, Pascal LOUBIÈRE, Paul RITZENTHALER, Muriel COCAIGN-BOUSQUET et Marie-Line DAVERAN-MINGOT. "New Insights into *Lactococcus Lactis* Diacetyl- and Acetoin-Producing Strains Isolated from Diverse Origins". In : *International Journal of Food Microbiology* 160.3 (jan. 2013), p. 329-336. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023) (cf. p. 114).
- [21] Sara MITRI et Kevin RICHARD FOSTER. "The Genotypic View of Social Interactions in Microbial Communities". In : *Annual Review of Genetics* 47.1 (2013), p. 247-273. DOI : [10.1146/annurev-genet-111212-133307](https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133307) (cf. p. 115).
- [22] Christian NICKELS et Hans LEESMENT. *Methode Zur Differenzierung Und Quantitativen Bestimmung von Säureweckerbakterien*. Carl, 1964 (cf. p. 117).
- [23] R Core TEAM. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2019 (cf. p. 117, 119).
- [24] Benjamin J. CALLAHAN, Paul J. MCMURDIE, Michael J. ROSEN, Andrew W. HAN, Amy Jo A. JOHNSON et Susan P. HOLMES. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". en. In : *Nature Methods* 13.7 (juil. 2016), p. 581-583. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869) (cf. p. 117).
- [25] Frédéric ESCUDIÉ, Lucas AUER, Maria BERNARD, Mahendra MARIADASSOU, Laurent CAUQUIL, Katia VIDAL, Sarah MAMAN, Guillermina HERNANDEZ-RAQUET, Sylvie COMBES et Géraldine PASCAL. "FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution". en. In : *Bioinformatics* 34.8 (avr. 2018), p. 1287-1294. ISSN : 1367-4803. DOI : [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791) (cf. p. 117).
- [26] Christian QUAST, Elmar PRUESSE, Pelin YILMAZ, Jan GERKEN, Timmy SCHWEER, Pablo YARZA, Jörg PEPLIES et Frank Oliver GLÖCKNER. "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools". In : *Nucleic Acids Research* 41.Database issue (jan. 2013), p. D590-D596. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219) (cf. p. 118).

- [27] Rolf Henrik NILSSON, Karl-Henrik LARSSON, Andy F. S. TAYLOR, Johan BENGTTSSON-PALME, Thomas S. JEPPESEN, Dmitry SCHIGEL, Peter KENNEDY, Kathryn PICARD, Frank Oliver GLÖCKNER, Leho TEDERSOO, Irja SAAR, Urmas KÕLJALG et Kessy ABARENKOV. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications". en. In : *Nucleic Acids Research* 47.D1 (jan. 2019), p. D259-D264. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022) (cf. p. 118).
- [28] Paul J. MCMURDIE et Susan HOLMES. "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data". en. In : *PLOS ONE* 8.4 (avr. 2013), e61217. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217) (cf. p. 118).
- [29] B ELLIS, P HAALAND, F HAHNE, N LE MEUR, N GOPALAKRISHNAN, J SPIDLEN, M JIANG et G FINAK. *flowCore: Basic Structures for Flow Cytometry Data*. 2021 (cf. p. 119).
- [30] Vito M. R. MUGGEO. "Testing with a Nuisance Parameter Present Only under the Alternative: A Score-Based Approach with Application to Segmented Modelling". In : *Journal of Statistical Computation and Simulation* 86.15 (oct. 2016), p. 3059-3067. ISSN : 0094-9655. DOI : [10.1080/00949655.2016.1149855](https://doi.org/10.1080/00949655.2016.1149855) (cf. p. 119).
- [31] R. BOUTROU et M. GUÉGUEN. "Interests in *Geotrichum Candidum* for Cheese Technology". en. In : *International Journal of Food Microbiology* 102.1 (juin 2005), p. 1-20. ISSN : 01681605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028) (cf. p. 130).
- [32] J. M. HARDIE et R. A. WHILEY. "The Genus *Streptococcus*". en. In : *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Sous la dir. de B. J. B. WOOD et W. H. HOLZAPFEL. The Lactic Acid Bacteria. Boston, MA : Springer US, 1995, p. 55-124. ISBN : 978-1-4615-5817-0. DOI : [10.1007/978-1-4615-5817-0_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_4) (cf. p. 130).
- [33] M. TEUBER. "The Genus *Lactococcus*". en. In : *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Sous la dir. de B. J. B. WOOD et W. H. HOLZAPFEL. The Lactic Acid Bacteria. Boston, MA : Springer US, 1995, p. 173-234. ISBN : 978-1-4615-5817-0. DOI : [10.1007/978-1-4615-5817-0_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_6) (cf. p. 130).
- [34] Martta LIUKKONEN, Ilkka KRONHOLM et Tarmo KETOLA. "Evolutionary Rescue at Different Rates of Environmental Change Is Affected by Trade-Offs between Short-Term Performance and Long-Term Survival". eng. In : *Journal of Evolutionary Biology* (mai 2021). ISSN : 1420-9101. DOI : [10.1111/jeb.13797](https://doi.org/10.1111/jeb.13797) (cf. p. 130).
- [35] Karissa O. LEAR, Nicholas M. WHITNEY, John J. MORRIS et Adrian C. GLEISS. "Temporal Niche Partitioning as a Novel Mechanism Promoting Co-Existence of Sympatric Predators in Marine Systems". In : *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 288.1954 (juil. 2021), p. 20210816. DOI : [10.1098/rspb.2021.0816](https://doi.org/10.1098/rspb.2021.0816) (cf. p. 130).

- [36] Simon P. HART, Martin M. TURCOTTE et Jonathan M. LEVINE. "Effects of Rapid Evolution on Species Coexistence". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.6 (fév. 2019), p. 2112-2117 (cf. p. 131, 132).
- [37] Ina BODINAKU, Jason SHAFFER, Allison B. CONNORS, Jacob L. STEENWYK, Megan N. BIANGO-DANIELS, Erik K. KASTMAN, Antonis ROKAS, Albert ROBBAT et Benjamin E. WOLFE. "Rapid Phenotypic and Metabolomic Domestication of Wild *Penicillium* Molds on Cheese". In : *mBio* 10.5 (2019), e02445-19. DOI : [10.1128/mBio.02445-19](https://doi.org/10.1128/mBio.02445-19) (cf. p. 131, 132).
- [38] Effie TSAKALIDOU et Konstantinos PAPADIMITRIOU, éd. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. en. Food Microbiology and Food Safety. New York : Springer, 2011. ISBN : 978-0-387-92770-1 978-0-387-92771-8 (cf. p. 131, 133).
- [39] A.C. UPTON, D.B. NEDWELL et D.D. WYNN-WILLIAMS. "The Selection of Microbial Communities by Constant or Fluctuating Temperatures". In : *FEMS Microbiology Letters* 74.4 (déc. 1990), p. 243-252. ISSN : 0378-1097. DOI : [10.1111/j.1574-6968.1990.tb04070.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb04070.x) (cf. p. 131, 132).
- [40] Daniel CAVANAGH, Gerald F. FITZGERALD et Olivia MCAULIFFE. "From Field to Fermentation: The Origins of *Lactococcus Lactis* and Its Domestication to the Dairy Environment". In : *Food Microbiology* 47.Supplement C (mai 2015), p. 45-61. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001) (cf. p. 131, 133).
- [41] Herwig BACHMANN, Marjo J.C. STARRENBURG, Douwe MOLENAAR, Michiel KLEEREBEZEM et Johan E.T. VAN HYLCKAMA Vlieg. "Microbial Domestication Signatures of *Lactococcus Lactis* Can Be Reproduced by Experimental Evolution". In : *Genome Research* 22.1 (jan. 2012), p. 115-124. ISSN : 1088-9051. DOI : [10.1101/gr.121285.111](https://doi.org/10.1101/gr.121285.111) (cf. p. 131, 133).
- [42] Delphine PASSERINI, Charlotte BELTRAMO, Michele CODDEVILLE, Yves QUENTIN, Paul RITZENTHALER, Marie-Line DAVERAN-MINGOT et Pascal Le BOURGEOIS. "Genes but Not Genomes Reveal Bacterial Domestication of *Lactococcus Lactis*". en. In : *PLOS ONE* 5.12 (déc. 2010), e15306. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0015306](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015306) (cf. p. 131, 133).
- [43] Caroline B. TURNER, Sean W. BUSKIRK, Katrina B. HARRIS et Vaughn S. COOPER. "Negative Frequency-Dependent Selection Maintains Coexisting Genotypes during Fluctuating Selection". en. In : *Molecular Ecology* 29.1 (2020), p. 138-148. ISSN : 1365-294X. DOI : [10.1111/mec.15307](https://doi.org/10.1111/mec.15307) (cf. p. 132).
- [44] Gino VRANCKEN, Tom RIMAU, Stefan WECKX, Frédéric LEROY et Luc De VUYST. "Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation". en. In : *Applied and Environmental Microbiology* 77.8 (avr. 2011), p. 2716-2726. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.02470-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02470-10) (cf. p. 132).

- [45] Qin YU, Lei FENG et Xiaofei ZHEN. "Effects of Organic Loading Rate and Temperature Fluctuation on the Microbial Community and Performance of Anaerobic Digestion of Food Waste". en. In : *Environmental Science and Pollution Research* 28.11 (mar. 2021), p. 13176-13187. ISSN : 1614-7499. DOI : [10.1007/s11356-020-11548-8](https://doi.org/10.1007/s11356-020-11548-8) (cf. p. 132).

3.4 "Hotline Gwell" : Analyse de Gwell en cours de perte

Afin de comprendre les causes de perte du Gwell, j'ai proposé aux producteurs de Gwell de systématiquement envoyer un échantillon lorsqu'ils constatent que leur ferment est en cours de perte. Ces échantillons ont été analysés par Marie-Noelle Madec au CIRM-BIA.

3.4.1 Protocole d'analyse

Dénombrement des microorganismes par culture

Les dénombrements ont été réalisés de la même manière que détaillé dans le matériel et méthodes de la Section 2.3. Les dénombrements ont été réalisés sur les milieux KCA, OGA, BHI, M17, et VRBL (Violet Red Bile Lactose). Ce dernier milieu permet de dénombrier les coliformes, et la méthode d'ensemencement était différente des autres milieux : à partir des dilutions en cascade, 1 mL des dilutions (10^{-1} à 10^{-4}) a été inoculé dans la masse de la gélose VRBL. Les colonies ont été comptées après 24 heures d'incubation à 30°C en aérobiose.

Suivi du pH

Les courbes de pH ont été obtenues de la même manière que dans la Section 2.3.

3.4.2 Résultats et interprétations

Nous avons reçu 5 échantillons de Gwell de 5 fermes différentes, en cours de perte ou jugés non typiques par les producteurs. Les résultats sont compilés dans le Tableau 3.4. Deux des cinq Gwell (ceux obtenus le 08/01/2020 et le 18/09/2020) avaient des caractéristiques microbiologiques classiques de Gwell : un ordre de grandeur du nombre de *L. lactis* et *L. cremoris* de 10^8 CFU/mL et des moisissures en dessous de 10^4 CFU/mL. L'échantillon du 07/02/2020 présentait un pH de 4.75, plus élevé que la normale pour les Gwell, qui sont typiquement autour de 4.2, ainsi qu'un grand nombre de coliformes ($3.2 * 10^6$ CFU/mL), et un faible nombre de lactocoques, d'un ordre de grandeur de 10^7 . L'échantillon du 28/09/2020 présentait un faible nombre de *L. cremoris* ($3.0 * 10^6$ CFU/mL), et un fort nombre de *S. thermophilus* ($3.0 * 10^8$ CFU/mL). Enfin, l'échantillon du 24/06/2020 n'était pas considéré en cours de perte car il avait une vitesse d'acidification classique, mais ses caractéristiques organoleptiques n'étaient pas typiques d'un Gwell. Aucune colonie de *L. lactis* n'a pu y être détecté.

La diminution de la densité de population de *L. cremoris* est associée à une acidification réduite et entraîne la perte du Gwell. *L. cremoris* est en effet la principale espèce responsable de l'acidification du Gwell (cf. Section 2.3). Cette baisse de densité de population peut être liée à une contamination par des coliformes, qui peuvent entrer en compétition avec les lactocoques. La perte de *L. lactis* n'est pas liée à une baisse d'acidification mais à une perte de typicité du Gwell. Cette espèce, représentée uniquement par le biovar *diacetylactis* de la sous-espèce *lactis* dans le Gwell, est responsable de la production d'arômes

| Date | 08/01/2020 | 07/02/2020 | 24/06/2020 | 18/09/2020 | 28/09/2020 |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|---|-----------------------|
| Problème rencontré | Acidification réduite | Acidification réduite | Goût non typique | Acidification réduite, Goût non typique | Acidification réduite |
| pH | NA | 4.75 | 4.2 | 3.96 | 4.35 |
| <i>L. cremoris</i> | $1.1 * 10^8$ | $2.0 * 10^7$ | $8.0 * 10^8$ | $1.7 * 10^8$ | $3.0 * 10^6$ |
| <i>L. lactis</i> | $3.2 * 10^8$ | $1.1 * 10^7$ | $< 1 * 10^5$ | $2.2 * 10^8$ | $1.2 * 10^8$ |
| Streptocoques | $6.0 * 10^7$ | $1.0 * 10^8$ | $4.0 * 10^3$ | $2.0 * 10^7$ | $3.0 * 10^8$ |
| Moisissures | $1.3 * 10^3$ | $6.0 * 10^6$ | $1.6 * 10^4$ | $1.8 * 10^4$ | $9.0 * 10^3$ |
| Coliformes | NA | $3.6 * 10^6$ | < 10 | NA | NA |

Tableau 3.4 – Résultats de mesure de pH et de dénombrement des Gwell obtenus dans le cadre de la Hotline Gwell. Les données de dénombrement de microorganismes sont en CFU/mL. Les NA indiquent des données manquantes.

dont le diacetyl (cf. Section 2.3). Enfin, d'autres causes de perte du Gwell doivent être recherchées, étant donné que 2 des 5 échantillons avaient des caractéristiques microbiologiques similaires à celles de Gwell jugé typiques. Cette observation révèle que la perte du Gwell est un processus multi-factoriel.

Chapitre 4

Processus de recherche participative et échanges de savoirs

J'ai adopté dans ma thèse deux démarches différentes de recherche en lien avec la société civile : une de recherche action participative avec les producteurs de Gwell au cours de laquelle ils ont co-construit la question, participé aux expérimentations scientifiques et à l'obtention des résultats, et une de science participative dans laquelle les producteurs de Gwell et les boulangers ont partagé leur savoir et leurs ressources biologiques sans participer aux expérimentations.

4.1 Échanges avec les producteurs de Gwell

4.1.1 Historique de l'organisation des producteurs de Gwell

La marque Gwell a été déposée en 1999 par la Société des Éleveurs de Bretonne Pie Noir, devenue en 2006 l'Union Bretonne Pie Noir (UBPN), qui est l'organisme de sélection de la race Bretonne Pie Noir, dont le lait sert à faire le Gwell. Un premier cahier des charges de production du Gwell a été défini en 2014. L'UBPN a notamment porté un projet financé par la commission européenne intitulé "Preparatory actions on EU plant and animal genetic resources in agriculture", qui visait à sécuriser la production du Gwell. A partir de 2019, les éleveurs ont créé l'Association des Paysans Producteurs de Gwell (APPG), qui a alors remplacé l'UBPN dans la gestion de la marque Gwell. L'APPG porte la demande d'AOP pour le Gwell et sera son organisme de gestion.

Au sein de l'UBPN et maintenant de l'APPG, un animateur, Stanislas Lubac, est chargé de coordonner les actions et le dépôt des différents dossiers. Il a servi d'intermédiaire et coordonné les échanges entre les chercheurs INRAE et les éleveurs, et a également participé à la rédaction et la relecture des documents de synthèse des résultats qui leur ont été transmis.

4.1.2 Expérimentation sur le repiquage du Gwell

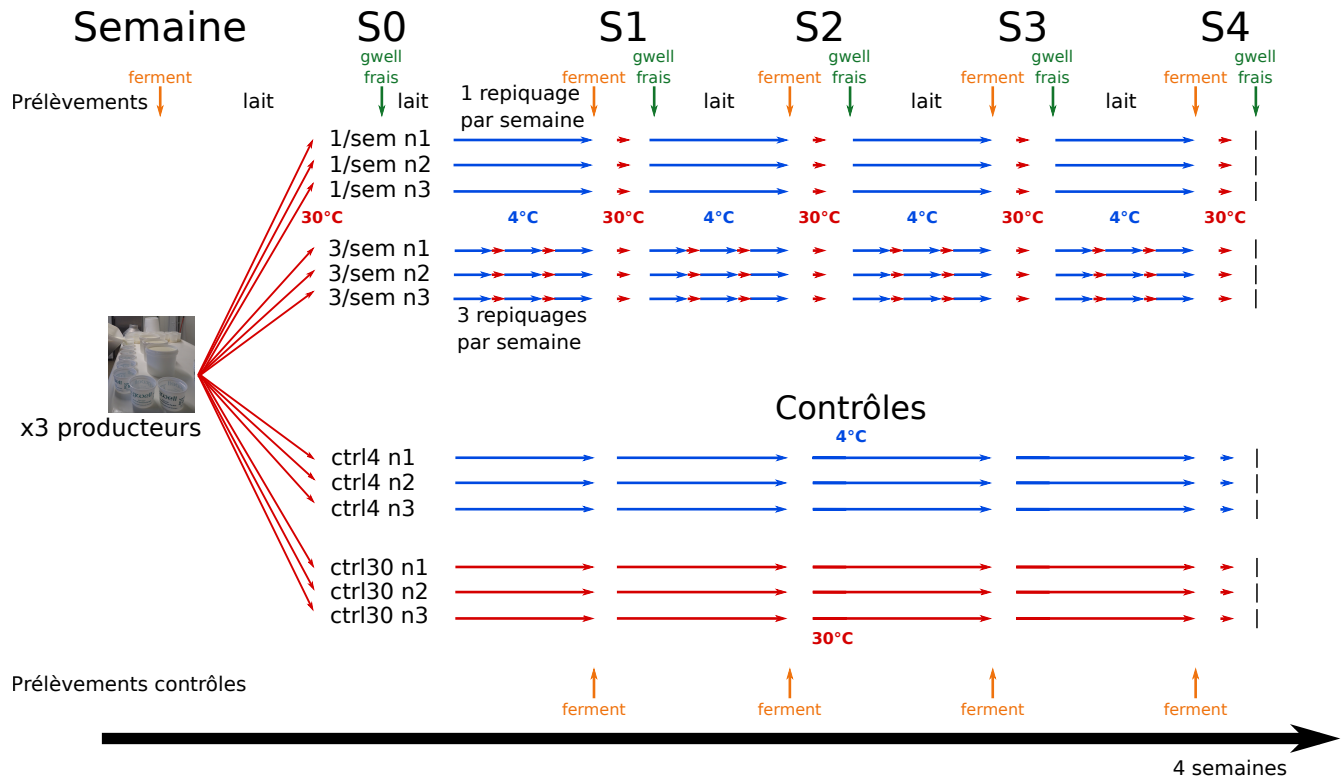
C'est dans le cadre de l'expérimentation sur la fréquence de repiquage du Gwell que les chercheurs du laboratoire et moi-même avons eu le plus d'échanges avec les producteurs de Gwell.

Élaboration de la question de recherche et du dispositif expérimental avec les producteurs

L'expérimentation sur l'évolution de la communauté microbienne du Gwell en fonction de sa fréquence de repiquage a été élaborée depuis sa conception avec les éleveurs. L'idée de départ de tester l'effet de la fréquence de repiquage trouve son origine dans des entretiens semi-directifs avec treize éleveurs que j'ai réalisés dans le cadre de mon stage de Master2. L'objectif de ce stage était de trouver une solution de conservation du Gwell qui ne dénature pas le produit, d'un point de vue microbiologique et des caractéristiques organoleptiques du produit fini, mais également en conservant l'identité paysanne du produit. Après avoir envisagé d'utiliser des souches pures sélectionnées à partir de Gwell, les éleveurs ont finalement décidé de travailler à conserver le Gwell en tant que levain indigène entretenu à la ferme, et mon travail a alors consisté à trouver des méthodes de conservation du Gwell dans son ensemble. J'ai testé différentes méthodes de congélation pour voir si elles permettaient de conserver le Gwell sur le long terme. Il est apparu que la conservation du Gwell par congélation n'était qu'un aspect de la conservation du Gwell, et que les échanges de ferments entre producteurs en constituaient un second, et la compréhension des évolutions du ferment pour éviter de le perdre un troisième. C'est sur ce troisième axe que je me suis penché lors de ma thèse, et plusieurs éleveurs ayant évoqué qu'un repiquage trop fréquent du ferment pouvait mener à sa perte, j'ai proposé d'étudier l'influence de la fréquence de repiquage sur l'évolution de la communauté microbienne du Gwell.

Le choix de cette problématique et la mise en place du protocole, l'étude de sa faisabilité et l'évaluation de son intérêt ont été discutés lors d'une réunion téléphonique avec six éleveurs intéressés à participer. Les discussions ont été menées sur la base d'une ébauche de protocole que j'ai présenté en début de réunion, dont le schéma d'expérimentation est présenté figure 4.1.

Plusieurs problématiques ont été soulevées, comme l'échelle de production et la lourdeur des expérimentations. L'essai d'évolution expérimentale nécessitait en effet une production en petit volume, qui est adaptée à des producteurs qui ne produisent pas beaucoup de Gwell ce qui limitait les possibilités de participation. L'intérêt de faire des répliqués a été questionné et il a été décidé de les maintenir. Les discussions les plus importantes ont portées sur la remise en question de l'intérêt de la question scientifique et de l'expérimentation en elle-même. Certains éleveurs considéraient que le résultat était déjà connu du fait des observations de perte de Gwell en cas de repiquages rapprochés. Ils préféraient notamment mener des expérimentations concernant l'analyse de la spécificité des Gwell de chaque producteur, un des éleveurs souhaitant explorer d'un point de vue microbiologique et physico-chimique ce qui fait que son Gwell "est [son] Gwell", et comment les microorganismes co-évoluent avec lui. D'autres auraient voulu travailler à la mise en place d'essais de congélation en conditions réelles de production pour conserver le Gwell. Cependant, d'autres ont mis en avant des résultats d'analyses préliminaires que



Prélèvements :
 (1ferment_T0 + 4Gw.frais_T0 +
 (2 conditions * (4ferments + 4Gw.frais) +
 2 ctrl*4 ferments) *
 3 réplicats = 77
 * 3 éleveurs = **231 échantillons**
 + 5x 150mL lait

FIGURE 4.1 – Schéma de l'expérimentation sur la fréquence de repiquage du Gwell. A chaque semaine de production, un ferment et un Gwell frais a été prélevé, et le pH a été suivi dans chaque échantillon lors de l'incubation à 30°C. Le lait utilisé a également été prélevé pour analyses et conservation d'échantillons. Les repiquages intermédiaires des Gwell repiqués trois fois par semaine n'ont pas été analysés. Après discussion avec les éleveurs, les contrôles à 4°C et 30°C ont été réalisés au laboratoire avec le même lait que celui utilisé pour les repiquages en fromagerie, refroidi à 4°C.



FIGURE 4.2 – Expérimentation en fromagerie

j'avais effectué et dont j'avais transmis les résultats, qui tendaient à montrer que fréquence de repiquage joue sur la proportion de deux espèces *L. lactis* et *L. cremoris*, ce qui justifiait selon eux de réaliser cette expérimentation afin d'avoir un résultat solide et fiable de l'impact de la fréquence du repiquage sur la stabilité du Gwell. Ce qui a définitivement validé l'intérêt de l'expérience aux yeux de tous est le fait qu'un éleveur ait révélé qu'il repique son Gwell en routine trois fois par semaine sans perdre son Gwell. Les autres pensaient que ce n'était pas possible et mènerait forcément à la perte du Gwell. Ce débat a donc remis en question les certitudes sur l'effet de repiquages rapprochés sur la perte du Gwell et a donc justifié l'intérêt de l'expérimentation. Les bases du protocole ainsi que le choix des trois éleveurs participants ont été définis lors de cette réunion, et la mise en place du protocole détaillé a été remise à une prochaine réunion. Celle-ci s'est déroulée avec l'équipe du laboratoire et Stanislas, qui portait la voix des éleveurs et se chargeait de leur faire un retour. Ceci a permis de trouver un équilibre entre les expérimentations à effectuer au laboratoire et celles qui seraient faites en fromagerie. Notamment, il a été décidé de réaliser les contrôles à 4°C et 30°C (cf. Figure 4.1) au laboratoire afin de limiter la quantité de manipulation et dans l'atelier de transformation.

Analyse et diffusion des résultats

Les producteurs ont pu attester que les Gwell produits étaient typiques tout au long de l'expérimentation, quelle que soit la fréquence de repiquage. Nous n'avons pas réalisé d'analyse sensorielle avec un cadre et un protocole bien défini, cependant des discussions lors de dégustations informelles des échan-

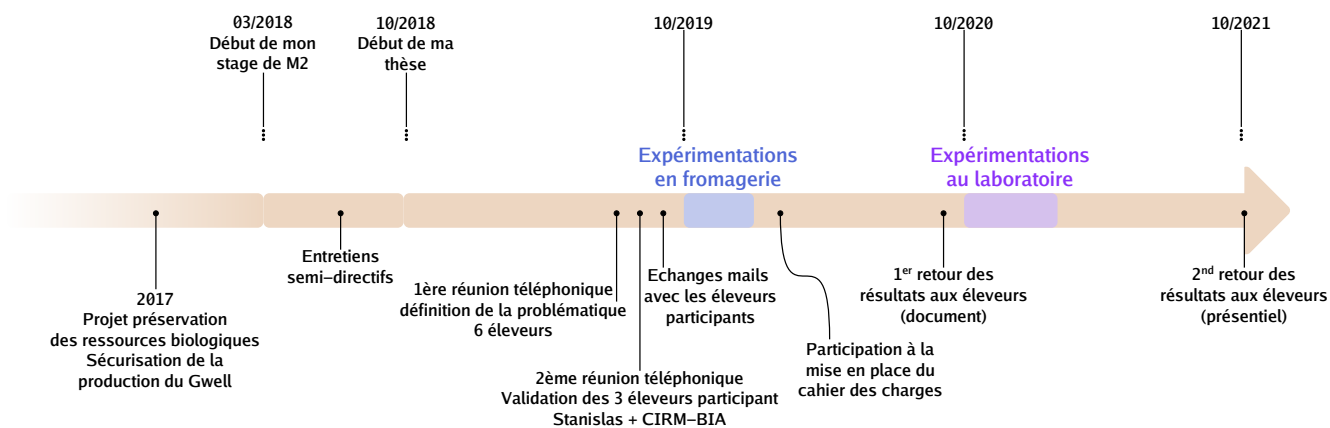


FIGURE 4.3 – Ligne du temps des échanges avec les producteurs autour de la construction et la réalisation de l’essai d’évolution expérimentale sur la fréquence de repiquage du Gwell.

tillons en surplus, sur le temps du repas notamment, ont permis de vérifier que les laits fermentés lors de l’expérimentation présentaient toujours les caractéristiques organoleptiques typiques du Gwell. Sans protocole d’analyse bien établi, nous n’avons cependant pas pris en compte d’éventuelles différences sensorielles perçues entre les Gwell produits dans les différentes conditions. En ce sens, la connaissance des éleveurs de leur produit a été précieuse pour vérifier que les conditions d’expérimentation ne modifiaient pas outre mesure l’objet étudié. A l’exception des mesures de pH, les données analytiques sur les échantillons nécessitaient du matériel lourd (grand nombre de boîtes de Pétri : plus de 3000 sur l’ensemble de l’expérimentation, séquençage Illumina) et ont donc été réalisées au laboratoire. Leur exploitation nécessitait des connaissances en statistique et en bio-informatique qui n’étaient pas aisées à partager. J’ai produit un document synthétique présentant les résultats (annexe D), qui a été diffusé aux éleveurs. Je n’ai pas eu l’occasion de les présenter en présentiel du fait des restrictions de déplacements liés à la Covid, les échanges ont donc été limités concernant les résultats de ces travaux. Une présentation et un temps d’échanges est cependant prévu lors de l’assemblée générale de l’APPG le 26 octobre 2021.

4.1.3 Participation aux discussions techniques sur le cahier des charges du Gwell

J’ai participé en février 2020 à une réunion de travail sur la mise en place du cahier des charges de production du Gwell dans le cadre de la demande d’une AOP. Certains résultats obtenus dans l’essai d’évolution expérimentale ont été utilisés, par exemple pour définir le pH minimal à atteindre pour que le produit soit jugé consommable ou pour définir le temps maximal de conservation d’un Gwell avant repiquage.

4.2 Echanges de savoirs avec les boulangers

Les échanges de savoir avec les boulangers ont bénéficié de plusieurs projets de recherche participative qui avaient été initiés avant mon arrivée en thèse : le projet ANR BAKERY (2014-2018) et le projet Fondation de France "Gluten : mythe ou réalité" (2017-2021).

Le premier projet (BAKERY) a rassemblé plus de 40 boulangers et paysan-boulangers, deux associations de paysans (le Réseau semence paysanne et Triptolème), l'institut technique d'agriculture biologique (ITAB), deux centres de ressources biologiques microbiennes (CIRM-BIA et CIRM-Levure) ainsi que d'autres équipes de recherche de disciplines variées (microbiologie : ONIRIS, UMR SPO, génétique végétale : UMR GQE-Le Moulon, agronomie : BAGAP, psychosociologie : UBO). Il avait pour objectif d'étudier la diversité des pratiques boulangères et la diversité microbienne des levains dans la filière boulangerie à faible intrant en France. Le processus de recherche participative et de partage de savoirs entre tous les participants s'est construit tout au long du projet, en s'améliorant avec les rencontres et l'expression des besoins. Les échanges de savoirs et la communication des résultats du projet se sont poursuivis après la fin du projet. Un glossaire de la panification au levain a été écrit collectivement en réponse à un besoin de mieux comprendre ce que chacun met derrière chaque mot et a été l'occasion d'échanger les savoirs scientifiques et empiriques. D'autres besoins ont émergé, comme celui d'informer les consommateurs au fournil sur le fonctionnement de la filière de la panification au levain et des résultats du projet. Plusieurs boulangers ont proposé l'idée de faire un poster pour les fournils. Enfin, des rencontres entre professionnels, paysans, boulangers, chercheurs ont permis de maintenir en partie une dynamique d'échanges.

Le second projet ("[Gluten, Mythe ou Réalité ?](#)") regroupait également à la fois des paysans, meuniers, boulangers, pastiers, une association (BIOCIVAM11) et des chercheurs de différentes disciplines : agronomie (UE Diascope), procédé de transformation (UMR IATE), microbiologie (UMR SPO), sociologie (UMR Innovation). Ce projet a émergé de la question sociétale autour des intolérances au gluten. Il s'est déroulé parallèlement à ma thèse. J'ai analysé les levains du collectif boulangers du projet. Ce projet concentré sur la région Occitanie m'a donné l'occasion de participer à plusieurs événements d'échange de savoirs et formation à destination des boulangers.

4.2.1 Poster sur la panification au levain

Suite à une demande émanant des boulangers d'un projet de recherche participative BAKERY, j'ai participé à la réalisation d'un poster retraçant les différentes étapes de la panification au levain (annexe F). Le poster a ensuite été diffusé aux scientifiques et à tous les boulangers participants au projet BAKERY (plus d'une quarantaine) ainsi que comme flyer dans des événements grand public.

Ce poster a été réalisé avec des partenaires du projet BAKERY, avec l'aide de Juliane Bianco, étudiante en licence que j'ai encadré en stage, qui a participé à la rédaction du contenu et a produit l'ensemble des illustrations. Il est à destination d'un public large comprenant notamment les clients des

boulangeries. Il devait pouvoir être utilisé par les boulangers du projet comme un outil pédagogique pour présenter à leurs clients les principales étapes de la panification, expliquer ce qu'est le levain, et présenter la principale conclusion du projet Bakery, à savoir que la diversité microbienne des levains est liée à la diversité des pratiques de panification. J'ai participé au choix et à la rédaction du contenu ainsi qu'à la mise en forme du poster, depuis le début de sa conception jusqu'à sa réalisation finale.

4.2.2 Formations destinées aux boulangers

J'ai participé à l'animation de plusieurs formations à destination de boulangers impliqués dans projet de recherche Gluten : mythe ou réalité.

Une première s'est déroulée en juillet 2019, et a été l'occasion de présenter les premiers résultats obtenus dans le cadre du projet "Gluten, Mythe ou Réalité?". J'ai analysé la composition microbienne des levains de 24 boulangers dans le cadre de ce projet, dont les résultats sont présentés dans la partie 2.2. J'ai pu présenter aux boulangers la composition microbienne de leur levain, ce qui a été l'occasion de présenter les principaux microorganismes présents dans un levain ainsi que leurs rôles respectifs avec les différentes fermentations qu'ils réalisent. Suite aux retours et aux interrogations qui subsistaient après cette présentation, j'ai produit un document synthétique qui explique les différentes notions utilisées et qui présente la diversité biologique et physico-chimique de l'ensemble des levains analysés. Ce document est présenté en annexe E.

J'ai également organisé une analyse sensorielle des levains lors de cette formation, l'objectif étant de générer une grille de description des levains avec les boulangers et de caractériser la diversité sensorielle des levains. La grille d'analyse des levains a été générée par comparaison de levains trois par trois, grâce à une méthode hybride entre un test triangulaire et du tri libre. Par groupe, les participants devaient trouver une caractéristique commune à deux des trois levains présentés mais différente dans le troisième. Ceci a été répété 3 fois par groupe avec à chaque fois trois levains différents, puis les descripteurs ont été regroupés jusqu'à en retenir huit. Ces descripteurs constituent les 8 axes permettant de décrire les levains, ils sont présentés dans le tableau 4.1.

Chaque levain a ensuite été pris séparément et une note entre 0 et 5 lui a été attribuée pour chacun des axes générés. Le tableau ainsi produit a permis de générer une Analyse en Composantes Principales (ACP), permettant de regrouper les levains (figure 4.4).

Trois groupes de levains ont pu être distingués, l'un comprenant trois levains plutôt fermes et hétérogènes, un autre quatre levains bruns au goût céréalé, et un dernier composé d'un seul levain au goût acétique et à l'odeur peu fruitée. Cette grille d'analyse des levains, définie à partir d'un échantillon de seulement 8 levains, peut être complétée et améliorée pour servir de base pour décrire les levains. Cet essai a permis de mettre en évidence la diversité sensorielle des levains.

Une seconde restitution des résultats du projet "Gluten, Mythe ou Réalité?" s'est déroulée en juin 2021.

| Sens mobilisé | Axe |
|---------------|-------------------------|
| Vue | Pas actif <-> Actif |
| | Blanc <-> Brun |
| | Liquide <-> Ferme |
| | Homogène <-> Hétérogène |
| Odeur | Pas fruité <-> Fruité |
| | Pas acide <-> Acide |
| Goût | Lactique <-> Acétique |
| | Pas céréalé <-> Céréalé |

Tableau 4.1 – Liste des axes générés lors de l’analyse sensorielle des levains. Chaque axe a été généré en comparant trois levains en cherchant une caractéristique commune à deux des trois levains qui les différencie du troisième.

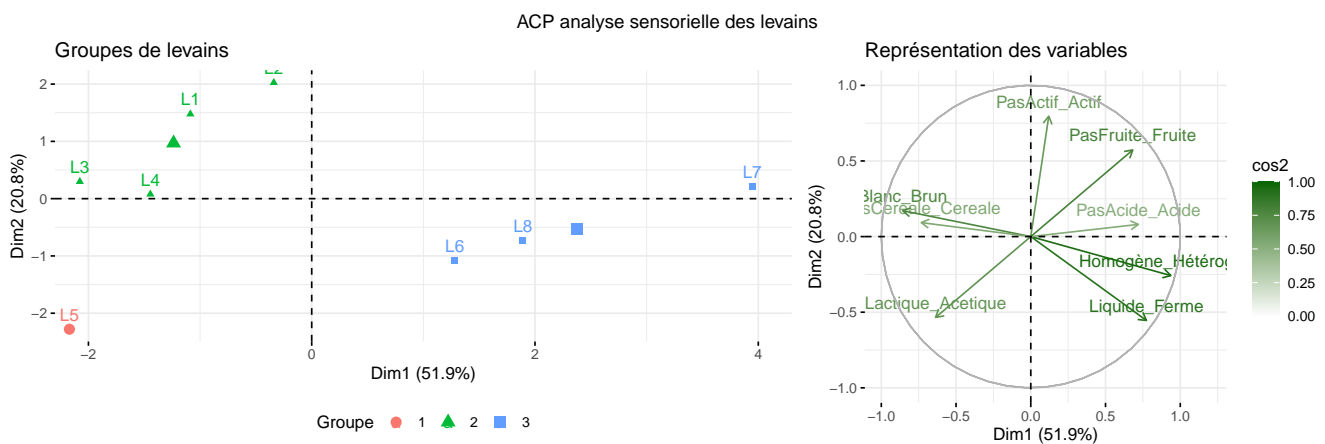


FIGURE 4.4 – ACP des levains sur la base de l’analyse sensorielle.



FIGURE 4.5 – Discussions lors de la formation de février 2020

Enfin, j'ai participé à une rencontre chez Julie et Floriant à la ferme du Clos Maen-li, Molac, Morbihan du 22 au 24 février 2020. Cette rencontre consistait en un cycle d'expérimentations autour des levains. Les objectifs étaient les suivants :

- Actualiser et intégrer des connaissances sur l'impact de la biodiversité des levains dans la fabrication du pain, sur les caractéristiques des pâtes et des pains.
- Restituer les résultats du projet BAKERY auquel avaient participé les paysans-boulangers et l'association organisatrice de la rencontre (Triptolème).
- Relancer les démarches d'expérimentation initiées par l'association dans le cadre d'un projet "PaysBlé" qui s'est déroulé en Bretagne de 2009 à 2012.
- S'approprier du vocabulaire nouveau pour les démarches d'expérimentations, notamment sur la caractérisation des levains, farines et blés.

Nous avons organisé une analyse sensorielle de levains, qui a révélé un vocabulaire riche pour décrire les levains. Cet essai a mis en lumière la nécessité de mettre ce vocabulaire en commun pour mieux partager les descriptions des levains et ce faisant, les pratiques liées à leur entretien. Ces échanges ont été l'occasion de découvrir une grande diversité de méthodes d'entretien et de conservation du levain, certains boulangers le conservant au réfrigérateur, d'autres séché en plaques, ou encore en boule conservées dans un sac de farine. Ensuite, différents tests ont été présentés, permettant d'obtenir des informations sur les caractéristiques de la farine, ainsi que sur celles du gluten lors de la préparation de la pâte. Enfin, une expérimentation a été menée avec les boulangers participant pour tester deux farines (un mélange de blés de Redon, et un autre de blé anciens de Bourgogne) avec deux procédés de multiplication du levain (rafraîchis avant la panification avec un levain peu ou très hydraté). Les



FIGURE 4.6 – Prise de repères sur les caractéristiques de la pâte (collant, élasticité, extensibilité) lors de la formation.

différents pains n'ont cependant pas pu être distingués d'un point de vue sensoriel, certainement du fait de la faible taille du jury (18 dégustateurs). Des tendances se dégagent tout de même, le pain préparé avec un levain liquide avait une acidité plus marquée que celui préparé avec un levain ferme, et la variété de blé influençait la souplesse de la mie et la richesse aromatique.

4.2.3 Ateliers de médiation et de vulgarisation scientifique à destination d'un large public

J'ai participé à plusieurs ateliers de vulgarisation ou de médiation scientifique sur le levain. La vulgarisation scientifique consiste à expliquer des termes ou des résultats scientifiques à un public qui reçoit l'information. Elle implique une hiérarchie entre le scientifique et le public, et l'échange ne s'y fait que dans un sens, du scientifique vers le public. La médiation scientifique consiste en un échange sans hiérarchisation des savoirs. La vulgarisation scientifique peut typiquement prendre la forme de conférence, ou d'articles à destination d'un public large, alors que la médiation scientifique peut se faire sous forme d'ateliers où le public et l'animateur échangent et apprennent par la pratique. J'ai participé à la fête "Pomme de Pain" à Estrablin le 4 octobre 2020 et le 3 octobre 2021. J'y ai donné une conférence grand public sur le levain en octobre 2020, pour y présenter les microorganismes qui composent le levain, ce qui a été l'occasion d'introduire les trois domaines du vivant (eucaryotes, bactéries et archées), leur rôle dans le levain avec les différents types de fermentation, les principaux résultats obtenus dans le cadre du projet ANR BAKERY sur la diversité des microorganismes du levain, ainsi que ceux de ma thèse

sur leur origine. Fin 2021, je prévois d'y animer un atelier sur le levain, en présentant la microbiologie du levain avec des observations au microscope lors d'une panification.

Je prévois également d'animer un atelier destiné à un public d'enfants entre 8 et 12 ans pour la Fête de la science en octobre 2021, lors duquel je présenterai des levains à différents temps de maturation pour présenter son évolution au cours du temps, ce qui permettra d'introduire les deux principales fermentations qui ont lieu dans le levain : lactique observée par l'odeur acide, et alcoolique observée par les bulles et la levée de la pâte. S'en suivra des observations au microscope pour identifier les microorganismes responsables de ces fermentations, et une discussion sur leur origine. Je prélèverai également des microorganismes sur les mains des participants pour les observer au microscope et mettre en évidence que c'est une source potentielle de microorganismes pour le levain.

4.3 Apprentis chercheurs

J'ai participé au programme "Apprentis chercheurs", organisé par l'association l'Arbre des Connaissances. L'objectif était de permettre à des élèves qui ne connaissent pas le milieu de la recherche et qui n'en auront pas forcément l'occasion de découvrir la vie de laboratoire et de mener un petit projet expérimental. J'ai ainsi accueilli un binôme d'élèves, l'une étant en troisième et l'autre en première, qui sont venues au laboratoire 8 après-midi entre janvier et mai 2019. Elles ont mené un essai de compétition entre des souches de *S. cerevisiae* et de *K. humilis* ou *K. bulderi*. Elles ont dû envoyer une lettre de motivation pour participer, et la sélection s'est faite sur conseil de leurs professeurs, en favorisant des élèves hautement motivés et intéressés mais qui n'ont pas facilement accès au monde de la recherche, ni via leur milieu social ni via leur entourage. Cette expérience a renforcé mon intérêt pour la médiation scientifique, et pour une approche de l'enseignement par la pratique. En effet les questionnements autant techniques que fondamentaux des deux élèves survenaient naturellement au cours de l'avancée du projet, et elles ont ainsi pu intégrer des notions concernant par exemple le métabolisme des levures ou les interactions biologiques, sans effort particulier de leur part.

4.4 Formation metabarcoding

J'ai d'autre part fait de la médiation scientifique à destination d'un public de chercheurs, à travers une formation aux outils de metabarcoding. J'y ai présenté deux bibliothèques permettant l'analyse de données metabarcoding que j'ai utilisées lors de ma thèse : Frogs [1] et dada2 [2]. J'ai ensuite montré comment gérer les multi-affiliations dans le cas de l'utilisation de Frogs, à l'aide d'un script R que j'ai développé, puis j'ai initié les participants à l'utilisation du package phyloseq [3] et aux analyses exploratoires et de diversité de base (raréfaction, graphique des principales espèces, diversité alpha et beta). La formation était composée de deux parties, une première partie théorique où j'ai présenté les outils, et une seconde partie pratique pour prendre en main phyloseq. J'ai ainsi pu présenter ces outils et partager mes scripts

d'analyses avec des chercheurs de mon laboratoire ainsi qu'à des personnes extérieures lors de deux sessions différentes. Cette formation m'a permis de prendre contact avec Hélène Tormo, qui m'a proposé de participer à la création d'un outil pédagogique à destination des filières fromagères, visant à donner les outils nécessaires pour comprendre l'intérêt des méthodes de métagénomique et métagénétique, les mettre en place et analyser les résultats produits. J'ai ainsi participé à plusieurs réunions de mise en place du projet [Fromics](#).

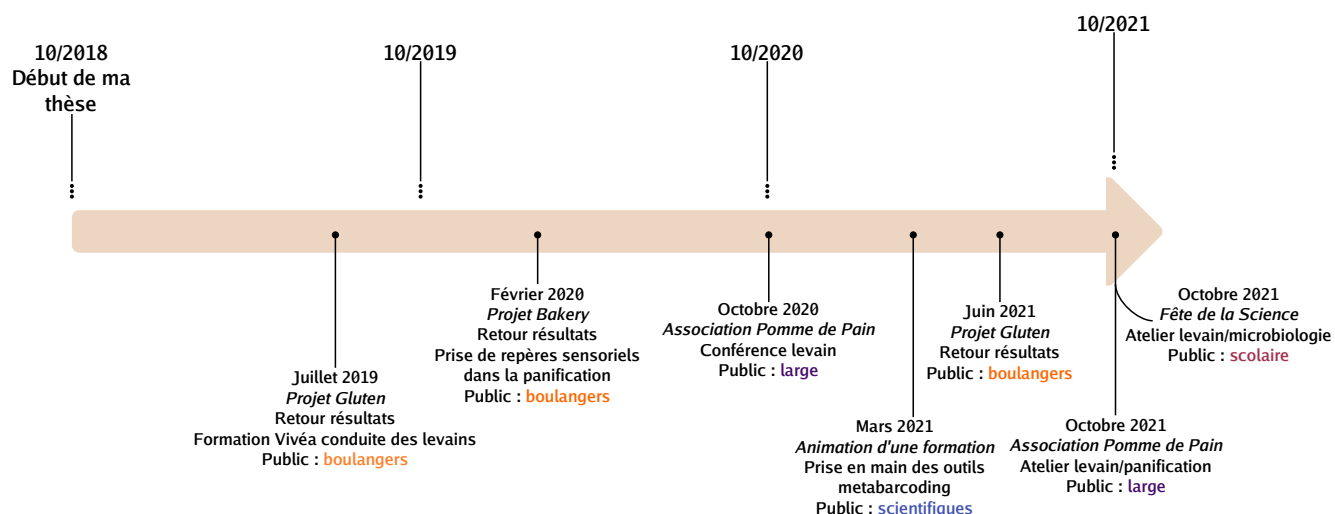


FIGURE 4.7 – Ligne du temps des formations, conférences et animations d'ateliers organisés dans le cadre de ma thèse.

Les échanges réalisés avec les producteurs de Gwell ainsi qu'avec les boulangers m'ont également beaucoup apportées à titre personnel. Ils ont été l'occasion pour moi d'apprendre à faire du pain et ont été l'origine de multiples expérimentations domestiques de fromages et laits fermentés. Par ailleurs, le travail réalisé en fromagerie m'a rappelé l'importance de l'observation. Au laboratoire, on a en effet tôt fait de se détacher de son objet d'étude en extrayant divers composés pour analyses (ADN, souches de bactéries, etc.), et de médier les observations par une multitude d'appareils (séquenceur Illumina, cytomètre, etc.). Le travail en fromagerie m'a rappelé à ce fondamental de la biologie qu'est l'observation, directe, de son objet d'étude. A ce titre le savoir-faire des éleveurs, qui savent déceler d'infimes variations dans leur produit, m'a été précieux et m'a beaucoup apporté.

Bibliographie

- [1] Frédéric ESCUDIÉ, Lucas AUER, Maria BERNARD, Mahendra MARIADASSOU, Laurent CAUQUIL, Katia VIDAL, Sarah MAMAN, Guillermina HERNANDEZ-RAQUET, Sylvie COMBES et Géraldine PASCAL. “FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution”. en. In : *Bioinformatics* 34.8 (avr. 2018), p. 1287-1294. ISSN : 1367-4803. DOI : [10.1093/bioinformatics/btx791](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791) (cf. p. 152).
- [2] Benjamin J. CALLAHAN, Paul J. MCMURDIE, Michael J. ROSEN, Andrew W. HAN, Amy Jo A. JOHNSON et Susan P. HOLMES. “DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data”. en. In : *Nature Methods* 13.7 (juil. 2016), p. 581-583. ISSN : 1548-7105. DOI : [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869) (cf. p. 152).
- [3] Paul J. MCMURDIE et Susan HOLMES. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data”. en. In : *PLOS ONE* 8.4 (avr. 2013), e61217. ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217) (cf. p. 152).

Chapitre 5

Discussion

5.1 Synthèse des résultats obtenus dans ma thèse

Le travail réalisé lors de ma thèse sur les communautés microbiennes de levain de panification et de Gwell a permis de mieux évaluer et comprendre leur stabilité ainsi que l'importance de la dispersion pour leur évolution.

J'ai étudié les flux microbiens au sein du levain de panification (Section 2.2), en m'intéressant particulièrement à la dispersion de microorganismes depuis la farine vers le levain. Je n'ai pas détecté de levures typiquement associées aux levains dans les farines, ce qui montre que la farine n'est pas une source de levures pour le levain. J'ai trouvé dans de rares cas des traces de *F. sanfranciscensis* dans les farines, cependant il s'agissait à chaque fois sauf pour une exception d'ASV différents de ceux retrouvés dans les levains. La farine peut donc potentiellement être une source de bactéries lactiques à l'initiation d'un nouveau levain mais les souches présentes ne s'installent pas dans un levain mature lors des rafraîchis successifs.

Par ailleurs, j'ai étudié la dispersion de communautés microbiennes entières, à travers les échanges de ferments entre producteurs. Les données étaient parcellaires concernant le levain de panification, mais j'ai tout de même pu associer un ASV commun à deux levains à un don de levain d'un boulanger à un autre. En ce qui concerne le Gwell (Section 2.3), après avoir caractérisé sa composition microbienne, qui comprend principalement *L. lactis*, *L. cremoris* et *G. candidum*, j'ai pu montrer que les échanges de ferments entre producteurs avaient menés à la formation de deux lignées de Gwell, l'une caractérisée par la présence de *S. thermophilus*, et l'autre par celle de *K. servazii*. L'impact de la dispersion est donc relativement limité dans ces communautés microbiennes, leur composition en espèces restant stable au cours du temps malgré leur introduction dans un nouvel environnement (don de ferment entre producteurs) ou l'ajout régulier de farine non stérile dans le cas du levain.

J'ai étudié plus en détails la stabilité de la composition en espèces de ces communautés microbiennes.

J'ai comparé la composition microbienne de levains de panification à 4 ans d'intervalle (Section 3.2). Je n'ai pas pu conclure concernant la stabilité des bactéries car je n'ai eu accès qu'à 7 échantillons. De plus, la bactérie majoritaire des levains étant quasiment systématiquement *F. sanfranciscensis*, d'éventuels changements d'espèces sont rarement détectés. La stabilité de la composition en levures dépendaient de changements de boulanger entretenant le levain, de changements de locaux ou de l'initiation d'un nouveau levain. Sans changement de ces paramètres, la composition en levures du levain restait stable, avec éventuellement acquisition de nouvelles espèces, et elle était plus variable avec des pertes et remplacements d'espèces si au moins un de ces paramètres était modifié. La stabilité de la composition en levure dépendait aussi de l'espèce, *S. cerevisiae* notamment pouvant être acquise, mais n'ayant été perdue dans aucun levain.

J'ai étudié la stabilité au cours du temps de la communauté microbienne du Gwell à travers un essai d'évolution expérimentale participatif en fromagerie (Section 3.3). Nous avons entretenu des Gwell en les repiquant trois fois ou une fois par semaine, afin d'étudier l'effet de la fréquence de fluctuation d'environnements sur la communauté microbienne du Gwell, et de voir si une fréquence de repiquage trop rapide peut être une cause de perte du Gwell. Nous avons observé que des repiquages plus fréquents entraînaient une plus forte proportion de *L. cremoris* corrélée à une acidification plus rapide du lait. Cette plus forte proportion a pu être expliquée par une plus grande résistance de cette espèce aux chocs thermiques. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'évolution des souches au cours de cette expérience, cependant, chez l'éleveur repiquant en routine son Gwell trois fois par semaine, les souches de *L. lactis* et *L. cremoris* étaient plus résistantes que les autres aux chocs thermiques. Il est donc possible que les souches de bactéries s'adaptent sur un temps plus long à la fréquence de repiquage du Gwell.

5.2 Diversité des pratiques et des communautés microbiennes

La diversité des communautés microbiennes étudiées dans ma thèse a été évaluée par metabarcoding, avec en complément le suivi des populations viables et cultivables par méthode culture-dépendante. La méthode du metabarcoding peut présenter de nombreux biais [1]. Ces biais peuvent survenir lors de l'extraction de l'ADN, certains microorganismes pouvant être plus résistant que d'autres aux conditions de lyse cellulaire et leur ADN peut être sous-représenté par rapport à leur abondance réelle. On peut également avoir une amplification du marqueur choisi différente selon les espèces, cette amplification étant très dépendante des amorces utilisées, ainsi que du nombre de copies de la région amplifiée dans le génome des espèces présentes dans la communauté microbienne étudiée. Les approches de metabarcoding multi-locus se développent et pourraient limiter ce biais [2]. On peut considérer ces deux premiers biais limités étant donné la bonne représentation des communautés MOCK analysées. On reste cependant limité à l'analyse de la diversité du marqueur choisi, qui peut suffire pour identifier des espèces mais pas pour accéder finement à leur diversité intra-spécifique. Par ailleurs, les résultats dépendent fortement de la base de données utilisée pour assigner les espèces aux séquences obtenues,

certaines pouvant être manquantes. Cette dernière limitation a été contournée dans le cas des levures du levain de panification en abondant la base de données Unite [3] avec les séquences de 30 espèces de levures typiquement retrouvées dans les levains, ce qui a permis d'obtenir des résultats pour des espèces manquantes dans la base de données de départ. Enfin, un paramètre à prendre en compte dans l'interprétation des résultats est la détection d'espèces qui ne sont en fait pas vivantes dans l'échantillon, mais dont l'ADN a été préservé. On peut émettre des hypothèses grâce aux méthodes culturales, en observant par exemple qu'aucun champignon filamenteux vivant n'a été détecté par ces méthodes dans les levains de panification, on peut donc supposer que les espèces du genre *Alternaria* détectées en grandes quantités dans les levains par metabarcoding correspondent à de l'ADN résiduel de ces espèces, alors qu'on peut supposer qu'elles sont vivantes dans les farines où des champignons filamenteux ont été détectés. Cela reste cependant une supposition, et ces espèces ont donc été comptées dans les mesures de diversité. Une approche de transcriptomique pourrait pallier à cette limitation. Par ailleurs l'approche culturale, avec identification de souches isolées par séquençage Sanger peut être complémentaire à une approche de metabarcoding, mais présente le défaut d'être lourde d'un point de vue technique à réaliser, et présente de même des biais, notamment en lien avec le choix des milieux de culture et la présence de microorganismes difficilement cultivables ou ne se développant pas sur les milieux de culture utilisés.

Ces réserves prises en compte, on constate que la diversité alpha des communautés microbiennes du levain de panification et du Gwell étaient relativement proches. La diversité alpha estimée par l'indice de Shannon de 20 échantillons de levains de panification collectés lors de ma thèse était ainsi en moyenne de 0.1 pour les bactéries et 1.2 pour les levures, tandis qu'elle était en moyenne de 0.84 pour les bactéries et 0.15 pour les champignons dans les 13 échantillons de Gwell. La diversité gamma était elle plus élevée dans le levain (16 espèces différentes de bactéries et 11 de champignons dans 20 échantillons de levain, contre 8 espèces de bactéries et 5 de champignons dans les 13 échantillons Gwell). Ceci est certainement lié à la méthode d'initiation du ferment, qui peut être le résultat d'une fermentation spontanée dans le cas du levain de panification, ce qui peut notamment expliquer l'importante diversité des espèces de levure entre les levains. La dispersion peut en effet jouer un rôle important lors de l'initiation du levain de panification, il est probable que l'espèce de levure majoritaire d'un levain soit contingente à celle retrouvée dans l'environnement à ce moment.

La diversité des pratiques d'entretien des produits fermentés peut également déterminer leur diversité beta. La diversité beta des produits analysés dans le cadre de ma thèse, estimée par l'indice de Bray-Curtis, était en moyenne de 0.60 pour les bactéries et de 0.55 pour les champignons dans les levains de panification, alors qu'elle était de 0.35 pour les bactéries et de 0.09 pour les champignons dans les Gwell. Les boulangers ont une diversité de pratiques bien plus large que les producteurs de Gwell, par exemple concernant les températures de travail, le taux d'ensemencement, ou la fréquence de repiquage (cf. Tableau 1.1). La gamme de variation des taux d'hydratation des levains est également large (33% à 66% du poids total du levain en eau, médiane = 43%), et il y a une large diversité de méthodes de conservation du ferment, certains boulangers conservant leur levain au réfrigérateur, d'autre le laissant sécher, parfois en boule dans un sac de farine ou étalé en feuillets. Certaines études montrent un lien

entre certains de ces paramètres et la diversité des levures. Certains auteurs ont ainsi montré que *S. cerevisiae* et *Issatchenkia orientalis* étaient favorisées par rapport à *K. humilis* ou *K. unispora* dans des levains propagés à haute température (25°C à 30°C) par rapport à des levains propagés à plus basse température (20°C) [4, 5]. *S. cerevisiae* serait par ailleurs défavorisée dans des levains très hydratés (plus de 60% d'eau) [6]. Il existe des différences de pratiques entre producteurs de Gwell, par exemple concernant la fréquence de repiquage, mais les gammes de variation sont plus réduites qu'entre les boulangers. J'ai montré que ces différences de pratiques entraînent probablement une adaptation des microorganismes du Gwell des producteurs, avec des souches plus résistantes aux chocs thermiques, mais on n'observe que très peu de différences dans la composition en espèces des différents Gwell. Ainsi la diversité des pratiques des producteurs est un des facteurs pouvant expliquer la plus grande diversité beta des levains de panification que des Gwell.

L'homogénéité des pratiques des producteurs de Gwell est rendue nécessaire par l'engagement dans une démarche de demande AOP, qui requiert une reconnaissabilité du produit. Un équilibre est recherché, entre d'une part une nécessaire adaptation aux outils et aux techniques de chaque producteur, et d'autre part la production par tous d'un Gwell jugé typique. Comme je l'ai expliqué partie 1.3.3, le levain de panification est un produit moins bien défini que le Gwell, de nombreux pains différents pouvant être dits "au levain", mais il présente par ailleurs une plus grande diversité entre producteurs que le Gwell.

Afin de poursuivre les études concernant les liens entre la diversité microbienne et des pratiques des producteurs, il pourrait être intéressant d'évaluer l'adaptation des souches microbiennes du levain de panification en réponse aux variations dans les pratiques des producteurs. En effet, les études sur la domestication des microorganismes se sont attachées à montrer au niveau d'une espèce donnée qu'il existe des adaptations à leur utilisation dans les produits fermentés, en comparant des souches issues de produits fermentés à d'autres souches de la même espèce issues d'environnements naturels ou sur la base d'études de génomique [7, 8, 9, 10, 11]. Il s'agirait ici de chercher à un grain plus fin une éventuelle adaptation de souches à des pratiques particulières. Ceci pourrait se faire par une approche d'évaluation de la diversité intra-spécifique par métagénomique chez différents producteurs contrastés dans leurs pratiques. Etant donné le grand nombre de paramètres pouvant différer d'un producteur à l'autre, un grand nombre d'observations serait nécessaire pour isoler d'un point de vue statistique l'effet d'un seul de ces paramètres. Les pratiques évaluées pourraient être par exemple la méthode de conservation du levain (par séchage, au froid, ou sans conservation particulière par rafraîchis à température ambiante), ou encore l'effet du taux d'hydratation dans les rafraîchis, ou du temps entre les rafraîchis. Pour le Gwell, il reste à confirmer qu'une fréquence de repiquage rapide entraîne une adaptation aux chocs thermiques, et on pourrait également évaluer l'effet de la température d'incubation, qui peut varier entre 27°C et 34°C selon les producteurs.

5.3 Dispersion de communautés microbiennes de produits fermentés

Les dons de Gwell sont restreints par la demande d'AOP à la région Bretagne, alors que les dons de levains de panification ne sont pas contrôlés et peuvent être réalisés par des boulangers de n'importe quelle région voire de n'importe quel pays. Ces échanges sont cependant beaucoup plus rares concernant le levain que pour le Gwell. L'information concernant les dons de levain a parfois été difficile à obtenir, et certains boulangers peuvent ne pas vouloir la diffuser. Dans le cadre de l'analyse de la dispersion de communautés microbiennes entières, il aurait été profitable de constituer un graphe d'interaction des boulangers, en collectant systématiquement les informations concernant les contacts qu'ils ont eu avec les autres boulangers du projet. Cela aurait permis d'avoir des données d'interaction concernant non seulement les boulangers qui ont des ASV en commun dans leur levain, mais également concernant ceux qui n'en ont pas, et aurait permis des traitements statistiques de corrélation de réseau d'interaction et de diversité microbienne dans le levain. En l'absence de ces données et dans un premier temps, une analyse des flux de gène entre levain pourrait être menée de manière plus poussée par une analyse génomique des souches de levure isolées de levains partageant les mêmes espèces ou par métagénomique sur des levains entiers. Ceci permettrait de tester si les ASV identiques retrouvés dans différents levains correspondent à des souches plus proches génétiquement, et permettrait d'évaluer la diversité intra-spécifique des levains de différents producteurs et le rôle des flux de gène.

5.4 Stabilité des communautés microbiennes

Ma thèse a montré que la communauté microbienne du levain de panification est stable au cours du temps, malgré les variations de saisons, les variations climatiques et les changements de farines ou de conduite de levain (nombre de rafraîchis, température de fermentation, etc.). Elle est perturbée par un changement d'environnement local (changement de boulanger ou fournil) ou par une initiation d'un nouveau levain, cf. Section 3.2. Ces résultats portent cependant sur un faible nombre d'échantillons, notamment en ce qui concerne les bactéries, pour lesquelles les levains de seulement 7 boulangers ont pu être comparés dans le temps. De plus, les données proviennent de deux essais de séquençage Illumina différents, dont la technologie a évolué au cours du temps et dont le taux d'erreurs n'est pas le même. Elle n'ont donc pu être exploitées qu'au niveau des espèces et pas au niveau des ASV, ce qui aurait permis une précision plus importante des analyses. Même avec une résolution au niveau des ASV, une telle analyse est intrinsèquement limitée par le choix du marqueur, ici la région ADN_r 16S V3V4 pour les bactéries, et ITS1 pour les levures. Il serait envisageable d'identifier des souches isolées à plusieurs années d'intervalles chez un même boulanger par MLST, ou de séquencer plusieurs souches ou le métagénome des levains de panification pour étudier l'évolution des populations microbiennes et voir en détail si les populations microbiennes des levains ont un développement clonal sur plusieurs années

ou si elles dispersent et de nouveaux individus se développent dans un levain.

Le levain de panification semble être peu invasible par les bactéries lactiques de la farine, étant donné qu'on ne détecte généralement pas les ASV de bactéries lactiques de la farine dans le levain (cf. Section 2.2). En revanche, on peut supposer que la dispersion à partir de l'environnement du fournil joue un rôle dans la stabilisation de la communauté microbienne du levain. En effet, les espèces majoritaires de bactéries et de levure du levain ont été retrouvées dans le fournil, notamment sur les surfaces et les outils utilisés [12], et les mêmes ASV ont été détectés sur les mains des boulangers et dans leur levain [13]. Le fournil et les mains du boulanger pourraient ainsi jouer le rôle de source de microorganismes, et réintroduire les espèces majoritaires en cas de déstabilisation. Dans le Gwell cette dispersion est limitée, comme le laisse suggérer le fait que la composition en espèces de la communauté microbienne reste la même de ferme en ferme au cours des dons de ferment (cf Section 2.3). Ceci peut s'expliquer par la stérilisation de la matière première et par les normes sanitaires en fromagerie qui impliquent l'absence de contact du lait avec les mains et un nettoyage poussé de tous les outils et ustensiles. Cette hypothèse de stabilisation de la communauté par la dispersion depuis l'environnement peut fournir une piste d'explication quant aux différences de stabilité des deux produits. Il faudrait cependant quantifier le taux de dispersion pour savoir si ces environnements peuvent constituer des sources non négligeables de microorganismes dans le cas du levain. Si c'est le cas, cette hypothèse pourrait être testée en propageant des levains en condition stériles afin de les comparer à des levains maintenus en boulangerie. On s'attendrait alors à ce que les levains du laboratoire soient moins stables que ceux propagés au fournil.

Stabilité et santé des écosystèmes

Il peut être tentant de parler de la santé d'un écosystème pour décrire sa stabilité. Cette analogie a été notamment développée dans le cadre du programme One Health, qui développe une approche intégrée, systémique et unifiée de la santé humaine, animale et environnementale [14]. Cette approche a le mérite de mettre en lumière les innombrables interactions biologiques qui structurent un écosystème donné, tout en fournissant des clés pour mieux les gérer et y intégrer les activités humaines. L'accent est mis sur les liens entre les plantes, les animaux et les champignons à travers les flux microbiens qui les traversent, ce qui détermine leur santé et celle de l'écosystème lui-même. La santé d'un écosystème est alors définie par la stabilité de ses flux d'énergie et de ses réseaux trophiques, ainsi que par sa résilience. L'analogie est forte avec la santé d'un organisme, qui peut être définie par le maintien de processus physiologiques qui s'adaptent à l'environnement et peuvent retourner à l'équilibre après une perturbation ou un stress [15]. Cet état d'équilibre des processus physiologiques est rendu possible par la forte intégration des différents organes, qui coopèrent et remplissent chacun leurs fonctions. Une telle intégration est cependant loin d'avoir été démontrée dans le cas des écosystèmes, et le maintien des interactions entre espèces ne repose pas sur les mêmes bases que pour les organes d'un organisme. En effet, on peut avancer que ce qui fonde l'intégration de différentes entités biologiques en un organisme est l'existence de mécanismes réduisant la variance de valeur sélective héritable entre ces différentes entités [16], ou autrement dit, l'alignement de leurs intérêts évolutifs, ce qui réduit de fait la compétition et permet la coopération via par exemple la différenciation cellulaire et la spécialisation pour différentes fonctions. Dans le cas des animaux, cet alignement d'intérêt évolutif est notamment dû à l'aspect clonal des cellules eucaryotes, qui descendent toutes du zygote. Un écosystème n'a pas a priori de mécanisme réduisant la variance de valeur sélective héritable entre ses différentes parties, et seules des études au cas par cas peuvent les mettre en lumière. L'équilibre supposé d'un écosystème est donc par essence dynamique et changeant, et VAN BRUGGEN et al. [14] reconnaissent que l'évolution d'un écosystème est généralement chaotique, indéterminée, et ne tend pas vers un état donné, comme les théories du *climax* l'ont un temps supposé. En l'absence d'équilibre intrinsèque, il paraît difficile de définir la santé d'un écosystème. Il faut donc un critère extrinsèque pour définir un état de référence, et ce critère correspond finalement à des conditions et un fonctionnement permettant la vie en bonne santé des plantes et des animaux et notamment des humains qui peuplent un écosystème donné. VAN BRUGGEN et al. [14] proposent qu'un de ces critères soit un nombre limité d'épidémie touchant les animaux et les plantes, et révèlent ainsi que la santé d'un écosystème concerne finalement principalement celle des organismes pluricellulaires qui en font partie, et on comprend qu'il s'agit surtout de celle des humains. Je trouve plus rigoureux d'un point de vue théorique et plus efficace d'un point de vue militant d'assumer que ce qui compte pour la préservation ou la santé des écosystèmes est le maintien de la vie humaine dans de bonnes conditions et de manière durable, plutôt que de tenter de présenter ces concepts comme relevant d'une ontologie purement naturaliste, alors qu'ils intègrent par essence une dimension humaine, sociale, voire politique.

5.5 Avancées et perspectives sur la compréhension de la perte du Gwell

Une des motivations des producteurs à participer à des projets de recherche sur le Gwell était la compréhension des causes qui conduisent à la perte fréquente du Gwell. Nous avons ainsi mis en place la "Hotline Gwell", en mettant à leur disposition un kit d'envoi d'échantillons pour analyses au laboratoire de Gwell en cours de perte. La plupart des Gwell analysés dans ce cadre avaient un taux de *L. cremoris* plus bas que la normale. Une hypothèse concernant la baisse de la proportion de *L. cremoris* était qu'une fréquence de repiquage trop rapide la défavorisait et menait à la perte du Gwell. Une des hypothèses communément avancées par les éleveurs, l'essai d'évolution expérimentale du Gwell soumis à différentes fréquences de repiquage a montré que les Gwell repiqués trois fois par semaine n'ont pas été perdus. Au contraire, leur taux d'acidification et leur quantité de *L. cremoris* était légèrement plus importante que pour ceux repiqués une seule fois par semaine dans la grande majorité des échantillons. Une fréquence de repiquage plus élevée que celle d'un repiquage hebdomadaire pratiqué par la majorité des éleveurs n'est donc pas susceptible d'augmenter la probabilité de la perte du Gwell. Étant donné que l'hypothèse de la fréquence de repiquage n'a pas permis d'expliquer la perte du Gwell, il faudrait explorer d'autres pistes pour la comprendre.

Comme plusieurs éleveurs l'ont fait remarquer, il s'agit très probablement d'un phénomène multifactoriel. Ainsi, nous avons pu observer dans le cadre de la "Hotline Gwell" qu'un Gwell en cours de perte était fortement contaminé par des coliformes, également identifiés par l'éleveur dans son lait dans le cadre d'auto-contrôles. Les coliformes peuvent potentiellement produire des composés antibactériens [17], ce qui pourrait réduire la population de lactocoques et conduire à la perte du Gwell. Cependant il n'existe pas à ma connaissance d'étude concernant les interactions entre coliformes et lactocoques ou même les bactéries lactiques, et cette hypothèse reste donc à confirmer.

L'hypothèse d'une attaque de phages est aussi une hypothèse prometteuse que j'aurais aimé explorer dans le cadre de ma thèse. Une attaque momentanée de phages pourrait en effet réduire la population de *L. cremoris* et mener à la perte du Gwell. Cette hypothèse n'est pas contradictoire avec l'aspect multifactoriel de la perte du Gwell, puisque le développement des phages peut être lié à une perturbation momentanée. Les lactocoques ont tous des phages intégrés dans leur génome [18, 19]. Ces phages peuvent apporter un avantage sélectif à leur hôte, en permettant notamment leur plasticité phénotypique via des mécanismes encore mal élucidés [20]. Des phages tempérés, en cycle lysogénique, peuvent passer en cycle lytique en réponse à un stress, dont les déterminants sont multi-factoriels [21, 22]. Des attaques de phages ont été documentées dans le cadre de la production de différents laits fermentés, comme le yaourt [23]. Dans le cadre de la Hotline Gwell, il serait intéressant d'effectuer une recherche de phages afin de voir s'ils jouent un rôle dans la perte du Gwell. Ceci pourrait se faire par des tests de plages de lyse sur des tapis de culture cellulaires de différentes souches de *L. cremoris* isolées du Gwell, ou par séquençage d'un marqueur spécifique des phages de lactocoques en comparaison à un Gwell sain.

Enfin, la faible diversité microbienne du Gwell pourrait également expliquer sa perte fréquente. Les relations entre diversité et stabilité des écosystèmes sont complexes, du fait du grand nombre de cas de figures existant dans la nature, mais également car les concepts de diversité et stabilité sont très polysémiques [24]. Il est tout de même établi qu'une faible diversité entraîne généralement une sensibilité accrue aux perturbations, et que des communautés plus diverses sont généralement plus stables, notamment du fait de la redondance fonctionnelle [25]. Or, on observe un nombre relativement faible d'espèces dans le Gwell. Cependant cette diversité alpha évaluée au niveau de l'espèce ne peut pas suffire à elle seule à expliquer l'instabilité de la communauté, puisque le levain de panification ne présente pas plus d'espèces mais est pourtant plus stable d'un point de vue fonctionnel. La diversité génétique du Gwell pourrait être faible et expliquer les pertes fréquentes. Une étude a été menée sur un ferment indigène utilisé pour la fabrication de fromage de type Gouda et entretenu par *back-slopping* [26]. Les auteurs montrent que la diversité en espèce est très faible dans le ferment, qui ne contient que deux espèces de bactéries : *L. lactis* et *Leuconostoc mesenteroides*. Cependant, chacune de ces espèces est représentées par plusieurs lignées génétiques, qui ont notamment des sensibilités différentes aux phages. Le maintien de ces différentes lignées est assuré par une prédation dépendant de la densité par des bactériophages, ce qui correspond à un modèle du type "kill-the-winner" [27]. Cette diversité génétique est donc maintenue par les bactériophages et assure la stabilité de la communauté dans son ensemble. Il serait intéressant d'évaluer la diversité intra-spécifique et le rôle des phages pour voir si une faible diversité génétique peut expliquer l'instabilité relative du Gwell.

Il est possible que des pertes épisodiques du Gwell soient cependant inévitables et inhérentes aux pratiques de transformation par propagation d'un ferment indigène, et le meilleur moyen de sécuriser sa production réside certainement dans la structuration d'un réseau dense de producteurs se donnant le ferment.

5.6 Retour réflexif sur la démarche de recherche participative

Lors de ma thèse, les modalités d'échanges avec les boulangers étaient quelque peu différentes de celles avec les éleveurs producteurs de Gwell. La distinction entre *science* participative et *recherche* participative décrit bien ces différentes modalités d'interaction.

Le projet de recherche avec les boulangers, ainsi que l'étude de la diversité du Gwell et du rôle des échanges de ferment ont ainsi été menés avec une approche de science participative. Les producteurs m'ont envoyé des échantillons et ont répondu à des questionnaires. Les questions de recherche avaient émergé au cours de discussions avec les producteurs, qui avaient eu lieu avant ma thèse. Mais les questions avec les boulangers (Sections 2.2 et 3.2) et une partie des questions avec les producteurs de Gwell (Section 2.3) n'ont pas nécessité d'expérimentations collectives, ni d'observation et d'interprétation au fournil ou à la ferme. L'intérêt de la démarche de sciences participatives pour la recherche est l'obtention

de nombreuses données et échantillons, et pour les producteurs l'obtention de données microbiologiques et physico-chimiques sur leur ferment. Ce type de recherche doit donc s'accompagner d'une démarche d'échanges de savoirs pour qu'elle bénéficie à tous. J'ai ainsi eu plusieurs temps d'échanges avec les producteurs, matérialisés par la production du poster sur la panification au levain à la suite du projet BAKERY (Annexe F), ou les différentes formations et retours de résultats organisés au cours de ma thèse, à destination des boulangers et des producteurs de Gwell (cf. Section 4.2.2). Ces échanges relevaient pour partie de la vulgarisation scientifique, sous la forme de présentations au cours desquelles j'expliquais des notions et des méthodes de microbiologie et je présentais les résultats obtenus, mais également de la médiation scientifique, avec des échanges plus horizontaux par exemple au cours des analyses sensorielles de pain ou de levain, ou de temps d'échanges qui ont été l'occasion pour les boulangers et producteurs de Gwell de transmettre des savoirs concernant leurs pratiques et de partager des hypothèses sur l'évolution des communautés microbiennes. Cette approche de science participative correspond à des projets relativement descriptifs, qui requièrent moins les savoirs et savoir-faire des producteurs que des projets expérimentaux où l'observation et la manipulation du ferment a toute son importance.

Le travail de recherche sur le rôle des pratiques dans la perte du Gwell relevait dans ma thèse d'une approche de recherche action participative, où les producteurs ont participé à l'élaboration des questions de recherche, des protocoles et aux expérimentations. Ce type d'approche entraîne généralement des échanges beaucoup plus poussés que dans le cadre de projets de science participative. Elle implique en effet de collaborer avec les producteurs pour construire le projet de recherche, et donc de construire un vocabulaire commun, d'arriver à une compréhension mutuelle des attentes et des contraintes de chacun, pour finalement être en mesure de discuter et négocier les objectifs du projet. Elle permet également un échange de savoirs techniques lors de la réalisation des expérimentations, et l'essai d'évolution expérimentale sur la fréquence de repiquage du Gwell a par exemple été l'occasion de médiation sur l'utilisation d'un pH-mètre, ou sur des observations fines et difficilement objectivables sur la texture finale recherchée pour un Gwell, dont la transmission a été d'autant plus aisée que les questionnements et problématiques sont intervenus spontanément au cours de l'expérimentation. Au-delà de la réponse au questionnaire co-construit, l'intérêt d'un processus de recherche participative réside selon moi dans ces "à-côtés" : dans les connaissances traduites et partagées lors de son élaboration et dans les savoirs et savoir-faires échangés lors de la réalisation des expérimentations.

Une telle démarche de recherche a été facilitée du fait de l'organisation des producteurs de Gwell, et de leurs initiatives propres en terme d'expérimentation. Le premier projet de recherche sur le Gwell mené au CIRM-BIA a en effet été de l'initiative des éleveurs, qui ont obtenus un financement de la commission européenne dans le cadre d'un projet pour la préservation des ressources biologiques. Le groupe des producteurs de Gwell est très structuré, au début de ma thèse en un groupe au sein de l'UBPN et depuis 2019 de manière autonome au sein de l'APPG. Cette association comporte un pôle technique et recherche, où les éleveurs hiérarchisent collectivement leurs questionnements et problématiques de recherche. Enfin, l'animateur du groupe Gwell et maintenant de l'APPG joue un rôle central de médiateur

et permet d'organiser et structurer les interactions avec les éleveurs. Cette structuration et ces initiatives permettent un échange autour des problématiques de recherche, sans que les questionnements propres à la recherche scientifique ne déterminent seuls la conduite des projets. Avant mon arrivée dans le projet, la caractérisation sensorielle du Gwell s'est ainsi faite de manière participative, dans une analyse sensorielle co-organisée par des scientifiques et des éleveurs et réalisée avec les éleveurs. L'expérimentation menée dans le cadre de ma thèse sur l'effet de la fréquence de repiquage du Gwell a également été menée de manière participative depuis sa conception jusqu'à sa réalisation (Figure 4.3), avec une traduction des questionnements des éleveurs en termes de microbiologie et *vice-versa*.

Cependant, à partir du phénotypage des souches au laboratoire, les échanges avec les producteurs de Gwell ont été fortement réduits. La distance qui me séparait de la Bretagne et la réduction des déplacements liés à la pandémie de Sars-CoV-2 ont certes empêchés d'éventuels échanges autour de l'expérimentation, mais ce n'est pas le seul facteur qui explique la prise de distance. En effet, la deuxième partie de l'expérimentation a été effectuée au laboratoire uniquement et visait à tester la résistance aux chocs thermiques des souches isolées des différents échantillons de Gwell obtenus lors de l'évolution expérimentale en fromagerie. Cet essai était nécessaire pour tester l'hypothèse de l'adaptation des souches aux différentes fréquences de repiquage, et est donc justifiée d'un point de vue scientifique pour une bonne compréhension des processus en jeu lors du repiquage du Gwell. Cette hypothèse correspond partiellement à des questionnements formulés par les éleveurs, une des problématiques alternatives à celle de l'effet de la fréquence de repiquage ayant été proposée lors de la réunion de préparation de l'expérimentation concernant la spécificité des Gwell de chaque producteur (cd. Section 4.1.2). Le résultat obtenu : une éventuelle adaptation des souches d'un des éleveurs à sa fréquence de trois repiquages par semaine reste cependant assez hypothétique. La problématique développée lors de la deuxième partie se détache donc de préoccupations centrales pour les éleveurs, et répondait principalement à une nécessité de démonstration d'hypothèse en écologie microbienne. De plus, les objets biologiques étudiés lors de cette expérience : les souches isolées du Gwell, sont des objets que les éleveurs ne manipulent pas au quotidien et ne connaissent pas. On ne peut les étudier qu'avec des outils de laboratoire, et ceux utilisés notamment le cytomètre de flux sont relativement complexes. Les aspects techniques de cette phase de l'expérimentation, en plus d'être restreints spatialement aux murs du laboratoire, étaient donc moins partagés que lors de la phase d'évolution expérimentale des Gwell, où nous étudions le Gwell dans son ensemble avec une phase de production en fromagerie. Le Gwell constituait ainsi un objet intermédiaire [28], liant les éleveurs et les scientifiques au sein d'un collectif de recherche. Les souches isolées du Gwell ne constituent plus un objet intermédiaire, elles appartiennent uniquement au monde de la recherche scientifique et sont moins susceptibles de créer du lien. Le temps passé et les moyens déployés pour mettre en place ces analyses, au laboratoire et sans interaction avec les éleveurs, me paraît ainsi quelque peu disproportionné par rapport à la significativité et l'importance des résultats obtenus pour eux.

5.7 Recherche participative et Low-Tech

Mon expérience de la recherche participative, ainsi que mon engagement dans un laboratoire de biologie indépendant, fonctionnant avec très peu de ressources financières ([LABASE](#), au sein de l'association [Le BIB Hackerspace](#)), m'ont amené à questionner les pratiques de recherche dans le milieu académique, et notamment les techniques utilisées. Des techniques de laboratoire trop lourdes et trop complexes, mobilisant des objets spécifiques au monde de la recherche scientifique, peuvent créer de la distance avec les partenaires non scientifiques dans un projet de recherche participative. Dans mon cas, la distance avec les éleveurs entraînée par l'essai de phénotypage des souches provient des techniques utilisées pour étudier ces souches, qui mobilisent des outils complexes dont les données sont lourdes à analyser, qui restreignent leur étude au laboratoire, et qui ont donc dépossédé les éleveurs de leurs possibilités de participation à la recherche. Ceci serait acceptable sur une courte durée, permettant de réintégrer rapidement les producteurs au processus expérimental, une fois le projet enrichi des apports de la recherche confinée au laboratoire. Cependant la lourdeur des expérimentations, des travaux préliminaires à leur mise en place, associée au temps nécessaire à la publication des résultats dans les revues scientifiques n'ont pas permis de partir sur une nouvelle dynamique collective.

D'une manière plus générale, on assiste à une complexification et une compartimentation croissante des techniques dans la recherche scientifique. Nombre d'outils ou de réactifs sont ainsi utilisés comme des "boîtes noires" qu'on utilise sans forcément en comprendre le fonctionnement. Les kits d'extraction d'ADN ou d'ARN en sont un bon exemple, la composition de certaines solutions n'étant parfois même pas disponible à l'utilisateur du fait du secret industriel. Les chercheurs eux-mêmes peuvent ainsi se retrouver dépossédés de leurs manipulations, en suivant des protocoles produits par des sociétés privées sans pouvoir les modifier ni vraiment les comprendre. La réflexion sur les Low-Tech peut fournir des pistes pour répondre à cette problématique de perte d'autonomie dans le processus de recherche.

Le terme "Low-Tech" s'est construit par opposition à celui de "High-Tech", non pas pour promouvoir des technologies bas de gamme, mais afin d'engager une réflexion sur l'impact des technologies sur ses utilisateurs et sur l'environnement. TANGUY et LAFOREST [29] définissent 7 principes-clé qui caractérisent les outils low-tech :

- l'adéquation aux besoins de l'utilisateur
- l'allongement de leur durée de vie
- l'économie de ressource liée à leur production et à leur utilisation
- l'appropriation, qui est liée à l'accès à la connaissance concernant leur fonctionnement et leur utilisation, permettant une ré-appropriation des savoirs à l'échelle individuelle et collective
- la collaboration, en encourageant la création d'une communauté participative d'utilisation
- la résilience du système technique
- l'adaptation au milieu, qui détermine l'échelle de production et d'utilisation de l'outil

Ces principes sont inter-connectés, et répondent aux problématiques liés au développement des nouvelles technologies, telles que la déconnexion entre leur production et le milieu naturel et notamment

les ressources et l'énergie nécessaires ainsi que les déchets accumulés. D'autres aspects des nouvelles technologies critiqués dans le cadre des Low-Tech concernent la complexification croissante et l'hyper-sophistication des outils, dont le fonctionnement interne n'est connu que par un nombre restreint d'experts, ce qui conduit à un appauvrissement des savoirs-faire des utilisateurs et restreint les possibilités de réparation ou de détournement permettant de répondre à d'autres besoins que ceux pensés initialement. Enfin, les Low-Tech invitent à une réflexion sur les dépendances liées à l'usage des outils, et questionnent ainsi la nécessité et la pertinence de leur usage. Ainsi, selon une définition plus simple et communément utilisée, une technologie Low-Tech utilise des matériaux abondants, est simple, facilement réparable, sobre en énergie, et génère peu de nuisances, pollution ou déchets [30]. Cette définition a ses limites, et l'ensemble des termes utilisés ("abondant", "simple", "nuisance", "sobre en énergie") sont sujets à discussion et interprétation. Je m'en contenterai cependant car elle suffira à mon propos, mon objectif n'étant pas d'évaluer si une technologie ou un projet de recherche est bien mené en Low-Tech, mais uniquement de proposer des pistes de réflexion concernant l'utilisation des techniques dans la recherche scientifique et notamment dans la recherche participative. Un exemple de projet Low-Tech est l'Atelier Paysan, initié dans les années 2000 par un groupe de maraîchers qui ne trouvaient pas d'outils à un prix abordable et adaptés à leurs pratiques, notamment car ils ne pratiquaient pas la mono-culture [31]. Ils ont donc initié une réflexion sur l'ensemble de leur itinéraire technique, et ont ouvert un atelier collectif où auto-construire leurs outils. Ils ont ainsi développé différents outils simples à utiliser et fabriquer, dont les plans sont en libre accès. Le projet a pris de l'ampleur et des antennes de l'Atelier Paysan ont ouvert dans plusieurs localités en France dans les années 2010, menant à de nombreuses versions et améliorations des outils.

Des outils Low-Tech pourraient permettre de meilleurs échanges dans le cadre d'un projet de recherche participative. L'idée est qu'ils puissent aisément être manipulés par les partenaires non scientifiques du projet de recherche, ce qui leur permettrait de prendre la main sur les analyses. L'outil Low-Tech par excellence dans l'analyse des produits fermentés est ainsi certainement l'analyse sensorielle. Elle ne nécessite quasiment aucune ressource ni énergie et ne génère aucune nuisance. La question du coût énergétique et en matériaux des projets de recherche n'est que trop rarement prise en compte. Certains collectifs de chercheurs militent pour une recherche sobre en énergie, mais les actions entreprises concernent principalement la limitation des déplacements au avion et très peu une réflexion sur la consommation énergétique des activités de recherche en elles-mêmes. La sobriété énergétique devrait pourtant être un critère important pour le choix d'une technique. De plus, l'analyse sensorielle peut nécessiter un apprentissage selon les objectifs attendus mais reste à la portée de n'importe qui. CALVERT et al. [32] proposent ainsi de développer les analyses sensorielles adaptées à un jury non entraîné dans le cadre des projets participatifs impliquant des citoyens et des boulangers dans l'étude du levain de panification. Des méthodes telles que le tri libre sont adaptées et peuvent permettre de mettre en évidence une diversité de ferments ou encore d'analyser l'effet de différentes pratiques sur leurs propriétés. Il serait cependant envisageable d'entraîner au sein d'un projet un jury de producteurs à l'analyse sensorielle de leurs produits. L'objectif serait d'utiliser cette méthode d'analyse non pas seule-

ment afin de caractériser ou d'améliorer un produit, mais en tant que méthode d'analyse de composés volatils dans un projet de recherche. La sensibilité et la précision sont certainement bien inférieures à celle des méthodes analytiques comme l'HPLC ou la GC-MS, mais le coût énergétique et en matériel quasiment nul rend cette méthode attractive, à condition qu'elle soit adaptée à la question posée. Le processus de recherche participative conduirait ainsi non seulement à valoriser et légitimer les savoirs des producteurs, dont les observations sensorielles sont parfois difficilement objectivables, mais leur en ferait également acquérir de nouveaux en affinant leur connaissance sensorielle de leur produit, dans la lignée du travail entrepris dans le cadre du projet Pays Blé [33] et mis en pratique avec Philippe Roussel lors d'une formation destinée aux boulangers du projet BAKERY (cf. Section 4.2.2).

Un projet basé sur l'utilisation de ce type de techniques pourrait par exemple explorer les déterminants du quotient fermentaire dans les levains, c'est à dire du ratio de la quantité d'acide lactique sur celle d'acide acétique. C'est un paramètre important pour les boulangers, qui cherchent selon les goûts à le maintenir plutôt faible ou élevé. Une étude réalisée sur des cultures de *F. sanfranciscensis* et *K. humilis* en milieu synthétique montrent que ce ratio est influencé par la température [34], et est minimal autour de 30°C et augmente de 50% à 35°C. Une autre a été menée sur des levains et montre que le taux d'hydratation joue sur le quotient fermentaire, les levains fermes ayant un quotient fermentaire plus faible [35]. Les résultats sont cependant parcellaires et ne concernent qu'un nombre limité de levains. Par ailleurs, LANDIS et al. [36] montrent que l'importance des bactéries acétiques est souvent sous-estimée dans les levains. Celles-ci peuvent fortement influencer le quotient fermentaire et le projet pourrait s'attacher à les détecter et identifier les pratiques qui les favorisent. Des levains seraient ainsi entretenus dans différentes conditions de température et d'hydratation, et leur caractère plus ou moins lactique ou acétique serait évalué sensoriellement par un jury entraîné après un temps de propagation donné. Les différents levains pourraient être produits de manière expérimentale avec réplicats dans un même fournil, mais cela demanderait une implication importante de la part des boulangers. Il serait également envisageable de choisir des boulangers dont les pratiques sont contrastées pour participer à l'expérimentation, qui entretiendraient leur levain comme d'accoutumée. Dans ce cas, un grand nombre de boulangers participants serait nécessaire pour avoir une puissance statistique suffisante pour analyser les résultats. En complément, des analyses microbiologiques pourraient être menées. La diversité microbiologique pourrait être étudiée par metabarcoding afin d'avoir une bonne représentation de la communauté microbienne des levains, cette approche n'est cependant certainement pas Low-Tech, ni du point de vue énergétique et des ressources (réactifs pour l'extraction d'ADN et la PCR, séquenceur Illumina, cluster de calcul informatique pour les analyses), ni du point de vue de la simplicité de mise en oeuvre. Les bactéries acétiques pourraient également être dénombrées par culture sur des milieux sélectifs. Ceci ne nécessite que peu de ressources et de matériel : des boîtes de Pétri, un milieu de culture solide, un bec benzène, de la verrerie et de l'eau stérile et des pipettes pasteurs. Le dénombrement pourrait donc être réalisé au fournil et constituerait ainsi un atelier de médiation sur les techniques de base de microbiologie.

Une telle expérimentation demanderait cependant un investissement important en temps, autant

pour son organisation que de la part des producteurs y participant, ce qui pourrait être limitant. En ce sens, les associations qui font le lien entre la recherche et les producteurs ont un rôle central à jouer, en participant à l'organisation du projet, voire en prenant le relais une fois le projet scientifique arrivé à son terme s'il n'est pas reconduit. Des structures cherchent ainsi à accompagner et mettre en place ces partenariats entre acteurs de la recherche scientifique, de la société civile, et association faisant le lien. C'est par exemple le cas de la MSH-Sud avec le programme [Trait d'union](#).

D'une manière plus générale, la recherche scientifique pourrait dans le cadre d'un projet de ce type créer des liens avec des acteurs de la recherche non institutionnelle, tels que les Fablabs ou les Hackerspace. De nombreux projets y sont portés par des bénévoles et des passionnés, qui y développent avec peu de moyens des techniques Low-Tech répondant à des besoins précis. On peut citer par exemple le projet [Test@Filtre](#), mis en place au BIB Hackerspace à Montpellier par des membres du Laboratoire Autonome de Biologie, Alternatif Solidaire et Expérimental (LABASE), visant à tester l'efficacité des masques fait-maison lors de l'épidémie de Covid-19. Un nébulisateur a notamment été construit à partir d'une machine à café et d'autres matériaux de récupération. L'ouverture des acteurs de la recherche académique à ce type de projet permettrait tout à la fois d'intégrer des citoyens à la recherche scientifique, de développer des techniques Low-Tech répondant directement aux besoins de leurs utilisateurs, et de réduire le coût énergétique et en ressource des analyses nécessaires à la recherche scientifique.

Bibliographie

- [1] Luna M. LOOS et Reindert NIJLAND. "Biases in Bulk: DNA Metabarcoding of Marine Communities and the Methodology Involved". en. In : *Molecular Ecology* (août 2020), mec.15592. ISSN : 0962-1083, 1365-294X. DOI : [10.1111/mec.15592](https://doi.org/10.1111/mec.15592) (cf. p. 156).
- [2] E. L. CARROLL, R. GALLEGRO, M. A. SEWELL, J. ZELDIS, L. RANJARD, H. A. ROSS, L. K. TOOMAN, R. O'RORKE, R. D. NEWCOMB et R. CONSTANTINE. "Multi-Locus DNA Metabarcoding of Zooplankton Communities and Scat Reveal Trophic Interactions of a Generalist Predator". en. In : *Scientific Reports* 9.1 (jan. 2019), p. 281. ISSN : 2045-2322. DOI : [10.1038/s41598-018-36478-x](https://doi.org/10.1038/s41598-018-36478-x) (cf. p. 156).
- [3] Rolf Henrik NILSSON, Karl-Henrik LARSSON, Andy F. S. TAYLOR, Johan BENGTSSON-PALME, Thomas S. JEPPESEN, Dmitry SCHIGEL, Peter KENNEDY, Kathryn PICARD, Frank Oliver GLÖCKNER, Leho TEDERSOO, Irja SAAR, Urmas KÕLJALG et Kessy ABARENKOV. "The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications". en. In : *Nucleic Acids Research* 47.D1 (jan. 2019), p. D259-D264. ISSN : 0305-1048. DOI : [10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022) (cf. p. 157).
- [4] Marianna BESSMELTSEVA, Ene VIIARD, Jaak SIMM, Toomas PAALME et Inga SARAND. "Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation". In : *PLoS ONE* 9.4 (avr. 2014). ISSN : 1932-6203. DOI : [10.1371/journal.pone.0095449](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095449) (cf. p. 158).
- [5] Christiane B. MEROETH, Walter P. HAMMES et Christian HERTEL. "Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". en. In : *Applied and Environmental Microbiology* 69.12 (déc. 2003), p. 7453-7461. ISSN : 0099-2240, 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003](https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7453-7461.2003) (cf. p. 158).
- [6] Raffaella DI CAGNO, Erica PONTONIO, Solange BUCHIN, Maria DE ANGELIS, Anna LATTANZI, Francesca VALERIO, Marco GOBBETTI et Maria CALASSO. "Diversity of the Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiota in the Switch from Firm- to Liquid-Sourdough Fermentation". eng. In : *Applied and Environmental Microbiology* 80.10 (mai 2014), p. 3161-3172. ISSN : 1098-5336. DOI : [10.1128/AEM.00309-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00309-14) (cf. p. 158).

- [7] Daniel CAVANAGH, Gerald F. FITZGERALD et Olivia MCAULIFFE. "From Field to Fermentation: The Origins of *Lactococcus Lactis* and Its Domestication to the Dairy Environment". In : *Food Microbiology* 47.Supplement C (mai 2015), p. 45-61. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2014.11.001](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001) (cf. p. 158).
- [8] Jean-Luc LEGRAS, Virginie GALEOTE, Frédéric BIGEY, Carole CAMARASA, Souhir MARSIT, Thibault NIDELET, Isabelle SANCHEZ, Arnaud COULOUX, Julie GUY, Ricardo FRANCO-DUARTE, Marina MARCET-HOUBEN, Toni GABALDON, Dorit SCHULLER, José Paulo SAMPAIO et Sylvie DEQUIN. "Adaptation of *S. Cerevisiae* to Fermented Food Environments Reveals Remarkable Genome Plasticity and the Footprints of Domestication". In : *Molecular Biology and Evolution* 35.7 (juil. 2018), p. 1712-1727. ISSN : 0737-4038. DOI : [10.1093/molbev/msy066](https://doi.org/10.1093/molbev/msy066) (cf. p. 158).
- [9] Frédéric BIGEY, Diego SEGOND, Anne FRIEDRICH, Stephane GUEZENEC, Aurélie BOURGAIS, Lucie HUYGHE, Nicolas AGIER, Thibault NIDELET et Delphine SICARD. "Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces Cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes". en. In : *Current Biology* 31.4 (fév. 2021), 722-732.e5. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2020.11.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.11.016) (cf. p. 158).
- [10] Pierre GLADIEUX, Jeanne ROPARS, Hélène BADOUIN, Antoine BRANCA, Gabriela AGUILETA, Damien M. de VIENNE, Ricardo C. Rodríguez de la VEGA, Sara BRANCO et Tatiana GIRAUD. "Fungal Evolutionary Genomics Provides Insight into the Mechanisms of Adaptive Divergence in Eukaryotes". en. In : *Molecular Ecology* 23.4 (2014), p. 753-773. ISSN : 1365-294X. DOI : [10.1111/mec.12631](https://doi.org/10.1111/mec.12631) (cf. p. 158).
- [11] John G. GIBBONS, Leonidas SALICHOS, Jason C. SLOT, David C. RINKER, Kriston L. MCGARY, Jonas G. KING, Maren A. KLICH, David L. TABB, W. Hayes McDONALD et Antonis ROKAS. "The Evolutionary Imprint of Domestication on Genome Variation and Function of the Filamentous Fungus *Aspergillus Oryzae*". en. In : *Current Biology* 22.15 (août 2012), p. 1403-1409. ISSN : 0960-9822. DOI : [10.1016/j.cub.2012.05.033](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.033) (cf. p. 158).
- [12] Fabio MINERVINI, Anna LATTANZI, Maria DE ANGELIS, Giuseppe CELANO et Marco GOBBETTI. "House Microbiotas as Sources of Lactic Acid Bacteria and Yeasts in Traditional Italian Sourdoughs". en. In : *Food Microbiology* 52 (déc. 2015), p. 66-76. ISSN : 0740-0020. DOI : [10.1016/j.fm.2015.06.009](https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.009) (cf. p. 160).
- [13] Aspen T. REESE, Anne A. MADDEN, Marie JOOSSENS, Guylaine LACAZE et Robert R. DUNN. "Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread". en. In : *mSphere* 5.1 (fév. 2020). ISSN : 2379-5042. DOI : [10.1128/mSphere.00950-19](https://doi.org/10.1128/mSphere.00950-19) (cf. p. 160).

- [14] Ariena H. C. VAN BRUGGEN, Erica M. GOSS, Arie HAVELAAR, Anne D. VAN DIEPENINGEN, Maria R. FINCKH et J. Glenn MORRIS. "One Health - Cycling of Diverse Microbial Communities as a Connecting Force for Soil, Plant, Animal, Human and Ecosystem Health". en. In : *Science of The Total Environment* 664 (mai 2019), p. 927-937. ISSN : 0048-9697. DOI : [10.1016/j.scitotenv.2019.02.091](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.091) (cf. p. 161).
- [15] Machteld HUBER, Mette H. BAKKER, Wieneke DIJK, Henriette AB PRINS et Fred AC WIEGANT. "The Challenge of Evaluating Health Effects of Organic Food; Operationalisation of a Dynamic Concept of Health". en. In : *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92.14 (2012), p. 2766-2773. ISSN : 1097-0010. DOI : [10.1002/jsfa.5563](https://doi.org/10.1002/jsfa.5563) (cf. p. 161).
- [16] Ellen CLARKE. "Plant Individuality: A Solution to the Demographer's Dilemma". en. In : *Biology & Philosophy* 27.3 (mai 2012), p. 321-361. ISSN : 0169-3867, 1572-8404. DOI : [10.1007/s10539-012-9309-3](https://doi.org/10.1007/s10539-012-9309-3) (cf. p. 161).
- [17] Sarah-Jo PAQUETTE et Tim REUTER. "Escherichia Coli: Physiological Clues Which Turn On the Synthesis of Antimicrobial Molecules". en. In : *Veterinary Sciences* 7.4 (déc. 2020), p. 184. DOI : [10.3390/vetsci7040184](https://doi.org/10.3390/vetsci7040184) (cf. p. 162).
- [18] Philip KELLEHER, Jennifer MAHONY, Katharina SCHWEINLIN, Horst NEVE, Charles M. FRANZ et Douwe VAN SINDEREN. "Assessing the Functionality and Genetic Diversity of Lactococcal Prophages". In : *International Journal of Food Microbiology* 272 (mai 2018), p. 29-40. ISSN : 0168-1605. DOI : [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.024](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.024) (cf. p. 162).
- [19] Joana OLIVEIRA, Jennifer MAHONY, Laurens HANEMAAIJER, Thijs R. H. M. KOUWEN et Douwe VAN SINDEREN. "Biodiversity of Bacteriophages Infecting Lactococcus Lactis Starter Cultures". In : *Journal of Dairy Science* 101.1 (jan. 2018), p. 96-105. ISSN : 0022-0302. DOI : [10.3168/jds.2017-13403](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13403) (cf. p. 162).
- [20] Anne AUCOUTURIER, Florian CHAIN, Philippe LANGELLA et Elena BIDNENKO. "Characterization of a Prophage-Free Derivative Strain of Lactococcus Lactis Ssp. Lactis IL1403 Reveals the Importance of Prophages for Phenotypic Plasticity of the Host". In : *Frontiers in Microbiology* 9 (août 2018). ISSN : 1664-302X. DOI : [10.3389/fmicb.2018.02032](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02032) (cf. p. 162).
- [21] Merete LUNDE, Are Halvor AASTVEIT, Janet Martha BLATNY et Ingolf F NES. "Effects of Diverse Environmental Conditions on LC3 Prophage Stability in Lactococcus Lactis". en. In : *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* 71 (2005), p. 7 (cf. p. 162).
- [22] J. M. BLATNY, P. A. RISOEN, D. LILLEHAUG, M. LUNDE et I. F. NES. "Analysis of a Regulator Involved in the Genetic Switch between Lysis and Lysogeny of the Temperate Lactococcus Lactis Phage φ LC3". en. In : *Molecular Genetics and Genomics* 265.1 (mar. 2001), p. 189-197. ISSN : 1617-4615, 1617-4623. DOI : [10.1007/s004380000407](https://doi.org/10.1007/s004380000407) (cf. p. 162).

- [23] Josiane E GARNEAU et Sylvain MOINEAU. "Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria and Their Impact on Milk Fermentations". In : *Microbial Cell Factories* 10.Suppl 1 (août 2011), S20. ISSN : 1475-2859. DOI : [10.1186/1475-2859-10-S1-S20](https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20) (cf. p. 162).
- [24] Anthony R. IVES et Stephen R. CARPENTER. "Stability and Diversity of Ecosystems". en. In : *Science* 317.5834 (juil. 2007), p. 58-62. ISSN : 0036-8075, 1095-9203. DOI : [10.1126/science.1133258](https://doi.org/10.1126/science.1133258) (cf. p. 163).
- [25] Steven D. ALLISON et Jennifer B. H. MARTINY. "Resistance, Resilience, and Redundancy in Microbial Communities". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.Suppl 1 (août 2008), p. 11512-11519. ISSN : 0027-8424. DOI : [10.1073/pnas.0801925105](https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105) (cf. p. 163).
- [26] Oylum ERKUS, Victor CL DE JAGER, Maciej SPUS, Ingrid J. VAN ALLEN-BOERRIGTER, Irma MH VAN RIJSWIJCK, Lucie HAZELWOOD, Patrick WM JANSSEN, Sacha AFT VAN HIJUM, Michiel KLEEREBEZEM et Eddy J. SMID. "Multifactorial Diversity Sustains Microbial Community Stability". en. In : *The ISME Journal* 7.11 (nov. 2013), p. 2126-2136. ISSN : 1751-7370. DOI : [10.1038/ismej.2013.108](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.108) (cf. p. 163).
- [27] T. Frede THINGSTAD. "Elements of a Theory for the Mechanisms Controlling Abundance, Diversity, and Biogeochemical Role of Lytic Bacterial Viruses in Aquatic Systems". en. In : *Limnology and Oceanography* 45.6 (2000), p. 1320-1328. ISSN : 1939-5590. DOI : [10.4319/lo.2000.45.6.1320](https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.6.1320) (cf. p. 163).
- [28] Dominique VINCK. "Les objets intermédiaires dans les réseaux de coopération scientifique: Contribution à la prise en compte des objets dans les dynamiques sociales". fr. In : *Revue Française de Sociologie* 40.2 (avr. 1999), p. 385. ISSN : 00352969. DOI : [10.2307/3322770](https://doi.org/10.2307/3322770) (cf. p. 165).
- [29] Audrey TANGUY et Valérie LAFOREST. *Les Frontières Du Low-Tech : Principes-Clés Identifiés Dans La Littérature*. Research Report PRC20.1 – L1.1. Mines Saint-Etienne, mar. 2021, 21p (cf. p. 166).
- [30] Julian CARREY et Sébastien LACHAIZE. "La recherche scientifique en Low-Tech : définition, réflexions sur les pistes possibles, et illustration avec un projet de métallurgie solaire". fr. In : *La Pensee écologique* N° 5.1 (oct. 2020), p. 7-7. ISSN : 2558-1465 (cf. p. 167).
- [31] Fabrice CLERC et François JARRIGE. "L'Atelier Paysan ou les Low-Tech au service de la souveraineté technologique des paysans". fr. In : *La Pensee écologique* N° 5.1 (oct. 2020), p. 3-3. ISSN : 2558-1465 (cf. p. 167).

- [32] Martha D. CALVERT, Anne A. MADDEN, Lauren M. NICHOLS, Nick M. HADDAD, Jacob LAHNE, Robert R. DUNN et Erin A. MCKENNEY. "A Review of Sourdough Starters: Ecology, Practices, and Sensory Quality with Applications for Baking and Recommendations for Future Research". In : *PeerJ* 9 (mai 2021), e11389. ISSN : 2167-8359. DOI : [10.7717/peerj.11389](https://doi.org/10.7717/peerj.11389) (cf. p. 167).
- [33] Estelle SERPOLAY-BESSON. *PaysBlé: Développement d'un réseau régional pour expérimenter, maintenir et promouvoir la diversité cultivée des blés de terroir bretons en agriculture biologique*. fr. 2010 (cf. p. 168).
- [34] Markus J. BRANDT, Walter P. HAMMES et Michael G. GÄNZLE. "Effects of Process Parameters on Growth and Metabolism of *Lactobacillus Sanfranciscensis* and *Candida Humilis* during Rye Sourdough Fermentation". en. In : *European Food Research and Technology* 218.4 (mar. 2004), p. 333-338. ISSN : 1438-2385. DOI : [10.1007/s00217-003-0867-0](https://doi.org/10.1007/s00217-003-0867-0) (cf. p. 168).
- [35] Viola GALLI, Manuel VENTURI, Niccolò PINI, Simona GUERRINI, Lisa GRANCHI et Massimo VINCENZINI. "Liquid and Firm Sourdough Fermentation: Microbial Robustness and Interactions during Consecutive Backsloppings". en. In : *LWT* 105 (mai 2019), p. 9-15. ISSN : 0023-6438. DOI : [10.1016/j.lwt.2019.02.004](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.004) (cf. p. 168).
- [36] Elizabeth A LANDIS et al. "The Diversity and Function of Sourdough Starter Microbiomes". In : *eLife* 10 (jan. 2021). Sous la dir. de Detlef WEIGEL, Sara MITRI et Rachel ADAMS, e61644. ISSN : 2050-084X. DOI : [10.7554/eLife.61644](https://doi.org/10.7554/eLife.61644) (cf. p. 168).

Annexes

Annexe A

Chapitre sur les levures du livre
"Handbook on sourdough
biotechnology"

Sourdough yeasts diversity, physiology and evolution

Lucas von Gastrow^a , Andrea Gianotti^b , Pamela Vernocchi^c ,
Diana Isabella Serrazanetti^d , and Delphine Sicard^{a,1}

¹delphine.sicard@inrae.fr

^aSPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France

^bAlma Mater Studiorum Università di Bologna, DISTAL, Bologna, Italy

^cBambino Gesù Children's Hospital, Human Microbiome Unit, Rome, Italy

^dIstituto d'Istruzione Superiore "Antonio Cecchi", Pesaro, Italy

Abstract

Yeasts are unicellular fungi found that contribute to many food fermentations. They play an important role in sourdough, by producing CO₂ allowing the dough to rise as well as by producing aroma compounds. This chapter presents a review on sourdough yeasts, with an emphasis on their ecology, evolution and physiology. The first part provides an update on the taxonomy of sourdough yeasts. The second part presents yeast species diversity found in sourdough. Factors influencing yeast species distribution are then discussed, including yeasts dispersion vectors as well as biotic factors. An overview of what is known about the level of yeast genetic diversity, the signature of domestication and the effect of yeast-bacteria and yeast-yeast interaction is then presented. Finally, yeast physiology, notably carbohydrate and nitrogen metabolism as well as aroma production, and yeast industrial production are described.

Keywords: yeast, biodiversity, ecology, evolution, metabolism

Introduction

Yeasts are unicellular fungi that typically reproduce asexually by budding or fission and sexually without multicellular fruiting bodies. Yeasts are distinguished from multicellular filamentous fungi which form hyphae. Some organisms adopt both morphologies depending on the environmental conditions, these are called dimorphic fungi. Yeasts have been isolated in a large diversity of wild and domesticated environments and notably in many fermented foods including sourdough.

1 Yeast taxonomy

1.1 Defining yeast taxa

Yeasts have arisen in multiple fungal clades early in fungal evolution and became dominant independently in multiple clades, probably by convergent evolution [1]. Yeasts are found in the two major fungal divisions, *Basidiomycota* and *Ascomycota* but also occur in fungal groups that diverged earlier. To date, there are 1700 recognized yeast species [2] The delineation of yeast taxa, especially species and genus, has evolved over centuries with the advances in technologies and the discovery of new strains.

The morphological species concept was the first to be used to delineate yeast species. For example it was initially used to group together *Pichia* species according to their morphology in the *Pichia* genus. We know now that *Pichia* species have a polyphyletic origin and scientists currently reassign some *Pichia* species to other phylogenetic clades. Several species of *Pichia* species found in sourdough are distantly related to *P. membranifaciens*, the type species of the genus *Pichia* [3] and were reassigned to other clades. Among them, *Pichia guillermondii* was transferred to the new genus *Mererozyma*, *Pichia anomala* was reassigned to *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia farinosa* was reassigned to *Milleroyzyma farinosa*.

The biological concept of species which defines a species as a set of individuals that can interbreed was also commonly used. Most yeasts can indeed reproduce sexually (teleomorph) and asexually (anamorph) which allow the biological concept to be used. However, some yeasts do not have a known sexual cycle, so it can be difficult to use this definition of the species. Initially, yeast species that did not have a known sexual cycle were grouped together under the genus name *Candida* regardless of their phylogenetic relationships. The name *Candida* was also given to some yeast anamorphs which have a known teleomorph. In recent years, the term *Candida* is gradually excluded from the taxonomy of yeasts and *Candida* species are reassigned and renamed according to the phylogenetic clade to which they belong. This is the case of one of the most frequently encountered yeast species in sourdough, *Candida humilis* that has recently been renamed *Kazachstania humilis* [4].

The burden of defining species through mating tests prompted the scientific community to adopt different strategies to define species. Species are defined by the genetic similarity of its members in the genetic concept of species [5] and by reciprocal monophyly in the phylogenetic concept of species. Initially, yeast species were classically defined by their genetic similarity in the D1/D2 domain of the Large SubUnit (LSU) ribosomal nuclear DNA (D1/D2 [6]). Determining a universal threshold of divergence for the delineation of species was however difficult. Kurtzman et al. [6] analyzed hundreds of ascomycetous yeasts and found that strains having more than 1% divergence on the 600 bp D1D2 domain of the rRNA gene were different species. This guideline served to delineate the majority of yeast species described in the 21st century [5]. However, the low polymorphism of the D1/D2 domain in some genus and the discrepancy between phylogenetic tree made with D1/D2 domain and other genomic

regions led the scientists to use additional genomic regions. In addition to the D1D2 region of rDNA, the Small SubUnit rDNA (SSU), the Internal Transcript Spacers of rDNA (ITS), the RNA polymerase I encoding gene (RPB1), the RNA polymerase II encoding gene (RPB2), the Actine encoding gene (ACT), the translation elongation factor 1-alpha (TEF-alpha1), the Tubulin encoding gene (TUB) and the mitochondrial cytochrome B encoding gene, were used to make a more consistent phylogenetic delineation of species. The description of new species is currently made from multigene analysis.

More recently, the development of genomic approaches allowed taxonomists to incorporate genome analysis into the description of new taxa [7]. The highest genomic similarity found between closely related yeast species was 90% [7]. However, a clear guideline on species delineation based on whole genomic analysis has not been proposed yet. Nevertheless, genomic analysis has allowed the definition of new species. Moreover, it has given new insights in the evolutionary history of many yeast species [8]. It allowed the clear identification of several hybrid species and helped to solve conflicting views regarding the relationship of several yeast including *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces cerevisiae* [9]. Indeed, we now know that *S. bayanus*, which has recently been identified in home-made sourdoughs [10], originated from several events of hybridization between *S. eubayanus*, *S. uvarum* and *S. cerevisiae*.

Yeast taxonomy is updated regularly in the reference book "The Yeast" [11]. This book also presents each type strain, i.e. each strain that is used as a reference to define the species and to identify at which species a new isolate belongs. The current and the previous names of sourdough yeasts are presented Table 1.

Table 1: List of yeast species found in sourdough. Synonymous names include former names and anamorphs.

| Current name | Synonymous names |
|-----------------------------------|---|
| <i>Candida glabrata</i> | - |
| <i>Candida parapsilosis</i> | <i>Mycotorula parapsilopsis</i> |
| <i>Candida sake</i> | <i>Candida australis</i> |
| <i>Candida tropicalis</i> | - |
| <i>Dekkera anomala</i> | <i>Brettanomyces anomalus</i> , <i>Dekkera clausenii</i> |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | <i>Hanseniaspora apiculata</i> |
| <i>Hyphopichia pseudoburtonii</i> | - |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Issatchenkia orientalis</i> , anamorph <i>Candida krusei</i> |
| <i>Kazachstania barnettii</i> | <i>Saccharomyces barnettii</i> |

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>Kazachstania bulderi</i> | <i>Saccharomyces bulderi</i> |
| <i>Kazachstania exigua</i> | <i>Saccharomyces exiguus</i> , anamorph <i>Candida holmii</i> |
| <i>Kazachstania humilis</i> | <i>Candida humilis</i> , <i>Candida milleri</i> |
| <i>Kazachstania lodderea</i> | <i>Saccharomyces lodderae</i> , <i>Dekkeromyces lodderi</i> |
| <i>Kazachstania naganishii</i> | <i>Saccharomyces naganishii</i> |
| <i>Kazachstania saulgeensis</i> | - |
| <i>Kazachstania servazzii</i> | <i>Saccharomyces servazzii</i> |
| <i>Kazachstania unispora</i> | <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Torulopsis unsiporus</i> |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> , anamorph <i>Candida kefyri</i> |
| <i>Lachancea kluyveri</i> | <i>Saccharomyces kluyveri</i> |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | <i>Saccharomyces elongisporus</i> |
| <i>Meyerozyma carpophila</i> | <i>Candida carpophila</i> |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | <i>Pichia guilliermondii</i> , anamorph; <i>Candida guilliermondii</i> |
| <i>Millerozyma farinosa</i> | <i>Pichia farinosa</i> |
| <i>Naumovozya castelli</i> | <i>Saccharomyces castelli</i> |
| <i>Pichia fermentans</i> | <i>Zymopichia fermentans</i> |
| <i>Pichia kluyveri</i> | <i>Hansenula kluyveri</i> |
| <i>Pichia membranifaciens</i> | <i>Pichia membranifaciens</i> , anamorph <i>Candida valida</i> |
| <i>Pichia norvegensis</i> | <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Candida norvegensis</i> , <i>Candida trigonopsoides</i> |
| <i>Pichia occidentalis</i> | <i>Issatchenkia occidentalis</i> |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | <i>Torulopsis mucilaginosa</i> |
| <i>Saccharomyces bayanus</i> | - |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | - |
| <i>Saccharomyces pastorianus</i> | - |
| <i>Saccharomyces uvarum</i> | - |
| <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> | - |
| <i>Sporobolomyces roseus</i> | <i>Cryptococcus pulverulentus</i> |
| <i>Starmerella stellata</i> | <i>Candida stellata</i> , <i>Torulopsis stellata</i> , |

| | |
|------------------------------------|---|
| | <i>Cryptococcus stellatus</i> |
| <i>Torulaspota delbrueckii</i> | - |
| <i>Udeniomyces puniceus</i> | anamorph <i>Candida puniceus</i> |
| <i>Vanderwaltozyma yarrowii</i> | <i>Kluyveromyces yarrowii</i> |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>Saccharomyces lipolytica</i> |
| <i>Wickerhamiella spandovensis</i> | <i>Candida spandovensis</i> |
| <i>Wickerhamomyces anomalus</i> | <i>Pichia anomala</i> , <i>Hansenula anomala</i> , anamorph <i>Candida pelliculosa</i> |
| <i>Xeromyces bisporus</i> | - |

1.2 Identifying yeast species in sourdough

Yeast species present in sourdough are identified either by using cultural dependent method or by sequence-based methods. In the former, yeast strains are isolated from sourdough on agar plate containing yeast cultural laboratory medium, typically Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD). Amplification followed by enzymatic restriction or sequencing of barcodes are then used to identify the species. In the later, DNA is directly extracted from sourdough followed by sequencing of barcode (metabarcoding analysis) or sequencing of whole genomes (metagenomic analysis). Several barcodes can be used to identify yeast species. The two most common barcodes are the D1D2 domain of the LSU rDNA or the ITS regions of rDNA. A recent study has tested the use of these two barcodes to delineate species in a collection of 9000 yeast strains originally assigned to 2000 species [2]. The authors found that 6 and 9.5 % of the originally identified yeast species could not be distinguished by ITS and LSU, respectively. Among them, ~3 % were indistinguishable by both loci. The taxonomic thresholds predicted to discriminate yeast species were 98.41 % for ITS and 99.51 % for LSU.

Although characterizing single isolate might be very interesting to study the biology of sourdough yeast, the advantage of metabarcoding is to give a general picture of the fungal taxa present in sourdough. Indeed, universal primers exist to amplify ITS or D1D2 barcodes. They allow the amplification of both yeast and filamentous fungi barcodes. This approach has several limitations that should however be noted. The size of the barcode, especially ITS, can be very variable depending on the fungi, which can lead to undetected species. On the other hand, nucleotide variations at PCR primers homologous regions or competition between barcodes during PCR amplification can bias the results towards certain species. Finally, contaminations frequently happen at different steps of the sequencing process; it is therefore important to integrate negative controls and synthetic microbial communities (MOCK) as positive controls.

Metagenomic analysis is still uncommon in sourdough although this method may give information on the level of intraspecific and functional diversity. This approach is hampered by the abundance of plant DNA sequences in sourdough. Another current limitation is that many sourdough yeast species don't have a well-assembled or annotated genome. The genus *Saccharomyces* is a model in biology and all species have well-characterized genomes. On the other hand, the genus *Kazachstania*, of which 7 species have been found in sourdough (*K. humilis*, *Kazachstania bulderi*, *Kazachstania barnettii*, *Kazachstania unispora*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania exigua*, *Kazachstania saulgeensis*) is less well known [12]. An assembled annotated reference genome containing 16 scaffolds is available for *K. saulgeensis* [4, 13]. A good genome assembly and annotation is also available for two *K. barnettii* strains, including one from sourdough (Bioproject PRJEB35206). Genome sequences have also been released for *K. servazzii* (PRJNA390859), *K. unispora*, and *K. exigua* but their assemblies remain highly fragmented with more than 90, 300 and 500 scaffolds, which limits their use as reference genomes (NCBI Genome accession: 25/02/2021). No genome data are available yet for the species *K. bulderi* and *K. humilis* which are frequently encountered in sourdough. As a summary, the available genomes from sourdough yeast species are shown Table 2.

Table 2 : Information on whole-genome sequences available on the 30th of March, 2021. For each species, the more significant assembled genome project is indicated. Data have been retrieved from NCBI by searching in the Assembly database. T indicates type strain. Dash indicates that no items were found.

| Yeast species | Strain's name | Bioproject | Date | Sequencing technology | Total Length | Scaffold/ chromosome (chro.) count | Ungapped Length | Scaffold N50 |
|-----------------------------------|---------------|---|------------|-----------------------|--------------|--|-----------------|--------------|
| <i>Candida glabrata</i> | CBS138T | PRJNA13831 | 8/12/2008 | - | 12,318,245 | 14 chro. | 12,317,945 | 1,100,349 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | CDC317 | PRJEA32889 | 10/26/2011 | - | 12,998,393 | 8 | 12,998,393 | 2,091,826 |
| <i>Candida sake</i> | CBA6005 | PRJNA43453 Z | 6/18/2018 | PacBio; IlluminaHiSeq | 14,093,877 | 16 | 14,093,877 | 1,468,698 |
| <i>Candida tropicalis</i> | MYA-3404 | PRJNA60445 1 | 3/10/2021 | IlluminaHiSeq | 14,526,448 | 16 | 14,486,417 | 2,216,334 |
| <i>Dekkera anomala</i> | CBS7654 | PRJNA33556 Z | 10/7/2016 | Illumina | 12,502,959 | 28 | 12,498,147 | 1,344,041 |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i> | CBA6001 | PRJNA43453 Z | 6/18/2018 | Sequel; IlluminaHiSeq | 8,966,449 | 16 | 8,966,449 | 1,284,480 |
| <i>HyphoPichia pseudoburtonii</i> | makgeolli | PRJNA41735 5 | 12/3/2018 | IlluminaHiSeq; PacBio | 15,547,333 | 8 chro. | - | - |
| <i>Pichia kudriavzevii</i> | CBS573syn.T | PRJNA43443 3 | 4/17/2018 | PacBio | 10,812,555 | 5 chro. | - | - |
| <i>Kazachstania barnettii</i> | CLIB1767 | PRJEB35206 | 2/20/2021 | IlluminaHiSeq | 12,616,033 | 14 | 12,549,881 | 1,404,614 |
| <i>Kazachstania bulderi</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Kazachstania exigua</i> | OG2 | PRJNA43558 2 | 1/8/2021 | IlluminaHiSeq | 13,507,013 | 588 | 13,498,173 | 53,542 |
| <i>Kazachstania humilis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Kazachstania lodderea</i> | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Kazachstania naganishii</i> | CBS8797T | PRJEA70969 | 9/5/2012 | - | 10,845,821 | 13 chro. | 10,842,414 | 856.01 |
| <i>Kazachstania saulgeensis</i> | CLIB1764T | PRJEB20516 | 4/29/2017 | IlluminaHiSeq | 12,935,755 | 17 | 12,810,176 | 1,371,409 |
| <i>Kazachstania servazzii</i> | SRCM102023 | PRJNA39085 9 | 7/5/2017 | PacBio | 12,836,848 | 91 | 12,836,848 | 902.441 |
| <i>Kazachstania unispora</i> | NRRLY-1556T | PRJNA42944 1 | 11/19/2018 | IlluminaHiSeq | 12,324,500 | 585 | 12,323,254 | 159.57 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | FIM1 | PRJNA31675 9 | 10/26/2016 | IlluminaHiSeq | 10,914,453 | 8 chro. | 10,914,453 | |
| <i>Lachancea kluyveri</i> | NRRLY-12651T | PRJNA1445 | 5/12/2011 | - | 11,509,127 | 8 chro. | 11,536,223 | 1,295,560 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> | NRRLYB-4239T | PRJNA12899 | 5/7/2007 | - | 15,511,671 | 27 | 15,425,019 | 2,011,058 |
| <i>Meyerozyma carpophila</i> | JCM9396 | PRJDB3618 | 3/1/2016 | HiSeq2500 | 10,242,926 | 10 | 10,232,804 | 1,643,132 |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | RP-YS-11 | PRJNA55997 4 | 8/15/2019 | PacBioSequel | 10,713,486 | 15 | 10,713,486 | 1,274,545 |
| <i>Millerozyma farinosa</i> | KCTC27753 | PRJNA36959 3 | 6/16/2017 | PacBio | 21,255,474 | 17 | 21,255,474 | 1,983,291 |

2 Yeasts species diversity

Biodiversity is a measure of variation at three levels: ecosystem, species, and intraspecific diversity (Figure 1).

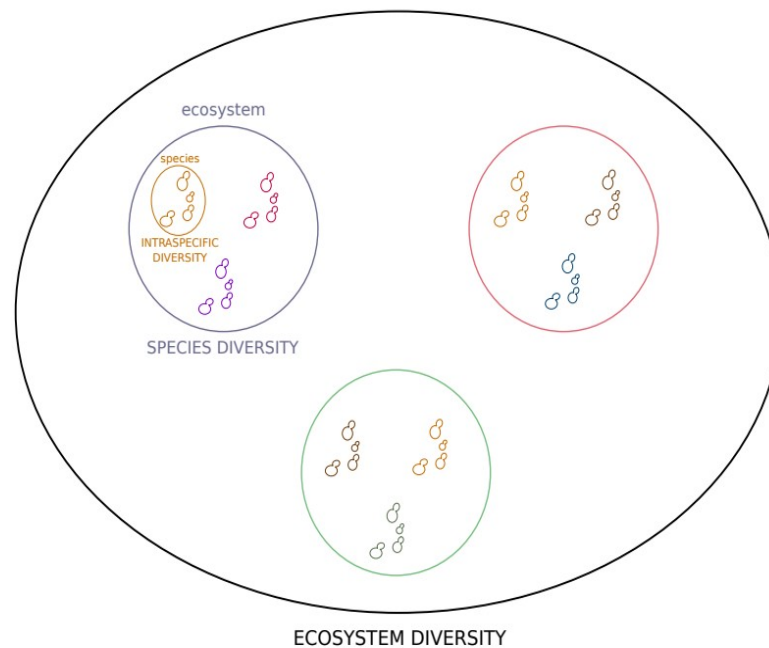


Figure 1: Schematic representation of the different levels of biodiversity.

Sourdoughs yeast species diversity is generally characterized by one or two dominant yeast species and several rare species.

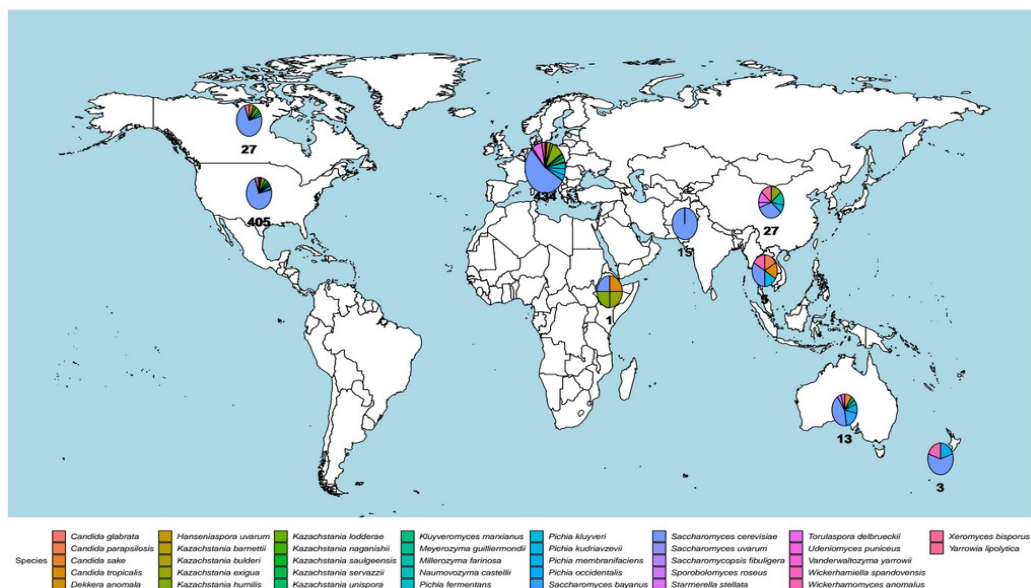
2.1 Yeast species detected in sourdoughs

Yeast species diversity of sourdoughs has been described all over the world in sourdoughs maintained in bakeries [14, 12, 15] and by amateur bakers at home [10]. A review of the yeast composition of more than 400 bakery sourdoughs has been done in a previous edition of this book [16] and is updated in this chapter. Usually a single or two yeast species dominate the sourdough microbial community and therefore the alpha diversity is low. In contrast, different yeast species occurred across sourdoughs, leading to a higher beta diversity. The vast majority of yeasts detected in sourdough are members of the family *Saccharomycetaceae* (phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, class *Saccharomycetes*, order *Saccharomycetales*). Among this family, two genera are frequently reported: *Saccharomyces* and *Kazachstania*. Other described yeast species belong to the more genetically distant genera *Pichia*, *Torulaspora*, and

Wickerhamomyces. The most encountered and widespread yeast species is *S. cerevisiae*. However, *W. anomalus*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii*, *K. exigua*, are also commonly reported species. Note however that the yeast species *K. exigua*, formerly *S. exigua*, may have been misidentified in some studies and may have been mistaken with closely related species, such as *K. humilis*.

2.2 Geographical distribution of yeast species across sourdoughs

Most of the research on sourdough focused on European, Asian and North American bread (Figure 2)[17–65, 10]. The most frequently encountered yeast species, *S. cerevisiae*, *K. humilis*, *T. delbrueckii* and *W. anomalus*, were found on all continents. No clear link between the geographical location where a sourdough is made and the yeast species diversity has been established. At a country level, the geographical distance was not found to be correlated with yeast taxonomic diversity neither [10]. Some particular taxa appear to be more frequently found in some countries or regions. For example, French and Spanish sourdoughs carry frequently *K. bulderi* [60] while Belgium sourdoughs frequently harbor *W. anomalus* [15, 39]. However, no clear-cut relationship between continent, country or region and the species of sourdough yeasts can be established



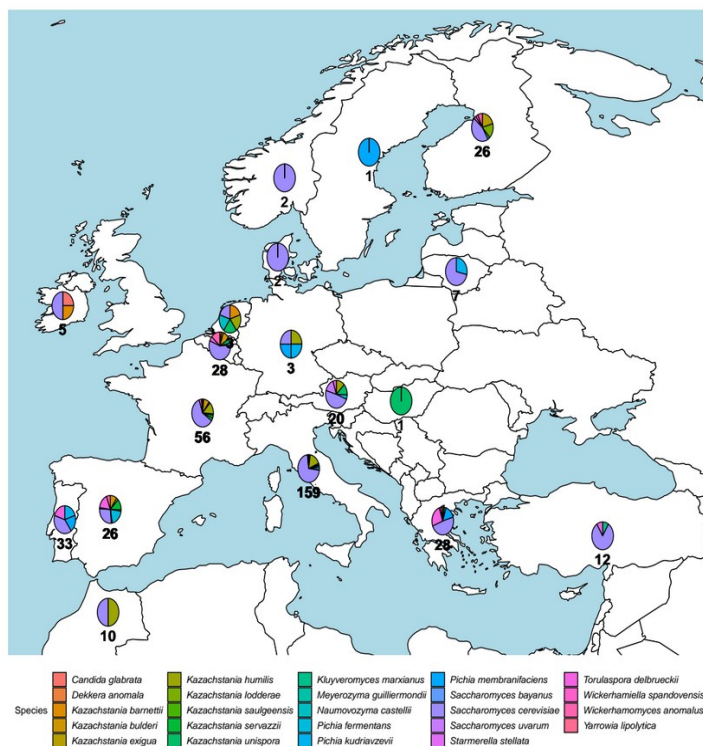


Figure 2: World and European distribution of yeast species identified in sourdough. The numbers under the pie charts indicates the total number of sourdough analyzed in the studies considered. The pie charts are plotted using the number of time a given species was found in a sourdough. The total number of observation for each pie chart may thus be superior to the total number of sourdough analyzed for a given country. Studies that did not indicate the dominant yeasts per sourdough were not retained for this plot. Studies that did not indicate if baker yeast was added into the sourdough were included. This may accentuate the predominance of the species *S. cerevisiae*

3 Yeast dispersion across environments

Different vectors and factors can contribute to yeasts dispersal.

3.1 Dispersion vectors

Wind and water are potential agents for yeasts dispersal. Some microorganisms are known to disperse through wind in small aerosol particles, or with spore formation. Wind is however not considered as an important vector for yeasts dispersal, at least for *S. cerevisiae* [66]. It is rather mediated by animals [67]. Numerous studies have shown that yeasts depends mainly on animals and especially insects for their dispersal [68]. Flies that feed on fermenting fruits (*Drosophila* for example), as well as bees (*Apis*) and stings (*Vespa*) are known to carry yeasts on their body as well as in their microbiota [69]. They are suspected to be the main driver for dispersal of wine associated yeasts [66]. Sourdough associated yeasts such as *Candida sake*, *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*,

Dekkera anomala, *Kluyveromyces marxianus*, *M. farinosa*, *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* have been found in the guts of *Hymenoptera*, the genus *Candida*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces* and *Torulaspora* have been found in *Neuroptera*, *C. parapsilopsis* and *M. guilliermondi* in the gut of *Coleoptera*, *C. sake* and *M. guilliermondi* in the gut of *Lepidoptera* and *C. parapsilopsis*, *K. marxianus*, *Naumovozyma castellii*, *P. fermentans*, *P. kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* in the gut of *Diptera* [70]. *S. cerevisiae* produces specific volatile compounds that attract *Drosophila melanogaster*. Strains that produce these volatile compounds are thus more likely to be dispersed by the flies [71]. Birds have also been identified as vectors for yeast dispersal [68].

Humans can also be important vectors for yeast dissemination. Humans can disseminate yeasts directly, as the skin microbiota contains yeasts. The skin fungal microbiota is not well characterized, but yeasts genera sometimes found in sourdough such as *Saccharomyces* [61], or *Rhodotorula* [72, 73] have been identified. Reese et al. [61] found a high overlap between the microbial community on the baker's hands and on their sourdough. It is however hard to determine if the sourdough is initially inoculated by the baker's hand's or if, to the opposite, the hands are contaminated by the sourdough. Humans can also disperse yeasts indirectly, through its use in fermented products. Wine production have been shown to disperse yeasts with the oak barrels in New Zealand [74].

3.2 Origin of sourdough yeast species

The question of the origin of the sourdough microorganisms has been assessed in many studies. Sourdough yeasts can either already be present on the ingredients, or be imported from the air, baker's hands, containers, or utensils during sourdough backslopping and bread-making processing.

- **Water :**

No large scale study has been conducted to study the potential of water as a source of yeasts for sourdough. Tap water is generally treated with chlorine and should not contain many microorganisms. Van der Meulen et al. [75] reported no growth of bacteria on MRS inoculated with tap water, and it is not reported as a source of yeasts or bacteria in [61].

- **Flour :**

In sourdough made from sterile components except for the flour, LAB and yeast develop and the sourdough rises, showing that flour harbours functionally relevant microorganisms for sourdough production [75]. Moreover, flour irradiation reduces overall sourdough diversity [76]. Reese et al. [61] have analyzed 18 sourdoughs by metabarcoding, as well as the flour they were made from. A large part of the yeasts detected in the flour were also found in the sourdough, but it is impossible to know if

these yeasts were alive in the sourdough or if it was only traces of DNA. Thus, flour could be a source of microorganisms for sourdough, but its relative contribution compared to other sources remains unknown.

- **Air :**

Minervini et al. [54] could not detect any microorganism from the air sampled from the four artisan bakeries where the study was conducted.

- **Utensils in the bakery environment:**

Most of the research concerning the importance of the bakery environment as a source of microorganisms for sourdough has focused on bacteria but some studies also analyzed yeasts [54, 61]. They found that sourdough microorganisms are also found in the bakery environment and can thus originate from it [77, 78]. This is also supported by the fact that laboratory-made sourdoughs rarely harbors the same microbial community as bakery-made sourdoughs, and tend to take a longer time to attain a stable community [39]. Minervini et al. [54] analyzed the microbial populations of the walls, surfaces of the bakery, the dough mixer as well as the buckets where the sourdough was maintained. They showed that the yeasts populations in sourdough can be found in dough mixers and storage boxes.

4 Abiotic factors influencing yeast species diversity in sourdoughs

Many different yeasts can disperse into sourdough, but only one is generally found as the dominant species in a given sourdough. Many factors can determine why one yeast species instead of another develops in a sourdough, and some of them are discussed in the following section.

4.1 Cereal species

The cereal species used to make the flour could select specific yeast species. Different cereal species harbor indeed different nutrient which could favor one species over another [79]. For example, flours made from different cereal species can differ in terms of amino acids, lipids or carbohydrates content.

Rye flour contains more amylases than wheat flour, and thus can contain more glucose and maltose than wheat flour. This could lead to a faster acidification of rye sourdough by the LAB, which in turn lead to the selection of yeast species more adapted to acidic conditions. This hypothesis has however not been demonstrated yet. The sourdough physical properties can also influence the species composition. A higher prevalence of *Issatchenkia orientalis* in rye sourdough compared to wheat sourdough has been reported during laboratory experiment [80]. The authors hypothesize a higher oxygen rate in rye sourdough, which is less dense than wheat sourdough, which would favor this yeast

species. Comasio et al. [64] reported no effect of the cereal species, as the prevalent yeasts identified in sourdough depended more on the bakery than on the cereal species used. The sampling size is however too small to conclude in this study. The relationship between the cereal used and sourdough yeast species distribution was studied over 841 sourdoughs. As shown Figure 3, the cereal species does not seem to be a good determinant of the yeast species found in sourdough.

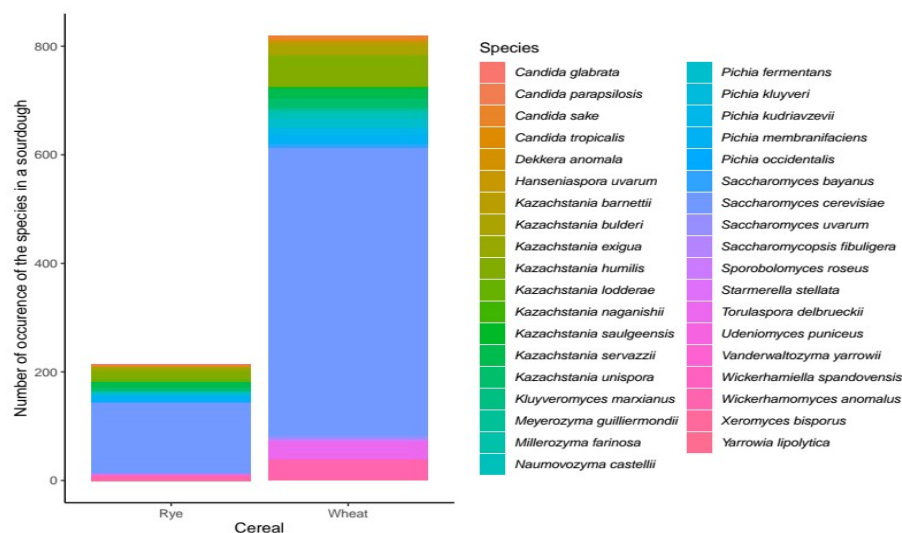


Figure 3: Bar plot showing the number of times a species was found in a sourdough depending on the cereal species used (Wheat or Rye). Other cereals were not included as there was not enough data available. Data are based on the analysis of 173 and 668 sourdoughs for rye and wheat respectively.

4.2 Bakery practices

Bakery practices can select for different yeast species in sourdough. Many different factors can be taken into account and only the most commonly cited and judged as significant are discussed here.

4.2.1 Scale of production

Urien et al. [60] have compared sourdough microbial composition in different bakeries and found significant differences between sourdoughs made by farmer-baker or baker bread-making practices. The dominant yeast species differed, with *K. bulderi* found specially in farmer-baker sourdoughs while *K. humilis* was more associated with bakeries. *S. cerevisiae* was detected in both types of bakeries. A typical difference between farmer-bakers and bakers is that farmer-baker grow their cereals to make their own flour. This parameter in itself is not the only one explaining the differences in sourdough yeast composition between the two groups of bakers, it goes with many other

differences including the scale of production, the utensils and equipment used and the organization of the process of sourdough maintaining and bread-making. The authors could not clearly identify which specific parameter could explain the prevalence of one or the other species. Similarly, Landis et al. [10] analyzed 500 sourdoughs, mainly from the USA. They analyzed 33 parameters of the sourdough production process, including age of the starter, feed frequency, storage location and climatic factors. They found that *S. cerevisiae* was weakly associated with sourdough made with whole grain wheat. Apart from that finding, these metadata were poor predictor of the sourdough microbial community, and accounted for only 7.5% of the variation in overall sourdough fungal composition.

Identifying which of the bakery practice influence yeast species composition, and can have an impact on sourdough functionalities require dedicated experiment. Several factors generally regarded as the most important are discussed below.

4.2.2 Temperature

The temperature at which the sourdough is kept, as well as the temperature at which it is re-fed can influence the yeasts that develop in it. Notably, some bakers who don't make bread every day keep their sourdough refrigerated for some days before using it. This practice can select for specific yeast strains or species. Meroth et al. [81] analyzed the yeast composition of laboratory made sourdough produced at different temperature. Even though a commercial strain of *S. cerevisiae* was added in the starter, *K. humilis* remained predominant in the sourdough kept at 25°C, while *S. cerevisiae* became dominant in the sourdough kept at 30°C. In the same manner, Bessmeltseva et al. [82] found different dominant yeast species in laboratory produced sourdough depending on the temperature. *K. unispora* was found in sourdough fermented at 20°C while combinations of *K. unispora*, *S. cerevisiae*, *I. orientalis* and *C. glabrata* were detected in sourdough fermented at 30°C. However, temperature is strongly related with acid production and it is hard to distinguish this effect from a direct effect of the temperature [83]. Gänzle et al. [84] modeled the growth of *K. humilis* in sourdough according to different parameters including temperature, NaCl content, pH and organic acid levels. Notably, their results are in accordance with the "baker's rule" that yeasts are favored over LAB at medium temperatures (20-26°C).

4.2.3 Hydration rate

Hydration rate, generally referred to as dough yield ($[\text{flour weight} + \text{water weight}] * 100 / \text{flour weight}$) or hydration (percentage of water to flour weight) can play an important role in determining the yeast composition in sourdough. Dough yield can differ between producers and can vary between 160 (hydration = 60%) and 300 (hydration = 200%). It determines the water availability, which influences enzymes activity and diffusion, and can generate osmotic stress if it is not available enough. Di Cagno et al. [85] studied the effect of the transition of a sourdough from firm (DY = 280) to liquid

(DY = 160) on the bacteria and yeasts. Some samples were not affected by hydration, but they found a switch in the dominant yeast species in one sample, where *S. cerevisiae* was found in the firm sourdough but not anymore in the liquid one after 14 days of propagation. In large scale studies, no link could be established between the hydration rate and the dominant yeast species [10].

4.2.4 Time between back-slopping and re-feeding practices

The sourdough backslopping process can have an important impact on sourdough yeasts. The time between successive back-sloppings, as well as the amount of flour and water which is added each time can vary quite drastically between producers. This can affect the aromatic profile of the subsequent bread, in relation with the quantity of sourdough added in the dough [86]. Longer time between back-slopping and higher proportion of sourdough at each refreshment lead to more acidic sourdough, as a result of lactic fermentation by the LAB. This is of course also related to the fermentation temperature, higher temperature leading to a faster acidification [87]. Producers can modify the quantity of sourdough and/or the time between back-slopping in order to adapt to the temperature. As a result, yeast viable cells counts can decrease during long fermentative times, and this is closely related to their resistance to acidic conditions [83].

Different re-feeding practices can also have an impact on the yeasts in sourdough. Some bakers use a chief sourdough that they maintain and take some part to incorporate it in the dough during bread-making, while some others use their entire sourdough in the dough and keep some of this dough to maintain their sourdough, and thus have salt into their sourdough [60]. This could have an effect on the sourdough yeast, by selecting for yeasts that are more salt resistant, but it has however not been demonstrated.

Vogelmann et al. [80] tested different associations of one yeast strain and one bacteria strain at different temperature, refreshment rate and inoculation percentage. In some cases, this led to a stable association while in others either the yeast or the bacteria could not develop, depending on the condition and the yeast and bacteria species, thus showing that these parameters can have an impact on the sourdough microbial community.

5 Yeasts evolution in sourdough

The evolution of yeast species composition in sourdough and of yeast genetic diversity (intraspecific diversity) can be influenced by the four evolutionary forces, mutation, drift, migration and selection [88]. Speciation can also impact yeast species composition. Mutation includes single nucleotide mutation, gene copy number variation, chromosome rearrangement, ploidy variation and can lead to new phenotypes and in some case, reproductive isolation and speciation. Genetic drift is a stochastic process that can lead to the loss of genetic diversity or species by chance. Migration/dispersion is responsible for the arrival of new species and genotypes and may homogenize microbial communities. Finally, selection favors species or strains that have a higher fitness. So far, no extensive

population genetic and ecological studies has been carried out to study the relative effect of all these processes on the evolution of sourdough microbial community. However, recent analyses of the genetic diversity of sourdough isolates give preliminary indications of the evolutionary dynamics of certain yeast species in sourdoughs.

5.1 Intraspecific diversity in sourdough and the selection of new starter

Several methods have been used to characterize genetic diversity (intraspecific) of sourdough yeast species. Comparison of five different molecular techniques (Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of mitochondrial COX1 gene introns amplification, repeat sequences polymerase chain reaction, RAPD and inter-delta regions amplification) showed that the inter-delta regions amplification was the best one to detect genetic diversity in sourdough yeasts [89]. However, RAPD [65, 85, 90, 91] mini-satellite and microsatellites typing [65, 92] have also been used in several studies. More recently genome sequencing was also performed [92].

The model species, *S. cerevisiae*, is the best characterized species in sourdough. Its genetic diversity across sourdoughs has been studied in China [91], Italy [89], Spain [65], and France [92]. Most of the genetic variation was found across sourdoughs. Within sourdough, the level of genetic diversity was variable. While some sourdoughs appear to contain a single clonal population, others contain several distinct genotypes. Over all studies, hundred of strains of *S. cerevisiae* have been isolated. The phenotypic diversity of a subset of them have been explored to select strains relevant for innovation in bread-making starters. Several traits suitable for bread-making were studied including dough leavening ability, dough rheology impact [93, 94] flavor and aroma production [59, 95–97] dehydration, tolerance to stress, production of vitamin B. All these traits were found to be variable among strains. For example, the CO₂ production of *S. cerevisiae* strains isolated from diverse sourdoughs in China varied in an extensive range, with a magnitude of 10X [91]. Selection of yeast starters will be helped if high throughput screening were developed and if we knew more on the genetic basis of the variation of interesting traits.

The genetic diversity of other yeast species, *K. humilis*, *K. bulderi*, *T. delbruecki*, *P. fermentans*, *W. anomalus* have been explored. As for *S. cerevisiae*, most diversity was found across sourdoughs. Intra-sourdough genetic diversity was also detected for *K. bulderi*, *P. fermentans*, *T. delbruecki*, *W. anomalus*. [65, 89, 98].

5.2 Domestication of *S. cerevisiae* for bread-making

The earliest archaeological evidence for leavened breads dates from the second millennium BCE in Egypt [99, 100] and the first millennium BCE in North Western China [101]. Before the 19th century, leavened breads were made with sourdough or fermented beverages. In the 19th century, the industrialization of food production resulted in the production of pure yeast cultures that became an alternative to make bread. The production of bread made with commercial *S. cerevisiae* yeast spread. Currently,

despite a new interest from consumers for sourdough bread, yeast bread is still the most consumed bread. Different types of baker's yeast are on the market, with respect to not only their shelf-life [yeast cream (liquid), granulated yeast (small granules), compressed yeast (block yeast), and dried yeast (active dry, instant dry, and dry frozen yeast)] but also their osmotolerant properties (suitable for baked goods with high carbohydrate concentrations), fermentation performance and activity retention at low temperatures (use of frozen doughs).

The widespread occurrence of *S. cerevisiae* in sourdough has long been hypothesized to be linked to cross contamination with industrial baker's yeast starters in the bakery environment [39, 54]. However, there are now evidence that sourdough and commercial yeasts have a different domestication history [92]. Using a population genomic approach, a recent study showed that *S. cerevisiae* bakery strains are polyphyletic with 67% of strains clustering into two main clades: most industrial strains were tetraploid and clustered with strains having diverse origins, including beer. By contrast, most sourdough strains were diploid and grouped in a second clade of strains having mosaic genomes and diverse origins, including fruits and natural environments. Sourdough strains harbored a higher copy number of genes involved in maltose utilization, and a high level of gene flow from multiple contributors was detected. Commercial and sourdough strains displayed higher CO₂ production than do strains from other domesticated lineages (such as beer and wine), revealing a specific phenotypic signature of domestication. Interestingly, industrial strains had a shorter fermentation onset than sourdough strains, which were better adapted to a sourdough-like environment, suggesting divergent selection by industrial and artisanal processes.

5.3 Yeast-LAB and yeast-yeast interactions

Sourdough yeasts share their habitat with LAB [102]. The stability of sourdough microbial community depends on the interactions between its members. The nature of the interactions (see Table 3) between yeasts and between yeast and LAB is the subject of many investigations. It should first be noted that associations between LAB and yeasts in sourdough can be strain-specific [103–105]. It may thus not be relevant to try to generalize to the species level.

5.3.1 Co-occurrence and facilitation

Some species are frequently found together in sourdough. They are often hypothesized to interact positively. However, co-occurrence is not a proof of mutualism or commensalism. The frequent associations between two species could be linked to other factors, independent of their biological interactions, such as co-migration.

Landis et al. [10] realized pairwise competition assays between LAB and yeasts species that co-occurred in the 500 sourdoughs they analyzed. They found that co-occurrence

patterns *in situ* are only partly recovered in pairwise coexistence experiments (Landis et al. 2021). This was the case of the combination between *Fructilactobacillus sanfranciscensis* and *K. humilis*. *F. sanfranciscensis* is often found associated with *K. humilis* in type I sourdoughs [65]. This co-occurrence has long been hypothesized to reflect a nutritional mutualistic relationship concerning carbohydrate metabolism [37]. *K. humilis* strains are generally maltose negative, while *F. sanfranciscensis* can import maltose and release glucose in the medium after hydrolysis. These phenotypes would favor cross-feeding between these species and thus result in a commensal or mutualistic relationship.

Table 3: Biological interactions

| Interaction type | Name |
|-------------------|-------------------------|
| negative/negative | competition |
| negative/neutral | amensalism |
| negative/positive | predation or parasitism |
| positive/neutral | commensalism |
| positive/positive | mutualism |

Several recent researches lead us however to rethink the importance of facilitation between these species. Carbonetto et al. [103] have tested co-cultures of different yeasts (*S. cerevisiae* and *K. humilis*) and LAB (*F. sanfranciscensis*) strains. They did not find any positive interactions. Instead, yeasts reached lower population size, while LAB seemed unaffected by the co-culture, even for a couple of yeast and LAB strains isolated from the same sourdough. This finding can be explained by competition for nutrient, and only to some extent by the production of acids by LAB, since the yeasts threshold for pH and acetic acid tolerance were not reached in the experiment.

We have to keep in mind that ecological interactions are not set once and for all, they can vary depending on the individuals and the environmental conditions. We should not see ecological interactions as essentially fixed, but instead varying along a parasitism/mutualism continuum [106]. Even typical interactions generally considered as mutualistic, like mycorrhizal associations, can be more complex than initially thought. It can either become detrimental to the plant, notably when carbon is limiting, or the fungus

can be excluded from the root if nutrient availability is sufficient enough for the plant, thus leading to a drastic decrease of the fungus growth rate [107]. Research should aim to understand which strain combinations and environmental conditions can lead to mutualistic or competitive interactions, rather than looking for purely mutualistic or competitive behavior between species.

5.3.2 Metabolism

Co-fermentation with LAB and yeast leads to environmental fluctuations in terms of organic acids synthesis, pH decrease, nutrients availability, and modification of the rheological properties of the sourdough. In turn, these environmental changes have an impact on the metabolism and morphology of LAB and yeasts.

The amino-acids content is also an important factor for yeast-bacteria interaction. The concentration of various free amino acids during fermentation of kamut flour with baker's yeast and sourdough has been studied (Figure 4). Fermentation with baker's yeast resulted in the decrease of free amino acids due to yeast metabolism. Compared to the dough leavened with baker's yeast, the fermentation by sourdough lactic acid bacteria caused an increase of some amino acids. Because of the low value of pH during fermentation with sourdough, the activation of flour endogenous proteinases is higher in sourdough which provide extra amino-acids for yeast to grow [74].

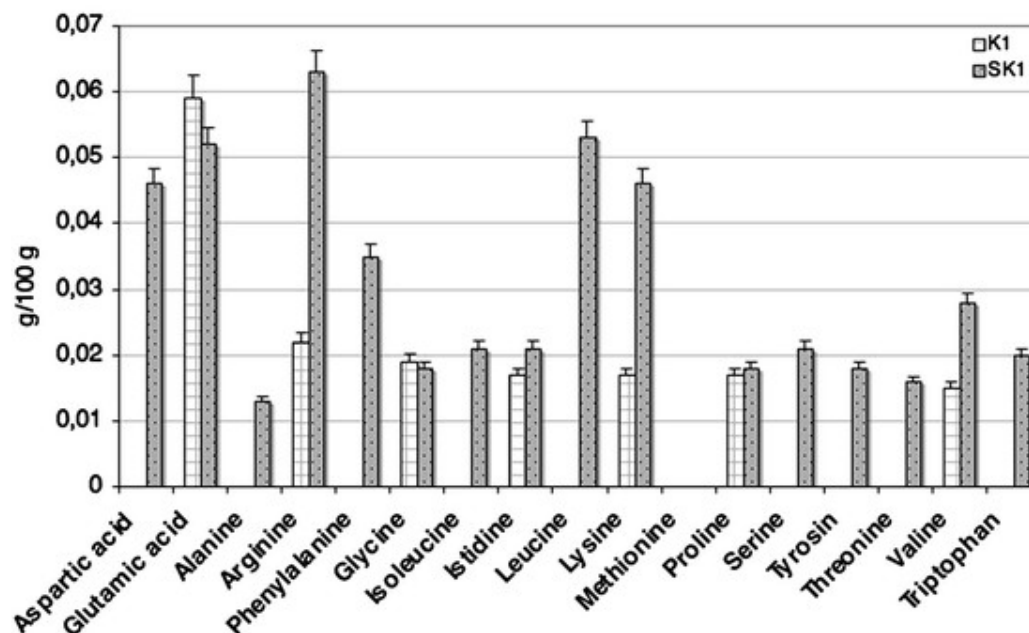


Figure 4 : Difference in the content (g/100 g) of various amino acids in ripe dough (K1) and sourdough (SK1) of kamut flour

Inversely, the presence of yeast can provide amino-acids for the growth of LAB. *L. brevis* was able to grow on amino acids-depleted medium when grown with *K. exigua* but not alone [64]. Amino-acid overflows supporting LAB growth was also detected for *S. cerevisiae*-*Lp. plantarum* or *S. cerevisiae*-*Lactococcus lactis* and is conserved across diverse strains (Ponomarova et al. 2017).

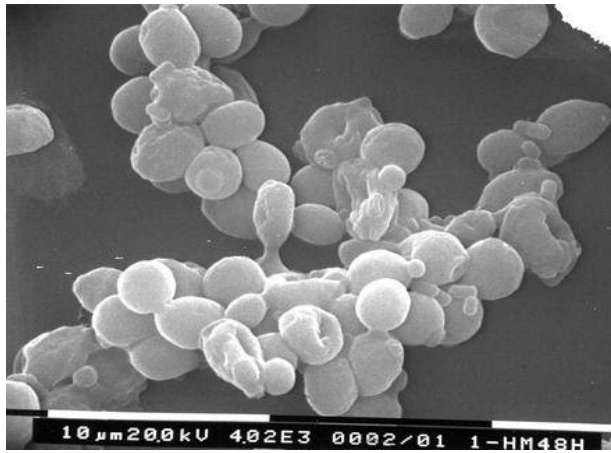
The presence of LAB can modify yeast secondary metabolism. Boudaoud et al. [104] have studied ferulic acid metabolism by sourdough yeasts (*S. cerevisiae*, *K. humilis*) and LAB (including *F. sanfranciscensis* and *Lactiplantibacillus plantarum*) in mono and co-culture. While yeast alone transformed ferulic acid in 4-vinylguaiacol, combination of LAB and yeast strains led to the modification of ferulic acid metabolism, with a major formation of dihydroxy-ferrulic acid. A couple of *K. humilis* and *F. sanfranciscensis* strains both unable to consume ferulic acid alone were even found to degrade it efficiently in co-culture [104]. It is not possible to know in this study to what extent it is the yeast or the LAB metabolism that is modified by the co-culture, but the ecosystem functioning is modified in a way that cannot be predicted from the analysis of the strains in mono-culture.

The same type of observation can be made for volatile compounds and organic acids production. Association between LAB and yeasts in sourdough modifies their production in a non additive way [102]. Winters et al. 2019 [108] showed that the strains pairing matters and that combining yeast and bacteria can in some case lower the amount of volatile compounds produced.

Finally, preliminary results showed that LAB can induce morphological changes and early autolysis of the yeast (Vernochi et al. 2008).

After 2 h of exposure to the cell-free wheat flour hydrosylate previously fermented by *F. sanfranciscensis*, *K. humilis* released metabolites belonging to the family of lactones and changed morphology (Figure 5). Glutamic acid was suggested as the presumptive precursor of certain γ -lactones in yeasts [109]. Δ -Lactones were obtained from 11-hydroxy fatty acids during fermentation with *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces*, *Geotrichum* and *Candida* spp.

Figure 5: Cells of *S. cerevisiae* exposed for 4 h to cell-free liquid Wheat Flour



Hydrolyzed (WFH) previously inoculated with *F. sanfranciscensis*

5.3.3 Yeast/yeast interactions

One dominant yeast species is generally found in a sourdough. It can however happen that several yeasts are found, and new yeasts may be imported in small quantities in a sourdough through dispersion. Yeasts are thus subjected to interactions with other yeasts in sourdough.

To test for the possible invasion of sourdough microbial community by the bakery yeast, *S. cerevisiae*, Meroth et al. [81] used a type I sourdough containing *K. humilis* and *F. sanfranciscensis* and added 1% (m/m) *S. cerevisiae*. The latter was detected in only very small proportions after five days of fermentation, thus showing that the sourdough was hardly invaded by *S. cerevisiae*.

A negative correlation between the occurrence of *S. cerevisiae* and *K. humilis* and between the one of *S. cerevisiae* and *K. servazii* (10) has been found across more than 500 sourdoughs suggesting competitive exclusion between these species. However, experiments in the laboratory did not confirm this hypothesis since a stable association between *S. cerevisiae* and *K. humilis* was found [10]. Additional experiments should be done to better understand the rules of assembly of microbial species in sourdough.

6 Physiology and biochemistry of sourdough yeasts

Cereal dough is a dynamic system that is characterized by continuous changes in nutrient availability during processing. This system is subjected to simultaneous release, by endogenous or added amylases, of fermentable carbohydrates such as glucose, maltose and fructose, and their uptake and consumption by yeasts and lactic acid bacteria. It is also subject to change in nitrogen content.

6.1 The yeast nitrogen metabolism

Yeasts can use a diverse array of compounds as nitrogen sources and, upon demand, are capable of expressing catabolic enzymes of many different pathways. Extensive studies on nitrogen metabolism and its regulation have been carried out with *S. cerevisiae*. Nitrogen compounds such as ammonia, glutamine and glutamate are used by yeasts. When these primary nitrogen sources are not available or are present only in low concentrations that limit growth, many other nitrogen sources are used, for example purines, amides and most of the amino acids [110]. Yeasts may also grow on ammonium as the sole nitrogen source, since they possess the entire repertoire of genes that encode for the enzymes responsible for biosynthesis of all amino acids. Ammonium is directly assimilated into amino acids, notably glutamate and glutamine, which serve as donors of the amino group for the other amino acids. The main route for assimilation of ammonium is the reaction of the NADPH-dependent glutamate dehydrogenase (GDH), which forms glutamate from α -ketoglutarate and ammonium. Whenever the concentration of ammonium is low, glutamine synthase is activated. This forms glutamine from α -ketoglutarate and ammonium in an ATP-dependent reaction. Glutamine is absolutely required as the prominent precursor of several biosynthetic pathways for asparagine, tryptophane, histidine, arginine, carbamoyl-phosphate, CTP, AMP, GMP, glucosamine and NAD. *S. cerevisiae* does not use nitrate as a nitrogen source but very few species of yeasts have that capacity. Nitrate assimilation occurs via the activity of the NADPH-dependent nitrate reductase, which forms nitrite. Further, nitrite is reduced to ammonium by the NADPH-dependent nitrite reductase. The type of nutrients available defines the internal metabolic flow, while their abundance often limits the rate of biomass production and the energy available for growth [111]. The use of the various nitrogen sources is highly regulated. It requires the synthesis of specific catabolic enzymes and permeases, which are subject to nitrogen catabolite repression. The *de novo* synthesis of permeases and catabolic enzymes is controlled at the level of transcription, and often requires two distinct positive signals. A global signal indicates nitrogen derepression, and a second, pathway-specific signal indicates the presence of a substrate or of an intermediate of the pathway. This control permits the selective expression of enzymes for a specific catabolic pathway from many potential candidates within the nitrogen regulatory circuit. However, some systems are controlled only by nitrogen metabolite repression and not by induction [110].

Yeast cells may encounter different environmental states. Maintaining optimal functionality in the presence of such external variability is a central evolutionary constraint. Feedback mechanisms directly link gene expression with internal need. Physiological variables such as the rate of biomass production, the cellular pools of nutrients or the energy feedbacks, to properly tune gene expression with the corresponding functional needs, are part of these strategies [111]. Yeast cells starved for particular amino acids or treated with an inhibitor of protein synthesis (cycloheximide) may exhibit a phenomenon referred to as the stringent response. In *S. cerevisiae*, the

stringent response results in a rapid inhibition of the synthesis of rRNA (but not of tRNA or mRNA) and it is thought to be signaled when cells sense a rapid decrease of the overall rate of protein biosynthesis.

6.2 The Yeast Carbohydrate Metabolism

The concentration of fermentable carbohydrates, as well as the dynamics of their release by amylases depends on many factors including cereal type, environmental and cultural factors, grain storage and milling conditions. In turn, the activity of amylases is conditioned by temperature and, especially, water activity (A_w) [112, 113]. During the first phase of bread making, the readily fermentable sugar concentration is probably limiting. Figure 6 describes the effect of commercial amylase supplementation on the rate of volume increase of doughs with different concentrations of NaCl.

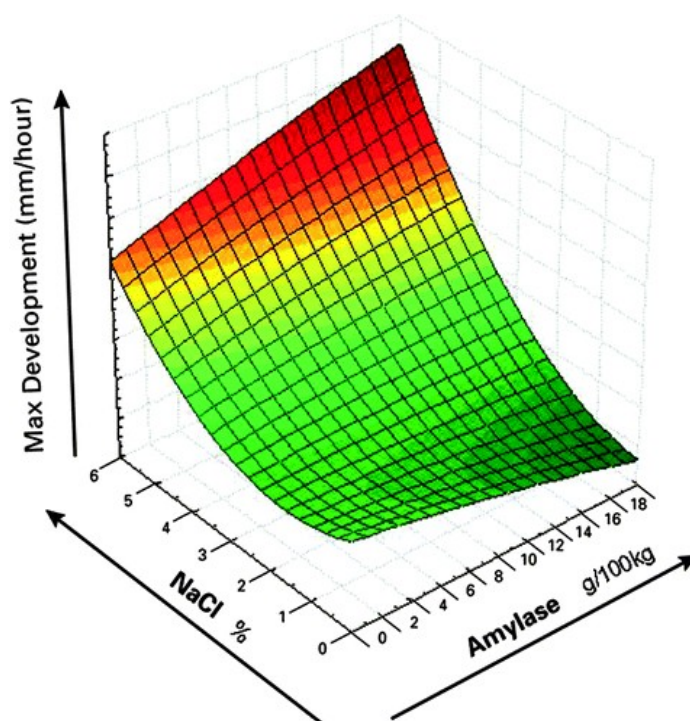


Figure 6 : Combined effect of NaCl and α -amylase supplementation on the rate of volume increase of doughs inoculated with *S. cerevisiae* and incubated at 30°C for 3 h (Gianotti et al. unpublished)

More generally, yeasts are classified as facultative anaerobes, *i.e.* they are capable of both fermentation and respiration. When oxygen is unavailable yeasts carry out fermentation.

Under respiration, the hydrogen (electrons) from $\text{NADH} + \text{H}^+$ is passed to oxygen in the electron transport chain yielding approximately 2.5 ATPs per $\text{NADH} + \text{H}^+$. During fermentation the hydrogen (electrons) is passed on acetaldehyde to form ethanol yielding no ATPs per $\text{NADH} + \text{H}^+$.

Yeasts accumulate energy in the form of ATP from different organic compounds by using different metabolic pathways. Most yeasts use carbohydrates as their main carbon and energy sources, but there are also yeasts that may use non-conventional carbon sources. The preferred energy source for yeasts is glucose, and glycolysis is the general pathway for conversion of glucose to pyruvate, whereby the synthesis ATP is coupled to the generation of intermediates and reducing power in the form of NADH for the biosynthetic pathways. Yeasts respire when oxygen is present and the repression absent; pyruvate enters into mitochondria where it is oxidatively decarboxylated to acetyl CoA by means the pyruvate dehydrogenase multi-enzyme complex. This reaction links glycolysis to the citric acid cycle, where acetyl CoA is completely oxidised to give two moles of CO_2 and reductive equivalents in the form of NADH and FADH_2 . The citric acid cycle is an amphibolic pathway, as it combines both catabolic and anabolic functions. This latter function is the consequence of the production of intermediates for the synthesis of amino acids and nucleotides.

During alcoholic fermentation, yeasts re-oxidise NADH to NAD in a two-step reaction starting from pyruvate. The first reaction is via decarboxylation through pyruvate decarboxylase, followed by the reduction of the acetaldehyde to ethanol, catalysed by the alcohol dehydrogenase (ADH). Simultaneously, glycerol is generated from dihydroxyacetone phosphate to ensure, with an alternative pathway, the regeneration of NAD according to the mechanism described in Figure 7.

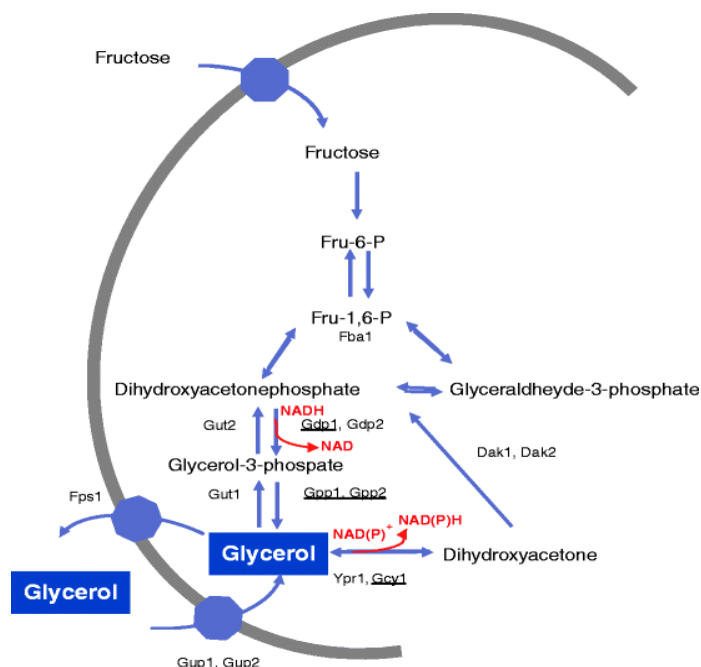


Figure 7 : Part of the glycolytic pathway and pathways for production of glycerol. Expression of the genes encoding the proteins that are underlined is stimulated after osmotic shock.

Generally, the level of glycerol produced is ca. 0.03 mmol/g of sourdough. Paramithios et al. [114] reported that the synthesis of glycerol is positively affected by the co-cultivation of *S. cerevisiae* with *F. sanfranciscensis* and *Levilactobacillus brevis*. Exposure of baker's yeast to salt stress also increases glycerol production [115]. The glycolytic pathway and related enzymes were conserved during evolution, even though the mechanisms of controlling the carbon and energy metabolism have been adapted to the needs of each species. *S. cerevisiae* switches to a mixed respiro-fermentative metabolism, resulting in ethanol production, as soon as the external glucose concentration exceeds 0.8 mmol/kg [116]. Hence, *S. cerevisiae* controls fermentation versus respiration primarily in response to the concentration of glucose. The aerobic synthesis of ethanol by *S. cerevisiae* depends on the relative capacities of the fermentative and respiratory pathways. High glucose levels result in the glycolytic rate exceeding that of the pyruvate dehydrogenase (Pdh) reaction, thereby generating an overflow towards pyruvate decarboxylase (Pdc) and, hence, ethanol production. At low external glucose levels and in the presence of oxygen, *S. cerevisiae* does not synthesize ethanol [117]. The uptake of glucose into *S. cerevisiae* is controlled by multiple hexose transporters (Hxts) [118], which have different substrate specificity and affinity, and are expressed under different, overlapping conditions [119]. When *S. cerevisiae* is exponentially growing under aerobic conditions with glucose or fructose as carbon sources, glucose degradation proceeds mainly via aerobic

fermentation. When yeast is growing under aerobic conditions on mannose or galactose, degradation proceeds simultaneously via respiration and fermentation.

Control of carbohydrate metabolism in yeasts is of both fundamental and practical significance. It is regulated by different mechanisms depending on the genus and species as well as on environmental conditions. These mechanisms have been called Pasteur, Kluyver, Custers and Crabtree effects, glucose or catabolite repression, and genera or catabolite inactivation [120]. Table 4 describes these regulatory phenomena in *S. cerevisiae* and other genera, including also the species occurring in sourdough. The term Crabtree effect defines the inhibition of the synthesis of respiratory enzymes in the presence of oxygen and high concentration of glucose [121–123]. Depending on environmental conditions, especially, the type of carbon sources, yeasts adjust the energy metabolism according to a process referred to as carbon catabolite repression. Two extreme cases are exponential growth on glucose or ethanol, which lead to the almost exclusive fermentation of the former with extensive secretion of ethanol or to exclusive respiration to carbon dioxide, respectively. Both, fully respiratory and fermentative metabolism are mediated by differentially active transcription factors. During fermentation, the transcription factor complex of Tup1p, Ssn6p and Mig1p mainly represses the expression of respiratory, gluconeogenic and alternative carbon source utilization genes [124]. The minimal activity of the citric acid cycle for biosynthetic purposes is ensured mainly by the Rtg transcriptional activators [125]. During respiratory growth on non-fermentable carbon sources, the respiratory genes of the citric acid cycle and the respiratory chain are highly induced. This is triggered by the Hap transcription factors, a global activator complex of respiratory genes [125]. Activation of genes for gluconeogenesis during growth on non-fermentable carbon sources is achieved by the transcriptional activators Cat8p and Sip4p [124–127]. These are the key elements of the yeast transcriptional regulatory network for the extreme cases of fermentative and fully respiratory growth [128].

Table 4: Regulatory phenomena (Adapted from Barnett and Entian [120])

| Name | What happens | Yeast species and genera | Underlying factors |
|-----------------|---|--|---|
| Pasteur effect | Sugar used faster anaerobically than aerobically | <i>S. cerevisiae</i> | Oxidised cytochrome inactivates 6-phosphofructokinase |
| Custers effect | D-glucose is fermented to ethanol and CO ₂ faster in aerobic than in anaerobic conditions | <i>Brettanomyces</i> and <i>Dekkera</i> spp. | Much acetic acid is produced via an NAD ⁺ -aldehyde dehydrogenase. Consequently, anaerobically, the high NADH:NAD ⁺ ratio inhibits glycolysis |
| Kluyver effect | Ability to use oligosaccharide or galactose aerobically, but not anaerobically, although glucose is fermented | <i>Candida</i> spp., <i>Pichia</i> spp. | Probably caused mainly by slower uptake of sugar anaerobically |
| Crabtree effect | Adding glucose to tumour cells lowers the respiration rate | | Decrease of ADP concentration in mitochondria |

S. cerevisiae carries out respiration and fermentation simultaneously at high growth rates, even under fully aerobic conditions. This phenomenon occurs under chemostat culture conditions by the shift from biomass formation towards fermentative products at increased dilution rate. The Crabtree effect has important consequences for industrial processes aiming at producing yeast biomass, where the formation of fermentative by-products is undesired. Although it reduces the cell-biomass production, it provides in nature a tool to out-compete other microorganisms by rapid consumption of glucose and the production of ethanol (Hagman and Piskur 2015). Goddard [129] emphasised the importance of the Crabtree effect on the competitive advantage of *S. cerevisiae* during growth in ecosystems characterized by elevated concentrations of carbohydrates and propose increased temperature as another explanation of the competing advantage of Crabtree-positive yeast. In sourdough where ethanol can accumulate in gluten pockets and carbohydrate content depends on amylase and microbial activity, it is unclear whether the Crabtree effect confers a selective advantage. Many yeast species found to be dominant in sourdough are Crabtree positive but not all. The origin of Crabtree effect in *Saccharomycetaceae* predates the whole genome duplication and became a settled metabolic trait after the split of the *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces* lineages, and coincided with the origin of modern fruit bearing plants (Hagman et al. 2013). The *Saccharomyces*, *Kazachstania*, *Naumovozyma* species have a typical Crabtree effect (Merico et al. 2007, Hagman et al. 2013). The species *T. delbrueckii* showed a less pronounced Crabtree effect, with a lower specific ethanol production rate and a higher biomass yield (Merico et al. 2007). The sourdough species, *M. guilliermondii* (Papon et al. 2013), *W. anomalus* (Frelund et al. 2004) or *P. kudriavzevii* (Schnierda et al. 2014) are all Crabtree negative. There is therefore no evidence of a sourdough advantage of Crabtree metabolism.

An alternative route for glucose oxidation is the hexose phosphate pathway, also known as the pentose phosphate cycle, which provides the cell with the pentose sugars and cytosolic NADPH necessary for biosynthetic reactions. The second step of this pathway is the dehydrogenation of glucose-6-phosphate to 6-phosphogluconolactone and the generation of one mole of NADPH (by glucose-6-phosphate dehydrogenase). Subsequently, 6-phosphogluconate is decarboxylated via the activity of phosphogluconate dehydrogenase to ribulose-5-phosphate and a second mole of NADPH is generated. Besides generating NADPH, the other major function of this pathway is the production of ribose sugars, which serve for the biosynthesis of nucleic acid precursors and nucleotide coenzymes. The reduced carriers, NADH and FADH₂, are reoxidised in the respiratory chain located in the inner mitochondrial membrane. The energy released during the transfer of electrons is coupled to the process of oxidative phosphorylation via ATP synthase, an enzyme complex also located in the inner mitochondrial membrane and designed to synthesise ATP from ADP and inorganic phosphate. For the majority of industrial fermentations with bakers' yeast, the elevated capacity to ferment

available carbohydrates is an important characteristic, especially when the biomass is exposed to high sugar concentrations and/or absence of oxygen.

6.3 Stress Response in Sourdough Yeasts

Yeasts are exposed to constant fluctuations of their growth conditions. Consequently, they have to develop sophisticated responses to adapt to and survive under a variety of conditions. Yeasts, as well as other organisms, employ a concerted response to external stress [130]. One mechanism that yeast cells use to protect the cell from the effects of environmental variation is to initiate a common gene expression program. This program includes about 900 genes, whose expression is stereotypically altered when yeast cells are shifted to stressful environments. The genes that participate in this response amount to almost 14% of the currently predicted genes in the yeast genome [131]. The “general stress” transcription factor could be identified in the zinc-finger transcription factor (Msn2) [132]. Normally, Msn2 is exported from the nucleus, and a cyclin-dependent kinase (Srb10) is concomitantly repressed. Under stress, Msn2 re-localises to the nucleus and, with the relief of Srb10 repression, activates transcription. The stress response is rapid, but quickly attenuated. Bose et al. [133] showed that this attenuation is caused by a nuclear-dependent degradation of Msn2. Msn2 rapidly disappeared from cells after heat or osmotic shock. Process parameters, including temperature, dough yield, oxygen, pH, as well as the composition of starter cultures, determine the quality and handling properties of sourdough [134] and the metabolic response of microorganisms responsible for the fermentation process [135]. The exposure of microbial cells to stressful and fluctuating conditions during fermentation involves a broad transcriptional response with many induced or repressed genes. The selective pressure exerted by environmental conditions encountered by yeast cells during sourdough fermentation, accounts for the consolidated dominance of selected yeast species. Nutrient availability likely modulates the microbial ecology of sourdough. However, within the sourdough ecosystem there are numerous mechanisms whereby one species may influence the growth of another [135]. Although autochthonous bacteria and yeasts are adapted and competitive in their respective environment, the dough environment can be described as a stressful environment for microorganisms [136]. The conditions of the sourdough microenvironment that principally affect yeast responses and growth rate are: nutrient availability (starvation), pH (acid stress), dough yield and presence of sugars, salts and polysaccharides (osmotic stress), oxygen (oxidative stress), temperature fluctuations (heat shock and cold stress) and interactions between lactic acid bacteria and yeasts (e.g. *S. cerevisiae*, *K. humilis* and *F. sanfranciscensis*), and between yeasts (e.g. *S. cerevisiae* and *K. humilis*).

6.3.1 Low Temperature

In bakery practice, the temperature of the sourdough is an important parameter to control the growth of lactobacilli and yeasts [83]. Häggman and Salovaara [137] studied the effect of process parameters, including low temperature, on the leavening of rye dough.

Under the experimental conditions, the endogenous *K. humilis* was responsible for leavening, especially when the temperature was set at 22°C. The low temperature of fermentation also slowed the acidification rate, thus favoring an extended production of CO₂ by *K. humilis*. An appropriate modulation of the temperature and the use of temperatures ranging from 4°C to 8°C is a practical approach to control the fermentation rate and to program the working times. The effects of the low temperature and other environmental parameters on yeast physiology are conditioned by the exposure dynamics [138]. Transcriptional responses during adaptation to suboptimal temperatures permitting growth (10–20°C) [139, 140] differed from those found after exposure to temperatures below 10°C, where growth ceases [141, 142]. Two different mechanisms of response are distinguished: (1) the early cold response (ECR), occurring within 12 h; and (2) the late cold response (LCR), occurring later than 12 h [140]. Tai et al. [138] used chemostat cultivation to compare different culture conditions and/or microbial strains at fixed specific growth rate. They observed 15% of the genes that showed a consistent transcriptional response in previous batch-culture studies on cold adaptation [139, 140, 142] were also identified under chemostat conditions at 30°C [143]. In batch cultures, the exposure of *S. cerevisiae* to low temperatures invariably induces an increased synthesis of storage carbohydrates (especially trehalose) and transcriptional up-regulation of genes involved in storage carbohydrate metabolism [144]. Transcriptional induction of the trehalose-biosynthesis genes TPS1 and TPS2 is consistently observed in cold-shock studies, and after exposure to near-freezing conditions. Several other genes such as HSP12, HSP26, HSP42, HSP104, YRO2 and SSE2, and those encoding the three cell-wall mannoproteins (Tip1p, Tir1p, and Tir2p), fatty-acid desaturase (Ole1p), which influences the membrane fluidity, and Nsr1p, a nucleolar protein required for pre-rRNA processing and ribosome biogenesis, were consistently associated with cold shock [138, 140, 142]. The stress response element (STRE) binding factors Msn/Msn4 are implicated in the coordinate regulation of low-temperature-responsive genes [140, 144]. Consistently, many genes induced upon a temperature downshift were also induced under a variety of other stress conditions [140]. Contrarily to batch cultures, where the low temperature adaptation is accompanied by marked ESR (Environmental Stress Response) (29% of the differentially expressed genes in batch cultures at low temperature respond to ESR as well), only three ESR-induced genes (YCP1, VPS73, and EMI1) showed higher transcription at 12°C under chemostat cultures. Conversely, 88 ESR-induced genes showed a consistently lower transcript level at 12°C [138]. Studies on cold adaptation in batch cultures of *S. cerevisiae* revealed a clear transcriptional up-regulation at low temperature of chaperone-encoding genes such as HSP26 and HSP42 [140, 141]. The proteins encoded by these genes prevent the aggregation of cytosolic proteins during heat shock [138].

In bakery practice, refrigeration of dough or sourdough is used to control fermentation. Under the refrigerated conditions, yeasts have to maintain and then to recover their fermentative capacity in a very short period of time (15–30 min). At 4–8°C, many yeast

strains continue to ferment at a slow rate and induce a slight increase of the dough volume. The fermentation stops at 4°C. Only selected strains recover their leavening capacity when the dough temperature is raised to 28–35°C (Gottardi et al. unpublished data). As shown in Figure 8, these strains increased the dough volume within 15 min also when the dough had been kept for 7 days at 4°C.

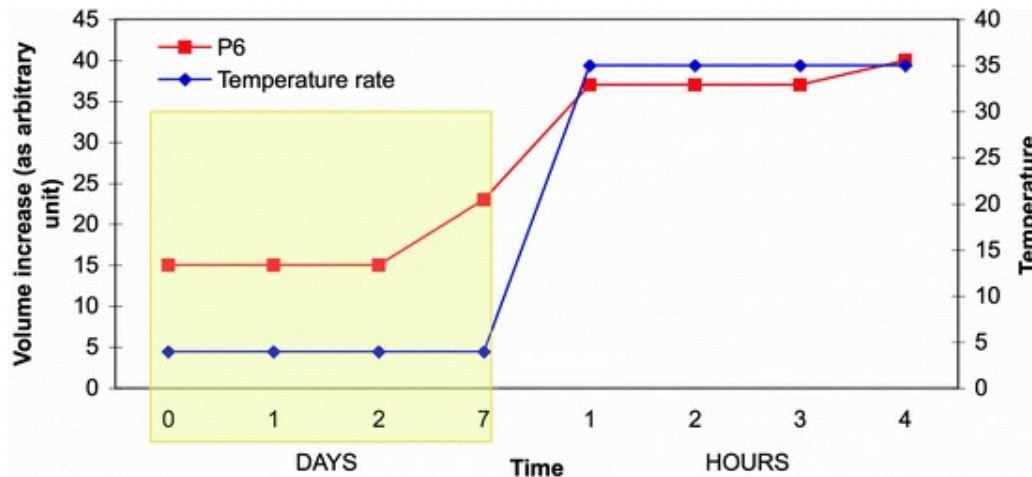


Figure 8: Yeast recovery ability in terms of volume increase of a dough inoculated with the selected strain (P6). The dough was initially stored for 7 days at 4°C (yellow square), and then incubated at 35°C.

6.3.2 Acidity

The acidity of the sourdough depends on lactic and acetic acid production by lactic acid bacteria [137]. Usually, low temperatures of sourdough fermentation delay the lactic acidification and decrease the time of yeast exposure to high acidity. A low fermentation temperature was suggested as a means to improving the synthesis of CO₂ by yeasts [137]. Because only the non-dissociated acids diffuse into the cell, the type of acid more than the pH determines yeast inhibition [145]. Mainly the level of dissociation of acetic acids affects the leavening capacity [137]. The non-dissociated form of the acetic acid inhibits yeasts by acidifying the cytoplasm, which causes physiological stress or suppresses metabolic activity [146]. This especially happens when the pH of the sourdough is below the pK_a of acetic acid, 4.76. Non-dissociated acetic acid decreased the leavening capacity of *K. humilis* when grown together with the heterofermentative *L. brevis* compared to homofermentative species. *K. humilis* adapts to a wide range of pH (4–6.0) and has a good inherent acid tolerance, the leavening activity is obviously affected by the fermentation process [84]. The leavening power of baker's yeast is strongly influenced by the environmental conditions of storage [145]. Pre-treatment at 30°C with organic acids (malic, succinic and citric acids), under a wide range of pH values, was assayed before use [145]. The treatment with organic acids variously

increased the fermentative activity. When the pH of baker's yeast, containing citric acid, was raised from 3.5 to 7.5, both the fermentative and maltase activities increased. Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity and the levels of internal glycerol also increased in the presence of citrate. On the contrary, baker's yeast containing succinic acid at pH 7.5, showed a decreased viability during storage, despite the maintenance of high fermentative activity.

6.3.3 Osmotic Stress

A_w is defined as the chemical potential of the free water in solution. Low and intermediate values of A_w limit the growth of yeasts. The A_w of the cytosol of yeast cells is lower than that of the surrounding medium, corresponding to a higher osmotic pressure (turgor pressure). This turgor pressure drives water into the cell based on the concentration gradient. Turgor pressure is counteracted by the limited ability for expansion of the cell wall and thus determines the shape of the cells [147]. The ability to survive under rapid changes of A_w is an intrinsic characteristic of the microbial cell. Survival mechanisms in response to osmotic downshift or upshift allow passive water loss or uptake. In response to altered osmolarity, yeasts cells develop mechanisms to adjust to high external osmolarity and to maintain or to recover an inside-directed driving force for water adaptation. These mechanisms are based on sensing the osmotic changes [147] and accumulating chemically inert osmolytes, for example glycerol. The high osmolarity glycerol (HOG) signaling system plays a central role in the osmotic adaptation of yeasts. *S. cerevisiae* monitors osmotic changes through the sensor histidine kinase (Slu1) localized at the plasma membrane. Under optimal environmental conditions, Slu1 is active and inhibits signaling. Upon loss of turgor pressure, Slu1 is inactivated, and this results in the activation of the nitrogen-activated protein (NAO) kinase cascade and phosphorylation of the NAP kinase (Hog1). Active Hog1 accumulates in the nucleus, where it affects gene expression. Two HOG target genes encode for enzymes involved in the synthesis of glycerol. Because of the presence of three hydroxylic functions that attract water clouds, glycerol serves as an osmolyte to increase the intra-cellular osmotic pressure [147]. Since glycerol is more reduced than the substrate glucose, its synthesis also affects the redox metabolism. Therefore, the redox metabolism needs to be adjusted accordingly. The pathway for the synthesis of glycerol is shown in Figure 7. The NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gpd) and the glycerol-3-phosphatase (Gpp) catalyse the two step reactions. *S. cerevisiae* also possesses genes that might encode the enzyme glycerol dehydrogenase (GCY1 and YPR1) and the dihydroxyacetone kinase (DAK1 and DAK2). These two enzymes are involved in the pathway for glycerol degradation [147]. The pathway for glycerol via Gpd and Gpp converts NADH to NAD, while the conversion of glycerol to dihydroxyacetone phosphate via Gcy1p and Dak1p reduces NADP to NADPH. Hence, the glycerol-dihydroxyacetone phosphate cycle mainly acts as transhydrogenase for the interconversion of NADH to NADPH. Since stress conditions require high levels of NADPH to manage reactive oxygen species, this

pathway assumes an important role. The capacity for other NADPH-generating reactions, such as those of the pentose phosphate pathway, is also increased under stress conditions. When salt-stressed yeast is inoculated in dough with high sugar content, the fermentation time was significantly reduced and bread-specific volume increased due to glycerol accumulation and a less dense gluten network. Moreover, two-step industrial fermentation, including a pre-adaptation to osmotic stress, in order to enhance flavour, has been proposed [148].

6.3.4 Membrane Lipids as Modulators of Stress Tolerance in Yeasts

Biological membranes are the barrier that separates cells from their environment and are the primary target for damage during environmental stress. Sudden changes of environmental conditions cause alteration in the organization and structure of membrane lipids, and alter the function of many cellular activities. Homeoviscous adaptation to low temperature maintains the molecular order of membrane lipids as well as the activity of membrane-associated enzymes and transporters. To date, most of the research in this field has focused on the connection between the physical state of the membrane and cold and ethanol tolerance. In organisms producing ethanol, including yeasts, intra-cellular ethanol freely diffuses into an external medium. At high concentration, the ethanol present in the external medium acts as a chemical stress. A long-standing conundrum is the mechanism by which cells growing in the presence of a high concentration of ethanol modify their membrane composition. The plasma membrane lipid is the main site of impediment and interaction with ethanol. The altered lipid composition, following the exposure to ethanol, combats the deleterious effect. The ethanol-dependent modification of phospholipids' fatty acid composition was also shown in *S. cerevisiae* [149]. The addition of ethanol (0.5–1.5 M) to *S. cerevisiae* leads to a progressive decrease of the proportion of saturated fatty acids (SFAs) (mainly 16:0) and to a corresponding increase of the mono-unsaturated fatty acid residues, especially 18:1. This increased unsaturation favours an increase of the fluidity of the membrane. On the basis of similar observations in *Escherichia coli*, it was suggested that increased unsaturation was not due to the additional synthesis of unsaturated fatty acids (UFAs), but was the result of the decrease of levels of SFAs. An exception to this hypothesis was the increase of 18:0 in the presence of ethanol [149–151]. It is assumed that the presence of ethanol on both sides of the plasma membrane causes the separation of the two monolayers and the concurrent increased synthesis of C18 fatty acid residues, which helps in the maintenance of membrane integrity [149]. The decrease of the degree of fatty acid unsaturation along with the temperature increase is widely documented. The incorporation of exogenous oleic acid has been reported to increase the tolerance of yeasts to the lethal effect of temperatures between 41°C and 47°C [152]. Table 5 shows the modulation of the membrane fatty acid composition of two strains of *S. cerevisiae* in a temperature range from 15 to 40°C [152]. For both strains, the relationship between unsaturation level and temperature showed two maximum values at 15 and 40°C. The latter corresponds to the maximum fermentation temperature for these

strains. These results suggest that the role of the unsaturation level has to be considered not only in terms of the contribution to membrane fluidity when temperature decreases but also as a mechanism to protect the cell membrane from damage generated by oxidative and thermal stresses [152, 153]. It was postulated that an oxygen-consuming desaturase prevents the accumulation of oxygen and reactive oxygen species such as H₂O₂ in yeasts. During sourdough fermentation, yeasts are exposed to H₂O₂ [154]. It has been observed that the co-inoculation of *S. cerevisiae* and *F. sanfranciscensis* into dough gives rise to the release of medium-chain fatty acids and of 2(5H)-furanones presumably originating from peroxidation of membrane-associated UFAs, followed by a sequence of β -oxidation reactions [155, 156]. The biosynthesis or integration of UFAs in the yeast membrane is reported as a mechanism to detoxify H₂O₂ and protect cells from oxidative stress [156] and this has already been observed in *L. helveticus* [157]. ROS with consequent peroxidation of membrane fatty acids has been observed in *S. cerevisiae* after a cycle of freezing/thawing [158].

Table 5: Total cell fatty acid composition in 48 h *S. cerevisiae* cells in relation to different incubation temperatures (15, 20, 30, and 40°C) [152]

| Fatty acid ^a | Strain | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|--------------------------|-------|-------|-------|
| | <i>S. cerevisiae</i> BG7FI | | | | <i>S. cerevisiae</i> 635 | | | |
| | Temperature (°C) | | | | Temperature (°C) | | | |
| | 15 | 20 | 30 | 40 | 15 | 20 | 30 | 40 |
| C6:0 | 0 | 0.38 | 0.02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C8:0 | 0 | 0.46 | 0.21 | 0.06 | 0 | 0.16 | 0 | 0.33 |
| C10:0 | 1.44 | 6.47 | 2.05 | 0.49 | 1.06 | 2.55 | 6.06 | 0.76 |
| C10:1 | 0 | 0.54 | 0 | 0 | 0 | 0.27 | 0 | 0 |
| C12:0 | 3.72 | 7.86 | 8.11 | 3.72 | 3.43 | 8.59 | 18.21 | 3.09 |
| C12:1 | 0.11 | 0.61 | 0.93 | 0.16 | 0.24 | 0.57 | 0.76 | 0.37 |
| C14:0 | 4.02 | 2.08 | 1.52 | 1.63 | 5.28 | 4.45 | 3.56 | 1.9 |
| C14:1 | 0.81 | 0.76 | 0.62 | 0.23 | 1.78 | 1.57 | 1.25 | 0.2 |
| C16:0 | 33.19 | 37.05 | 41.28 | 38.34 | 25.84 | 32.57 | 33.77 | 33.73 |
| C16:1 | 33.62 | 26.13 | 25.06 | 30.46 | 37.26 | 28.85 | 19.47 | 30.67 |
| C18:0 | 8.13 | 8.73 | 11.19 | 12.83 | 6 | 7.17 | 8.55 | 11.31 |
| C18:1n9 | 12.41 | 8.29 | 7.82 | 9.67 | 17.17 | 12.5 | 7.03 | 15.34 |
| C18:1n11 | 0.44 | 0.24 | 0.51 | 2.01 | 0.48 | 0.35 | 0.25 | 1.64 |
| C18:2 | 2.12 | 0.39 | 0.68 | 0.42 | 1.47 | 0.41 | 1.09 | 0.64 |
| Unsaturation degree ^b | 0.51 | 0.37 | 0.36 | 0.43 | 0.59 | 0.45 | 0.31 | 0.49 |
| C16:1/C16:0 | 1.01 | 0.7 | 0.61 | 0.79 | 1.44 | 0.88 | 0.58 | 0.91 |
| C18:1/C18:0 | 1.58 | 0.98 | 0.74 | 0.91 | 2.94 | 1.79 | 0.85 | 1.5 |
| Chain length ^c | 16.16 | 15.46 | 15.86 | 16.27 | 16.15 | 15.74 | 15.12 | 16.33 |

^a Expressed as a percentage of total fatty acids

^b $\Delta/\text{mol} = [1(\text{mol}\% \text{monoenes})/100 + 2(\text{mol}\% \text{dienes})/100 + 3(\text{mol}\% \text{trienes})]/100$

^c $\Sigma(\text{PC})/100$, where P is percentage of a fatty acid and C is its carbon atom number

Sterols are membrane-associated lipids that play an important role in the tolerance to physico-chemical stresses including ethanol exposure. The ability of sterols to increase stress tolerance is well documented [159]. Oxygen is required for the cyclization of squalene to sterols. Thus, the presence of oxygen during the early phase of yeast fermentation is considered a limiting factor for growth and fermenting due to the membrane-stabilising effect of sterols. Also the synthesis of UFAs is prevented by anaerobic conditions. When sterol and UFA biosynthesis is prevented by anaerobic conditions, yeasts integrate sterols and UFAs from the fermentation media in their membranes. Cereals contain a large variety of nutrients including phytosterols, which serve as a source of membrane sterols for yeasts also in anaerobic conditions.

6.4 Secondary Yeast Metabolites in Sourdough

The formation of aroma compound in bread is a result of the interaction of many factors: on the one hand, the type of flour and other ingredients [160, 161], and on the other, the type of fermentation, with distinctive characteristics depending on the yeast, the presence of other microorganisms such as Lactic acid bacteria, temperature, fermentation time, yeast level, overall diagram of the bread-making process [95, 148, 160, 162, 163]. Bread aroma are produced by the Maillard reaction during cooking, by lactic acid bacteria or by the secondary metabolism of yeast which can produce aldehydes, esters, higher alcohols, terpen, furans, and ketones.

Numerous aldehydes have been detected in yeast bread. They are produced by a diversity of yeast species, including *S. cerevisiae* but also other sourdough yeast species, such as *W. anomalus*, *T. delbruecki*, *K. exigua*, *K. humilis*, *K. bulderi*, or *P. kudriavzevii* (Table 6). Among aldehydes, benzaldehyde is one of the most commonly found aldehyde and has been detected in bread made with all these species except *K. exigua*. Likewise, phenylacetaldehyde is frequently encountered and has been found in bread made with all the above species except *K. exigua* and *K. bulderi*.

Table 6: Aroma found in yeast dough, bread crumb or bread crust. Yeast species are indicated in column and strains code indicated into bracket when available. Aroma were supposed present when their amount were over the blank. Dash indicates either that the aroma was not found or that it was not quantified. A indicates that the aroma was quantified but had an amount under the blank. Odor descriptions were taken from Aslankoohi et al. 2016.

Esters are formed by the combination of organic acid and alcohols and are mainly catalyzed by two types of yeast enzymes, esterase and lipase. Ethyl acetate is the most common ester that has been found in yeast bread so far, followed by ethyl octanoate (Table 6). Ethyl acetate is formed by the esterification of an acetic acid with an ethanol while ethyl octanoate is a fatty-acid ester formed from caprylic acid and ethanol. They both give a fruity odor.

Higher alcohols, which refer to alcohols with more than 2 carbons, also confer odors in bread. In yeast, they originate from the catabolism of branched-chain amino acids (leucine, valine, and isoleucine), aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan), and the sulfur-containing amino acid (methionine) by the Ehrlich pathway [164]. The nitrogen composition of the flour can therefore impact their production. When ammonia is used as the nitrogen source, fusel alcohols can be synthesized via the isoleucine, valine and leucine (ILV) pathway [165]. However, their concentration drastically increases when branched chain amino acids (BCAAs) are present in the media (Table 7). The Ehrlich pathway assumes the conversion of the BCAAs to fusel alcohols by three enzymatic steps. The first step is a transaminase, in which the amino group of BCAAs is transferred to 2-oxoglutarate, resulting in branched chain oxoacids and glutamate. The second step is the decarboxylation step that converts the branched chain oxoacid to the branched chain aldehydes. The last step is the reduction step in which branched chain aldehydes are reduced to branched chain alcohols or so-called fusel alcohols ([166] Figure 9). For instance, *S. cerevisiae* and other sourdough yeasts convert leucine and phenylalanine to 3-methylbutanol and 2-phenylethanol, respectively [167]. The Strecker reaction during baking also generates α -dicarbonyl compounds such as methylglyoxal (2-oxopropanal), which leads to the corresponding aldehydes and acids [168]. Over all yeast breads analysis, the most commonly detected higher alcohols in yeast bread are 2-Methyl-1-propanol, 3-Methyl-1-butanol, 2-phenyl-ethanol, 1-hexanol, 1-pentanol, 1-heptanol. The last three (1-hexanol, 1-pentanol, 1-heptanol) are fatty alcohols and their production also depend on the lipid content of flour.

Table 7 : Higher alcohols and their precursor amino acids

| Amino acids | Ketoacids | Aldehydes | Organic acids | Alcohols | Esters |
|--------------------|--|-----------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------|
| Ile | α -Keto-3-methyl-pentanoic acid | 2-Methylbutanal | 2-Methyl butyric acid | 2-Methylbutanol | |
| Leu | α -Ketoisocaproic acid | 3-Methylbutanal; 2-Methylpropanal | 3-Methylbutyric acid; 2-Methyl propanoic acid | 3-Methylbutanol 2-Methylpropanol | Ethyl-3-methylbutanoate |
| Val | α -Ketoisovaleric acid | 2-Methylpropanal | 2-Methyl propanoic acid | 2-Methylpropanol | Ethyl isobutanoate |
| Phe | Phenyl pyruvate | Benzaldehyde | Benzoic acid | Phenylmethanol | Ethyl benzoate |
| | | Phenylacetaldehyde | Phenylacetic acid | Phenylethanol | Phenylethyl-acetate |
| Trp | Indole-3-pyruvate | Indole-3-acetaldehyde | Indole-3-acetic acid | | |
| Met | α -Keto methylthio butyrate | Methional | Methylthiobutyric acid | Methionol | Ethyl-3-methylthio propionate |
| | | Methylthio-acetaldehyde | | Methanethiol | Methylthioacetate |

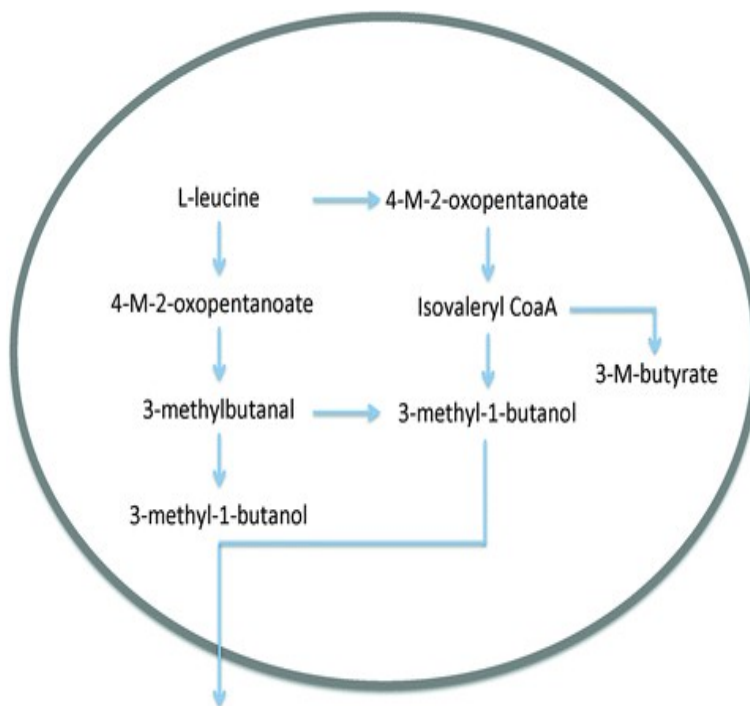


Figure 9: Schematic representation of metabolic routes of L-leucine in yeasts, leading to 4-methyl-2-oxopentanoate, 3-methyl-1-butanol and 3-methylbutyrate (Adapted from [65])

Other aroma compounds include para-vinyl-guaiacol, which is produced from ferrulic acid by yeast [169]. Ferrulic acid is the major hydroxycinnamic acid present in wheat, and is mostly located in bran. Its content changes with the wheat species, variety and terroir [104]. The production of vinyl-guaiacol by yeast can thus be influenced by the type and origin of the flour. Thiols, that are known to confer specific aroma to wine, have not been found in bread. By contrast, terpenes, which are also known to contribute highly to wine flavor, are present. Limonene was found in several studies and was detected in yeast breads made with *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *T. delbrueckii*. As for wine, not many ketones were found in bread. Most of them were detected in bread made with *S. cerevisiae* (Table 6). However, additional research studies should be done to get a better picture of the diversity of aroma metabolism among bread yeast species.

7. Baker's yeast in the bread-making industry

The production of baker's yeast biomass represents a highly competitive multi-billion dollar global industry. The large variety of bread-making processes and recipes used around the world place considerable demands on baker's yeasts. These demands translate into technological and economic challenges for baker's yeast industries. During production and dough fermentation, cells of baker's yeasts are exposed to environmental stresses such as freeze-thaw, dehydration and oxidation. Damage to cell macromolecules (e.g. proteins, nucleic acids and membranes) is avoided through microbial adaptation and tolerance to multiple stress conditions [170].

7.1 Baker's Yeast Production

The first stage in the production of baker's yeast consists of growing the yeast from a pure culture in a series of fermentation vessels. Baker's yeast is recovered from the last step of fermentation through centrifugation to concentrate the biomass. Subsequently, filtration further concentrates the yeast cells. The collected pellet is blended in mixers with small amounts of water, emulsifiers, and oil. Finally, the mixed press cake is extruded, cut and either wrapped for shipment or dried to form dry yeast.

7.1.1 Raw Materials

The species *S. cerevisiae* is used for producing compressed yeast. Different strains of *S. cerevisiae* are required to produce each of the two dry yeast products, Active Dry Yeast (ADY) and Instant Dry Yeast (IDY). Instant dry yeast is produced from a faster-reacting yeast strain than that used for ADY. Cane molasses and beet molasses are the principal substrates for yeast growth. Molasses contains 45–55% (wt/wt) of fermentable carbohydrates (sucrose, glucose and fructose). The amount and type of cane and beet molasses used depend on the types and costs, and on the presence of inhibitors and toxins. Usually, a blend consisting of both cane and beet molasses is used. Once the molasses mixture is blended, the pH is adjusted to 4.5–5.0 to prevent bacterial growth. The substrate is clarified to remove sludge and is then sterilised with high-pressure steam. After sterilisation, it is diluted with water and held in tanks until use. Additional nutrients, including nitrogen, potassium, phosphate, magnesium and calcium, with traces of iron, zinc, copper, manganese and molybdenum, are added. Usually, nitrogen is supplied by adding ammonium salts, aqueous ammonia or anhydrous ammonia. Phosphates and magnesium are added in the form of phosphoric acid or phosphate salts and magnesium salts. Vitamins such as biotin, inositol, pantothenic acid and thiamine are also required. The latter is added to the feedstock, while the others are already present in the molasses malt.

7.1.2 Fermentation

Yeast cells are grown in a series of fermentations to decrease the synthesis of ethanol and CO₂. The fermentation is operated under aerobic conditions. The initial stage of propagation takes place in the laboratory. A portion of the pure yeast culture is mixed

with molasses malt in a sterilised flask, and the yeast is allowed to grow for 2–4 days. The entire content of the flask is used to inoculate the first fermentation vessel. Batch fermentations are carried out, where the yeast is allowed to grow for 13–24 h. Usually, one or two vessels are used for this stage of the process. The batch fermentations are essentially a propagation of the flask fermentation, except for the use of sterile aeration and aseptic transfer for the subsequent stage. Following pure culture fermentations, the yeast mixture is transferred into an intermediate vessel under batch or fed-batch conditions. The following fermentation is a stock fermentation stage (Figure 10). The content from the intermediate vessel is pumped into the stock vessel, which is equipped for increasing feeding under aeration. This stage is termed stock fermentation, since after the fermentation is completed, the yeast biomass is separated from the bulk of the vessel through centrifugation, which produces a stock of yeast for the next stage. The next stage, pitch fermentation, also produces a stock of yeast. Aeration is vigorous, and molasses and other nutrients are increasingly fed into the vessel. The liquor from this vessel is usually shared into several parts for pitching the final trade fermentation. Alternatively, the yeast is separated by centrifugation and stored for several days before use. The final trade fermentation has the highest degree of aeration. A large air supply is required and the vessels are often started in a staggered fashion to reduce the size of the air compressors. The initial fermentation lasts 11–15 h. After which the molasses have been fed into the vessel, the liquid is aerated for 0.5–1.5 h to allow a further maturation of the yeast. This step has a stabilising effect for the subsequent refrigerated storage. The content of the yeast biomass increases stage by stage: ca. 120 kg in the intermediate vessel, 420 kg in the stock vessel, 2,500 kg in the pitch vessel, and 15,000–100,000 kg in the trade vessel. Once the optimum quantity of yeast is grown, the biomass is recovered from the final trade vessel by centrifugation. The centrifuged yeast biomass is further concentrated by a filter press or rotary vacuum filter. The filter press forms a filter cake containing 27–32% of solids. The rotary vacuum filter forms a cake with ca. 33% of solids. The filter cake is then blended in mixers with small amounts of water, emulsifiers, and cutting oils to form the end-product. The final packaging steps vary depending on the type of yeast product.

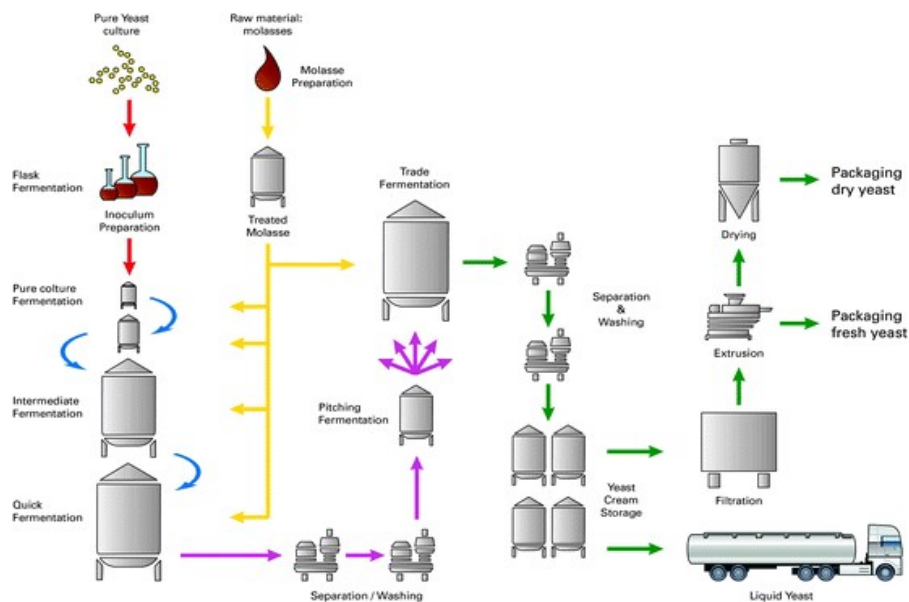


Figure 10 : Process layout of the different commercial baker's yeast formulas.

For the compressed yeast formula, emulsifiers are added giving the yeast a white, creamy appearance and inhibiting water spotting of the yeast cake. A small amount of oil, usually soybean or cottonseed oil, is added to help the extrusion of the yeast through nozzles to form continuous ribbons of yeast cake. The ribbons are cut, and the yeast cake is wrapped and cooled to less than 8°C, being ready for the market under refrigerated conditions. For dry yeast preparation, after filtration the biomass is sent to an extruder, where emulsifiers and oils (different from those used for compressed yeast) are added to texturise it and to help extrusion. After extrusion in thin ribbons, the yeast is cut and dried under batch or continuous drying systems. Following drying, the yeast is vacuum-packed or packed under nitrogen gas before heat sealing. The shelf-life at room temperature is 1–2 years.

7.2 General Characteristics of Fresh and Dry Baker's Yeast

Baker's yeast consists of living cells of *S. cerevisiae*. To describe the characteristics of baker's yeast, two types of formula are considered: fresh and dry yeast.

7.2.1 Fresh Baker's Yeast

Fresh baker's yeast is commercialised as block or compressed yeast, granulated yeast and liquid (cream) yeast. Compressed yeast is available in blocks with variable consistency. The consistency varies from high plasticity (kneadable) to friable (crumbly texture). Granulated yeast is in the form of small granules. Liquid yeast is a suspension of yeast cells in water with a cream-like viscosity. The dry matter content of fresh baker's yeast varies depending on the formula, the fermentation performance, and the consistency/friability. Liquid and compressed yeast with high plasticity and friability have a dry matter content of 15–21, 27–31 and 30–35%, respectively. The dry matter of

granulated yeast is 31–37%. The nitrogen content of the dry matter has a value of ca. 8.0%. The ash content of the dry matter is ca. 6%, and the value of pH is usually ca. 5.0. Fresh baker's yeast is suitable to be used directly in dough. As it is a perishable product, it should be stored under refrigerated conditions.

7.2.2 Dry Baker's Yeast

Dry baker's yeast is sold as active dry yeast (ADY) and instant dry yeast (IDY). ADY is characterised by spherical particles with a diameter of 0.2–3 mm. The yeast is reactivated under warm water at ca. 38°C (not exceeding 45°C) and then used as fresh yeast. IDY consists of porous cylindrical particles with a diameter of 0.5 mm and length up to a few millimetres. Rehydration in water is not necessary and it may be added directly to the flour. Depending on the activity and recipe, IDY is added to the flour at a level that corresponds to one-third of that of fresh yeast. Direct contact of the yeast with salt, fat or sugar has to be avoided to prevent osmotic stress and dispersion during rehydration of the flour. Careful rehydration of the flour with water at room temperature is needed. The dry matter ranges from 92–96 to 93–97% for ADI and IDY, respectively. The density is 75–95 and 55–80% for ADI and IDY, respectively. The nitrogen content of the dry matter has a value of ca. 8.0% and the ash content of the dry matter is ca. 6%, with a pH of usually ca. 6.0.

References

- [1] Nagy LG, Ohm RA, Kovács GM, Floudas D, Riley R, Gácsér A, et al. (2014). Latent homology and convergent regulatory evolution underlies the repeated emergence of yeasts. *Nat Commun*, 5:4471.
- [2] Vu D, Groenewald M, Szöke S, Cardinali G, Eberhardt U, Stielow B, et al. (2016). DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Stud Mycol*, 85:91–105.
- [3] Kurtzman C, Robnett C, Basehoar-Powers E (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res.* doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00419.x.
- [4] Jacques N, Sarilar V, Urien C, Lopes MR, Morais CG, Uetanabaro APT, et al. (2016). Three novel ascomycetous yeast species of the *Kazachstania* clade, *Kazachstania saulgeensis* sp. nov., *Kazachstania serrabonitensis* sp. nov. and *Kazachstania australis* sp. nov. Reassignment of *Candida humilis* to *Kazachstania*

- humilis f.a. comb. nov. and *Candida pseudohumilis* to *Kazachstania pseudohumilis* f.a. comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66:5192–5200.
- [5] Lachance M-A (2018). C. P. Kurtzman's evolving concepts of species, genus and higher categories. *FEMS Yeast Res.* doi: 10.1093/femsyr/foy103.
- [6] Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73:331–371.
- [7] Libkind D, Čadež N, Opulente DA, Langdon QK, Rosa CA, Sampaio JP, et al. (2020). Towards yeast taxogenomics: lessons from novel species descriptions based on complete genome sequences. *FEMS Yeast Res*, 20:foaa042.
- [8] Dujon B (2010). Yeast evolutionary genomics. *Nat Rev Genet*, 11:512–524.
- [9] Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, et al. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108:14539–14544.
- [10] Landis EA, Oliverio AM, McKenney EA, Nichols LM, Kfoury N, Biango-Daniels M, et al. (2021). The diversity and function of sourdough starter microbiomes. *eLife*, 10:e61644.
- [11] Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Volume 1. 539.
- [12] Carbonetto B, Ramsayer J, Nidelet T, Legrand J, Sicard D (2018). Bakery yeasts, a new model for studies in ecology and evolution. *Yeast*, 35:591–603.
- [13] Sarilar V, Sterck L, Matsumoto S, Jacques N, Neuvéglise C, Tinsley CR, et al. (2017). Genome sequence of the type strain CLIB 1764T (= CBS 14374T) of the yeast species *Kazachstania saulgeensis* isolated from French organic sourdough. *Genomics Data*, 13:41–43.
- [14] De Vuyst L, Harth H, Van Kerrebroeck S, Leroy F (2016). Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *Int J Food Microbiol*, 239:26–34.
- [15] De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel H-M, Weckx S (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiol*, 37:11–29.
- [16] Huys G, Daniel H-M, De Vuyst L (2013). Taxonomy and Biodiversity of Sourdough Yeasts and Lactic Acid Bacteria. In: Gobbetti M, Gänzle M, editors *Handb. Sourdough Biotechnol.* Boston, MA: Springer US, 105–154.

- [17] Sugihara TF, Kline L, Miller MW (1971). Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process: I. Yeasts Responsible for the Leavening Action. *Appl Microbiol*, 21:456–458.
- [18] Spicher G, Schröder R (1979). Die Mikroflora des Sauerteiges. *Z Für Lebensm-Unters Forsch*, 168:188–192.
- [19] Barber S, Baguena R, Martinez-Anaya MA, Torner MJ (Consejo S de IC (1983). Microflora of the sour dough of wheat flour bread, 1: Identification and functional properties of microorganisms of industrial sour doughs. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. Spain* .
- [20] Salovaara H, Savolainen J (1984). Yeast type isolated from Finnish sour rye dough starters. *Acta Aliment. Pol.* 10:.
- [21] Barber S, Baguena R (Consejo S de IC (1988). Microflora of the sour dough of wheat flour bread, 5: Isolation, identification and evaluation of functional properties of sour dough's microorganisms. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. Spain* .
- [22] Hamad SH, Böcker G, Vogel RF, Hammes WP (1992). Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kisra production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 37:728–731.
- [23] Infantes M (Institut N de la RA, Schmidt JL (1992). Characterisation of the yeast flora of natural sourdoughs located in various french areas. *Sci. Aliments Fr.* .
- [24] Boraam F, Faid M, Larpent JP, Breton A (1993). Lactic acid bacteria and yeast associated with traditional Moroccan sour-dough bread fermentation. *Lact Acid Bact Yeast Assoc Tradit Moroc Sour-Dough Bread Ferment*, 13:501–509.
- [25] Iorizzo M, Coppola R, Sorrentino E, Grazia L (1995). Caratterizzazione microbiologica di paste acide Molisane. *Caratter Microbiol Paste Acide Molisane*, 34:1290–1294.
- [26] Almeida MJ, Pais CS (1996). Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Lett Appl Microbiol*, 23:154–158.
- [27] Foschino R, Terraneo R, Mora D, Galli A (1999). Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Ital J Food Sci*, 11:19–28.
- [28] Mäntynen VH, Korhola M, Gudmundsson H, Turakainen H, Alfredsson GA, Salovaara H, et al. (1999). A Polyphasic Study on the Taxonomic Position of Industrial Sour Dough Yeasts. *Syst Appl Microbiol*, 22:87–96.
- [29] Paramithiotis S, Müller MRA, Ehrmann MA, Tsakalidou E, Seiler H, Vogel R, et al. (2000). Polyphasic Identification of Wild Yeast Strains Isolated from Greek Sourdoughs. *Syst Appl Microbiol*, 23:156–164.

- [30] Rosenquist H, Hansen Å (2000). The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiol*, 17:241–250.
- [31] Pulvirenti A, Caggia C, Restuccia C, Gullo M, Giudici P (2001). DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs. *Ann Microbiol*, 51:107–120.
- [32] Gullo M, Romano AD, Pulvirenti A, Giudici P (2003). *Candida humilis*—dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *Int J Food Microbiol*, 80:55–59.
- [33] Succi M, Reale A, Andrighetto C, Lombardi A, Sorrentino E, Coppola R (2003). Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiol Lett*, 225:143–148.
- [34] Foschino R, Gallina S, Andrighetto C, Rossetti L, Galli A (2004). Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Res*, 4:609–618.
- [35] Gatto V, Torriani S (2004). Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Ann Microbiol*, 54:31–42.
- [36] Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, Vero LD, Giudici P (2004). Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett Appl Microbiol*, 38:113–117.
- [37] Vernocchi P, Valmorri S, Gatto V, Torriani S, Gianotti A, Suzzi G, et al. (2004). A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Res Int*, 37:469–476.
- [38] Garofalo C, Silvestri G, Aquilanti L, Clementi F (2008). PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *J Appl Microbiol*, 105:243–254.
- [39] Vrancken G, De Vuyst L, Van der Meulen R, Huys G, Vandamme P, Daniel H-M (2010). Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Res*, 10:471–481.
- [40] Iacumin L, Cecchini F, Manzano M, Osualdini M, Boscolo D, Orlic S, et al. (2009). Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiol*, 26:128–135.
- [41] Luangsakul N, Keeratipibul S, Jindamorakot S, Tanasupawat S (2009). Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. *LWT - Food Sci Technol*, 42:1404–1412.

- [42] Osimani A, Zannini E, Aquilanti L, Mannazzu I, Comitini F, Clementi F (2009). Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche Region. doi: 10.1186/1475-2589-8-55.
- [43] Saeed M, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Sajjad-Ur-Rehman (2009). Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. *Int J Agric Biol*, 11:329–332.
- [44] Paramithiotis S, Tsiasiotou S, Drosinos EH (2010). Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur Food Res Technol*, 231:883–890.
- [45] Valmorri S, Tofalo R, Settanni L, Corsetti A, Suzzi G (2010). Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy).
- [46] Moroni AV, Arendt EK, Bello FD (2011). Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol*, 28:497–502.
- [47] Zhang J, Liu W, Sun Z, Bao Q, Wang F, Yu J, et al. (2011). Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. *Food Control*, 22:767–774.
- [48] Nuobariene L, Hansen ÅS, Arneborg N (2012). Isolation and identification of phytase-active yeasts from sourdoughs. *LWT - Food Sci Technol*, 48:190–196.
- [49] Minervini F, Cagno RD, Lattanzi A, Angelis MD, Antonielli L, Cardinali G, et al. (2012). Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas of 19 Sourdoughs Used for Traditional/Typical Italian Breads: Interactions between Ingredients and Microbial Species Diversity. *Appl Environ Microbiol*, 78:1251–1264.
- [50] Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M (2012). Influence of Artisan Bakery- or Laboratory-Propagated Sourdoughs on the Diversity of Lactic Acid Bacterium and Yeast Microbiotas. *Appl Environ Microbiol*, 78:5328–5340.
- [51] Desiye A, Abegaz K (2013). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeast involved in fermentation of Teff (*EragrostisTef*) Batter. undefined .
- [52] Lhomme E, Sandra M (2014). A polyphasic approach to study the dynamics of microbial population of an organic wheat sourdough during its conversion to gluten-free sourdough. *Int Microbiol*, 1–9.
- [53] Zhang G, Sadiq FA, Zhu L, Liu T, Yang H, Wang X, et al. (2015). Investigation of Microbial Communities of Chinese Sourdoughs Using Culture-Dependent and DGGE Approaches. *J Food Sci*, 80:M2535–M2542.

- [54] Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Celano G, Gobbetti M (2015). House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiol*, 52:66–76.
- [55] Lhomme E, Lattanzi A, Dousset X, Minervini F, De Angelis M, Lacaze G, et al. (2015). Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *Int J Food Microbiol*, 215:161–170.
- [56] Lhomme E, Urien C, Legrand J, Dousset X, Onno B, Sicard D (2016). Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiol*, 53:41–50.
- [57] Arici M, Ozulku G, Yildirim RM, Sagdic O, Durak MZ (2017). Biodiversity and technological properties of yeasts from Turkish sourdough. *Food Sci Biotechnol*, 27:499–508.
- [58] Decimo M, Quattrini M, Ricci G, Fortina MG, Brasca M, Silveti T, et al. (2017). Evaluation of microbial consortia and chemical changes in spontaneous maize bran fermentation. *AMB Express*. doi: 10.1186/s13568-017-0506-y.
- [59] Liu T, Li Y, Sadiq FA, Yang H, Gu J, Yuan L, et al. (2018). Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. *Food Chem*, 242:404–411.
- [60] Urien C, Legrand J, Montalent P, Casaregola S, Sicard D (2019). Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2019.00201.
- [61] Reese AT, Madden AA, Joossens M, Lacaze G, Dunn RR (2020). Influences of Ingredients and Bakers on the Bacteria and Fungi in Sourdough Starters and Bread. *mSphere*. doi: 10.1128/mSphere.00950-19.
- [62] Syrokou MK, Themeli C, Paramithiotis S, Mataragas M, Bosnea L, Argyri AA, et al. (2020). Microbial Ecology of Greek Wheat Sourdoughs, Identified by a Culture-Dependent and a Culture-Independent Approach. *Foods Basel Switz*. doi: 10.3390/foods9111603.
- [63] Fraberger V, Unger C, Kummer C, Domig KJ (2020). Insights into microbial diversity of traditional Austrian sourdough. *LWT*, 127:109358.
- [64] Comasio A, Verce M, Van Kerrebroeck S, De Vuyst L (2020). Diverse Microbial Composition of Sourdoughs From Different Origins. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2020.01212.
- [65] Chiva R, Celador-Lera L, Uña JA, Jiménez-López A, Espinosa-Alcantud M, Mateos-Horganero E, et al. (2021). Yeast Biodiversity in Fermented Doughs and Raw Cereal Matrices and the Study of Technological Traits of Selected Strains Isolated in Spain. *Microorganisms*, 9:47.

- [66] Mortimer R, Polsinelli M (1999). On the origins of wine yeast. *Res Microbiol*, 150:199–204.
- [67] Stefanini I, Dapporto L, Legras J-L, Calabretta A, Di Paola M, De Filippo C, et al. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109:13398–13403.
- [68] Francesca N, Canale DE, Settanni L, Moschetti G (2012). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environ Microbiol Rep*, 4:105–112.
- [69] Ricci I, Damiani C, Scuppa P, Mosca M, Crotti E, Rossi P, et al. (2011). The yeast *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) inhabits the midgut and reproductive system of the Asian malaria vector *Anopheles stephensi*. *Environ Microbiol*, 13:911–921.
- [70] Stefanini I (2018). Yeast-insect associations: It takes guts. *Yeast Chichester Engl*, 35:315–330.
- [71] Christiaens JF, Franco LM, Cools TL, De Meester L, Michiels J, Wenseleers T, et al. (2014). The Fungal Aroma Gene *ATF1* Promotes Dispersal of Yeast Cells through Insect Vectors. *Cell Rep*, 9:425–432.
- [72] Egert M, Simmering R (2016). The Microbiota of the Human Skin. In: Schwartz A, editor *Microbiota Hum. Body Implic. Health Dis.* Cham: Springer International Publishing, 61–81.
- [73] Leung MHY, Tong X, Bastien P, Guinot F, Tenenhaus A, Appenzeller BMR, et al. (2020). Changes of the human skin microbiota upon chronic exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants. *Microbiome*, 8:1–17.
- [74] Goddard MR, Anfang N, Tang R, Gardner RC, Jun C (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ Microbiol*, 12:63–73.
- [75] Van der Meulen R, Scheirlinck I, Van Schoor A, Huys G, Vancanneyt M, Vandamme P, et al. (2007). Population Dynamics and Metabolite Target Analysis of Lactic Acid Bacteria during Laboratory Fermentations of Wheat and Spelt Sourdoughs. *Appl Environ Microbiol*, 73:4741–4750.
- [76] Celano G, De Angelis M, Minervini F, Gobbetti M (2016). Different Flour Microbial Communities Drive to Sourdoughs Characterized by Diverse Bacterial Strains and Free Amino Acid Profiles. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2016.01770.
- [77] Gobbetti M, Minervini F, Pontonio E, Di Cagno R, De Angelis M (2016). Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *Int J Food Microbiol*, 239:3–18.

- [78] Scheirlinck I, Meulen RV der, Vuyst LD, Vandamme P, Huys G (2009). Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *J Appl Microbiol*, 106:1081–1092.
- [79] De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Leroy F (2017). Microbial Ecology and Process Technology of Sourdough Fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* Elsevier, 49–160.
- [80] Vogelmann SA, Hertel C (2011). Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol*, 28:583–589.
- [81] Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2003). Identification and Population Dynamics of Yeasts in Sourdough Fermentation Processes by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 69:7453–7461.
- [82] Bessmeltseva M, Viiard E, Simm J, Paalme T, Sarand I (2014). Evolution of Bacterial Consortia in Spontaneously Started Rye Sourdoughs during Two Months of Daily Propagation. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0095449.
- [83] Brandt MJ, Hammes WP, Gänzle MG (2004). Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol*, 218:333–338.
- [84] Gänzle MG, Ehmann M, Hammes WP (1998). Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 64:2616–2623.
- [85] Di Cagno R, Pontonio E, Buchin S, De Angelis M, Lattanzi A, Valerio F, et al. (2014). Diversity of the lactic acid bacterium and yeast microbiota in the switch from firm- to liquid-sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 80:3161–3172.
- [86] Pétel C, Onno B, Prost C (2017). Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. *Trends Food Sci Technol*, 59:105–123.
- [87] Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, Leroy F, Vuyst LD (2011). Influence of Temperature and Backslopping Time on the Microbiota of a Type I Propagated Laboratory Wheat Sourdough Fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 77:2716–2726.
- [88] Vellend M (2010). Conceptual Synthesis in Community Ecology. *Q Rev Biol*, 85:183–206.
- [89] Palla M, Agnolucci M, Calzone A, Giovannetti M, Di Cagno R, Gobbetti M, et al. (2019). Exploitation of autochthonous Tuscan sourdough yeasts as potential starters. *Int J Food Microbiol*, 302:59–68.

- [90] EL-Fiky ZA, Hassan GM, Emam AM (2012). Quality Parameters and RAPD-PCR Differentiation of Commercial Baker's Yeast and Hybrid Strains. *J Food Sci*, 77:M312–M317.
- [91] Yang H, Liu T, Zhang G, He G (2020). Intraspecific diversity and fermentative properties of *Saccharomyces cerevisiae* from Chinese traditional sourdough. *LWT*, 124:109195.
- [92] Bigey F, Segond D, Friedrich A, Guezenec S, Bourgais A, Huyghe L, et al. (2021). Evidence for Two Main Domestication Trajectories in *Saccharomyces cerevisiae* Linked to Distinct Bread-Making Processes. *Curr Biol*, 31:722-732.e5.
- [93] Jayaram VB, Cuyvers S, Verstrepen KJ, Delcour JA, Courtin CM (2014). Succinic acid in levels produced by yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) during fermentation strongly impacts wheat bread dough properties. *Food Chem*, 151:421–428.
- [94] Jayaram VB, Rezaei MN, Cuyvers S, Verstrepen KJ, Delcour JA, Courtin CM (2014). Ethanol at Levels Produced by *Saccharomyces cerevisiae* during Wheat Dough Fermentation Has a Strong Impact on Dough Properties. *J Agric Food Chem*, 62:9326–9335.
- [95] Birch AN, Petersen MA, Hansen ÅS (2013). The aroma profile of wheat bread crumb influenced by yeast concentration and fermentation temperature. *LWT - Food Sci Technol*, 50:480–488.
- [96] Pico J, Bernal J, Gómez M (2015). Wheat bread aroma compounds in crumb and crust: A review. *Food Res Int*, 75:200–215.
- [97] Aslankoochi E, Herrera-Malaver B, Rezaei MN, Steensels J, Courtin CM, Verstrepen KJ (2016). Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread. *PLOS ONE*, 11:e0165126.
- [98] Daniel H-M, Moons M-C, Huret S, Vrancken G, De Vuyst L (2011). *Wickerhamomyces anomalus* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99:63–73.
- [99] Samuel D (1994). An archaeological study of baking and bread in New Kingdom Egypt. doi: 10.17863/CAM.15973.
- [100] Samuel D (2002). Bread in archaeology. *Civlis Rev Int D'anthropologie Sci Hum*, 27–36.
- [101] Shevchenko A, Yang Y, Knaust A, Thomas H, Jiang H, Lu E, et al. (2014). Proteomics identifies the composition and manufacturing recipe of the 2500-year old sourdough bread from Subeixi cemetery in China. *J Proteomics*, 105:363–371.
- [102] Gobbetti M (1998). The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Technol*, 9:267–274.

- [103] Carbonetto B, Nidelet T, Guezenec S, Perez M, Segond D, Sicard D (2020). Interactions between *Kazachstania humilis* Yeast Species and Lactic Acid Bacteria in Sourdough. *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms8020240.
- [104] Boudaoud S, Aouf C, Devillers H, Sicard D, Segond D (2021). Sourdough yeast-bacteria interactions can change ferulic acid metabolism during fermentation. *Food Microbiol*, 103790.
- [105] Rogalski E, Ehrmann MA, Vogel RF (2020). Role of *Kazachstania humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in the strain-specific assertiveness of *Fructilactobacillus sanfranciscensis* strains in rye sourdough. *Eur Food Res Technol*, 246:1817–1827.
- [106] Hoeksema JD, Bruna EM Context-dependent outcomes of mutualistic interactions. Oxford University Press; 2015.
- [107] Johnson NC, Wilson GWT, Wilson JA, Miller RM, Bowker MA (2015). Mycorrhizal phenotypes and the Law of the Minimum. *New Phytol*, 205:1473–1484.
- [108] Winters M, Panayotides D, Bayrak M, Rémont G, Viejo CG, Liu D, et al. (2019). Defined co-cultures of yeast and bacteria modify the aroma, crumb and sensory properties of bread. *J Appl Microbiol*, 127:778–793.
- [109] Wurz REM, Kepner RE, Webb AD (1988). The Biosynthesis of Certain Gamma-Lactones from Glutamic Acid by Film Yeast Activity on the Surface of Flor Sherry. *Am J Enol Vitic*, 39:234–238.
- [110] Marzluf GA (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*, 61:17–32.
- [111] Levy S, Ihmels J, Carmi M, Weinberger A, Friedlander G, Barkai N (2007). Strategy of Transcription Regulation in the Budding Yeast. *PLoS ONE*, 2:e250.
- [112] Gianotti A, Vannini L, Gobbetti M, Corsetti A, Gardini F, Guerzoni ME (1997). Modelling of the activity of selected starters during sourdough fermentation. *Food Microbiol*, 14:327–337.
- [113] Wehrle K, Arendt EK (1998). Rheological Changes in Wheat Sourdough During Controlled and Spontaneous Fermentation. *Cereal Chem*, 75:882–886.
- [114] Paramithiotis S, Gioulatos S, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G (2006). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem*, 41:2429–2433.
- [115] Yeh LT, Wu M-L, Charles AL, Huang T-C (2009). A novel steamed bread making process using salt-stressed baker's yeast. *Int J Food Sci Technol*, 44:2637–2643.

- [116] Verduyn C, Zomerdijk TPL, van Dijken JP, Scheffers WA (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl Microbiol Biotechnol*, 19:181–185.
- [117] Käppeli O (1987). Regulation of Carbon Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and Related Yeasts. In: Rose AH, Tempest DW, editors *Adv. Microb. Physiol.* Academic Press, 181–209.
- [118] Özcan S, Johnston M (1999). Function and Regulation of Yeast Hexose Transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63:554–569.
- [119] Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M (1997). Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *Eur J Biochem*, 245:324–333.
- [120] Barnett JA, Entian K-D (2005). A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22:835–894.
- [121] Hagman A, Säll T, Compagno C, Piskur J (2013). Yeast “Make-Accumulate-Consume” Life Strategy Evolved as a Multi-Step Process That Predates the Whole Genome Duplication. *PLOS ONE*, 8:e68734.
- [122] Hagman A, Säll T, Piškur J (2014). Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. *FEBS J*, 281:4805–4814.
- [123] Perez-Samper G, Cerulus B, Jariani A, Vermeersch L, Simancas NB, Bisschops MMM, et al. (2018). The Crabtree Effect Shapes the *Saccharomyces cerevisiae* Lag Phase during the Switch between Different Carbon Sources. *mBio*. doi: 10.1128/mBio.01331-18.
- [124] Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2:183–201.
- [125] Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008). How *Saccharomyces* Responds to Nutrients. *Annu Rev Genet*, 42:27–81.
- [126] Santangelo GM (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70:253–282.
- [127] Turcotte B, Liang XB, Robert F, Soontornngun N (2009). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res*, 10:2–13.
- [128] Fendt S-M, Sauer U (2010). Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates. *BMC Syst Biol*, 4:12.
- [129] Goddard MR (2008). Quantifying the Complexities of *Saccharomyces Cerevisiae*'s Ecosystem Engineering Via Fermentation. *Ecology*, 89:2077–2082.

- [130] Rokhlenko O, Wexler Y, Yakhini Z (2007). Similarities and differences of gene expression in yeast stress conditions. *Bioinformatics*, 23:e184–e190.
- [131] Ball CA, Dolinski K, Dwight SS, Harris MA, Issel-Tarver L, Kasarskis A, et al. (2000). Integrating functional genomic information into the *Saccharomyces Genome Database*. *Nucleic Acids Res*, 28:77–80.
- [132] Gasch AP (2003). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. In: Hohmann S, Mager WH, editors *Yeast Stress Responses*. Berlin, Heidelberg: Springer, 11–70.
- [133] Bose S, Dutko JA, Zitomer RS (2005). Genetic Factors That Regulate the Attenuation of the General Stress Response of Yeast. *Genetics*, 169:1215–1226.
- [134] Barber B, Ortolá C, Barber S, Fernández F (1992). Storage of packaged white bread. *Z Für Lebensm-Unters Forsch*, 194:442–449.
- [135] Serrazanetti DI, Guerzoni ME, Corsetti A, Vogel R (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol*, 26:700–711.
- [136] Hüfner E, Britton RA, Roos S, Jonsson H, Hertel C (2008). Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Syst Appl Microbiol*, 31:323–338.
- [137] Häggman M, Salovaara H (2008). Effect of fermentation rate on endogenous leavening of *Candida milleri* in sour rye dough. *Food Res Int*, 41:266–273.
- [138] Tai SL, Daran-Lapujade P, Walsh MC, Pronk JT, Daran J-M (2007). Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to Low Temperature: A Chemostat-based Transcriptome Analysis. *Mol Biol Cell*, 18:5100–5112.
- [139] Sahara T, Goda T, Ohgiya S (2002). Comprehensive Expression Analysis of Time-dependent Genetic Responses in Yeast Cells to Low Temperature*. *J Biol Chem*, 277:50015–50021.
- [140] Schade B, Jansen G, Whiteway M, Entian KD, Thomas DY (2004). Cold Adaptation in Budding Yeast. *Mol Biol Cell*, 15:5492–5502.
- [141] Homma T, Iwahashi H, Komatsu Y (2003). Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology*, 46:230–237.
- [142] Murata Y, Homma T, Kitagawa E, Momose Y, Sato MS, Odani M, et al. (2006). Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. *Extremophiles*, 10:117–128.
- [143] Castrillo JI, Zeef LA, Hoyle DC, Zhang N, Hayes A, Gardner DC, et al. (2007). Growth control of the eukaryote cell: a systems biology study in yeast. *J Biol*, 6:4.

- [144] Kandrór O, Bretschneider N, Kreydin E, Cavalieri D, Goldberg AL (2004). Yeast Adapt to Near-Freezing Temperatures by STRE/Msn2,4-Dependent Induction of Trehalose Synthesis and Certain Molecular Chaperones. *Mol Cell*, 13:771–781.
- [145] Peres MFS, Tininis CRCS, Souza CS, Walker GM, Laluce C (2005). Physiological responses of pressed baker's yeast cells pre-treated with citric, malic and succinic acids. *World J Microbiol Biotechnol*, 21:537–543.
- [146] Melo HFD, Bonini BM, Thevelein J, Simões DA, Morais MA (2010). Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *J Appl Microbiol*, 109:116–127.
- [147] Hohmann S (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66:300–372.
- [148] Vernocchi P, Ndagijimana M, Serrazanetti D, Gianotti A, Vallicelli M, Guerzoni ME (2008). Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli. *Food Chem*, 108:1217–1225.
- [149] Beaven MJ, Charpentier C, Rose AH (1982). Production and Tolerance of Ethanol in Relation to Phospholipid Fatty-acyl Composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Microbiology*, 128:1447–1455.
- [150] Ingram LO (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol*, 125:670–678.
- [151] Buttké TM, Ingram LO (1978). Mechanism of ethanol-induced changes in lipid composition of *Escherichia coli*: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vivo. *Biochemistry*, 17:637–644.
- [152] Sinigaglia M, Gardini F, Guerzoni ME (1993). Relationship between thermal behaviour, fermentation performance and fatty acid composition in two strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 39:593–598.
- [153] Guerzoni ME, Ferruzzi M, Sinigaglia M, Criscuoli GC (1997). Increased cellular fatty acid desaturation as a possible key factor in thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol*. doi: 10.1139/m97-080.
- [154] Vermeulen N, Gänzle MG, Vogel RF (2007). Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol*, 103:1197–1205.
- [155] Ndagijimana M, Vallicelli M, Cocconcelli PS, Cappa F, Patrignani F, Lanciotti R, et al. (2006). Two 2[5H]-Furanones as Possible Signaling Molecules in *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol*, 72:6053–6061.

- [156] Guerzoni ME, Vernocchi P, Ndagijimana M, Gianotti A, Lanciotti R (2007). Generation of aroma compounds in sourdough: Effects of stress exposure and lactobacilli–yeasts interactions. *Food Microbiol*, 24:139–148.
- [157] Guerzoni ME, Lanciotti R, Cocconcelli PS (2001). Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. *Microbiology*, 147:2255–2264.
- [158] Rodríguez-Vargas S, Sánchez-García A, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Rande-Gil F (2007). Fluidization of Membrane Lipids Enhances the Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to Freezing and Salt Stress. *Appl Environ Microbiol*, 73:110–116.
- [159] Thomas DS, Hossack JA, Rose AH (1978). Plasma-Membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, 117:239–245.
- [160] Maeda T, Kim JH, Ubukata Y, Morita N (2009). Analysis of volatile compounds in polished-graded wheat flour bread using headspace sorptive extraction. *Eur Food Res Technol*, 228:457–465.
- [161] Chang C-Y, Seitz LM, Iv EC Volatile Flavor Components of Breads Made from Hard Red Winter Wheat and Hard White Winter Wheat'. 6.
- [162] Poinot P, Arvisenet G, Grua J, Colas D, Fillonneau C, Le-Bail A, et al. (2008). Influence of formulation and process on the aromatic profile and physical characteristics of bread. *J Cereal Sci*, 48:686–697.
- [163] Zehentbauer G, Grosch W (1998). Crust aroma of baguettes II. Dependence of the concentrations of key odorants on yeast level and dough processing. *J Cereal Sci*, 28:93–96.
- [164] Hazelwood LA, Daran J-M, Maris AJA van, Pronk JT, Dickinson JR (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 74:2259–2266.
- [165] Derrick S, Large PJ (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Microbiology*, 139:2783–2792.
- [166] Schoondermark-Stolk SA, Jansen M, Veurink JH, Verkleij AJ, Verrips CT, Euverink G-JW, et al. (2006). Rapid identification of target genes for 3-methyl-1-butanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70:237–246.
- [167] Schieberle P (1996). Intense aroma compounds: Useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Intense Aroma Compd Useful Tools Monit Infl Process Storage Bread Aroma*, 18:237–244.

- [168] Hofmann T, Schieberle P (2000). Formation of Aroma-Active Strecker-Aldehydes by a Direct Oxidative Degradation of Amadori Compounds. *J Agric Food Chem*, 48:4301–4305.
- [169] Boudaoud S, Sicard D, Suc L, Conéjéro G, Segond D, Aouf C (2021). Ferulic acid content variation from wheat to bread. *Food Sci Nutr*. doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.2171>.
- [170] Shima J, Takagi H (2009). Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol Appl Biochem*, 53:155–164.

Annexe B

Questionnaire envoyé aux boulangers
pour les tests de stabilité de levain

Questionnaire sur l'évolution des pratiques en boulangerie

Merci de fournir ces quelques informations :

- Variété(s) de froment utilisée(s) pour les rafraîchis :
pour la panification :
- Farine d'autre espèce utilisée dans les rafraîchis (seigle, ...) :
- Type de moulin utilisé :
- Âge du levain :
- Utilisation de levure commerciale pour le pain :
pour d'autres produits :
- Origine du chef (pâte ou levain tout point) :
- Durée totale de fermentation :
- Quantité de pain (kg) produite par semaine, en moyenne :

Depuis la dernière analyse de votre levain en 2015 :

- Avez-vous changé la composition de la farine de vos rafraîchis (variété(s) de céréales, espèce, ajoutez-vous du son, etc.) ?
Si oui, précisez : quelles variétés ou espèces utilisez-vous maintenant ?
- Avez-vous commencé ou arrêté de produire votre blé vous-même ?
- Avez-vous changé de moulin ?
Si oui, précisez : quel type de moulin ?
- Avez-vous initié un nouveau levain ?
- Indiquez les changements importants qui seraient survenus dans votre conduite des levains. Par exemple : changement de température de conservation du levain, origine du chef (de la pâte ou du levain tout point), etc.

Annexe C

Questionnaires du projet "Gluten, Mythe ou Réalité ?"



Guide d'Entretien

« Projet GLUTEN » / Cet entretien a pour objectif de décrire et votre procédé, équipements associés et formulation de votre produit et pour mieux vos difficultés, vos contraintes éventuelles et vos besoins.

| Structure | Personne contact |
|-----------------------|------------------|
| Nom : | Nom, prénom : |
| Statut : | Téléphone : |
| Nombre d'employés : - | adresse email : |
| Adresse : | |

Transformation (décrire): « Producteur Blé dur / tendre » (ajouté diagrammes du procédé)

Pouvez-vous me décrire les grandes étapes nécessaires à cette activité de transformation, depuis la production/l'achat des mp jusqu'à la commercialisation du produit fini ? Que faites-vous, pourquoi et avec qui ?

Schéma de temps dans 1 journée de panification :

Transformation panification (par étapes) :

1. Levain :

- ✓ *Formation* : Comment faites-vous votre levain, dans quels conditions, proportions des ingrédients, etc. ?

2. Pétrissage :

- ✓ *Frasage* : Qu'est-ce que vous mélangez dans cette étape ? Combien d'eau ajoutez-vous par kg de farine ?
- ✓ *Autolyse* : Faites-vous ou pas ? Si oui, temps utilisés ?
- ✓ *Pétrissage* :
- ✓



Recensement des informations du procédé du blé tendre et blé dur



3. Pointage :

- ✓ *Pointage en mase* : Temps utilisés ?, Fermentation utilisé, en cuve ou pas ?
- ✓ *Pesage/division* : Poids des pâtons ? Combien ? Temps ?
- ✓ *Boulage* : Faite-vous ? ou avez-vous une autre étape qui la remplace ? Temps
- ✓ *Détente* : Combien de temps laissez-vous reposer la pâte ?

4. Apprêt :

- ✓ *Façonnage* : Combien de temps prenez- vous ?, Température de la pâte dans ce moment ? Manuel ou automatique ? Equipement ?
- ✓ *Apprêt* : Temps d'apprêt ? Conditions ?

5. Cuisson :

- ✓ *Enfournement* : Température et temps de cuisson ? Utilisez-vous vapeur d'eau pour le faire ?
- Avez-vous des différences entre les variétés de farines pour faire votre protocole ?
- Quel quantités de matière première avez-vous besoin pour votre procédé ?
- Pourquoi avez-vous fait le choix de ce type de protocole ?
- Combien de kilos de pâte de pain faites-vous par semaine ?
- Dans quel état sont vos principaux équipements (neufs, matures, anciens) ?
- Pouvez-vous caractériser votre production par rapport à la filière du blé (soit industriel, semi-industrielle, artisanale, fermière)
- Quelles températures de pâte et de bas gérez-vous ?
- Comment faites-vous la préparation du levain pour la journée de pétrissage, dans quelles conditions?

Besoins transfo:

- Quels moyens concrets (*ex : équipement, main d'œuvre*) sont nécessaires pour réaliser la transformation ?, Est-ce que vous êtes en manque de certains produits?
- Avez-vous tous les équipements nécessaires en bon état ?

Moinet, Kristel
De Martino, Mauro



Recensement des informations du procédé du blé tendre et blé dur



- Y-a-t-il des étapes qui nécessiteraient selon vous d'être améliorées ?
- Quels sont vos problèmes, vos contraintes, vos besoins par rapport à cette façon de faire ?
- Avez-vous changé quelque étape de votre procédé dernièrement ? Pourquoi ?
- Quels sont vos objectifs en ce qui concerne l'amélioration de votre procédé ?

Approvisionnement ou autoproduction de matière première :

- Quels sont vos critères de choix de ces mp ? Quelles sont leurs caractéristiques spécifiques ? (*Propriétés technologiques, environnementales, nutritionnelles, Proximité, etc.*)
- Comment sont stockées ces mp avant transformation ? (*Précisez le lieu et température de conservation de votre produit*)
- Avez-vous rencontré des difficultés liées au stockage des grains ?
- Comment est-ce que vous faites le classement ? Détection contaminations ? (échantillonnage)
- Si vous êtes producteurs, votre culture est conduite en agriculture biologique, agriculture raisonnée ?
- Vous cultivez des variétés anciennes ou nouvelles ? Pourquoi ce choix ?
- D'où viennent les ingrédients complémentaires ? (levain, sucre, sel, etc.)
- Où vous procurez-vous du blé ?

Qualité alimentaire / durabilité :

- Quels critères de qualité/durabilité du produit sont visés/atteints par vous ? et avez-vous une façon de le savoir ? « bien formulé ? »
- Quels sont les plus-values, selon vous, de cette façon de faire? (du point de vue des critères du développement durable, de l'intérêt nutritionnel, etc.)
- Votre façon de faire est-elle originale, différente de ce que font les autres ? si oui, en quoi ?

Moinet, Kristel
De Martino, Mauro



Recensement des informations du procédé du blé tendre et blé dur



- Connaissez-vous quelle est la proportion (en %) des éléments dans vos produits ?
 - Etes-vous équipé pour faire des analyses du blé ? (si oui, lesquels ?)
 - Quels sont vos critères de qualité alimentaire et bonne pratiques d'hygiène prédéterminés avant de commercialiser votre produit?
-

Conditionnement/stockage (post prod)

- Comment sont stockés vos produits ? (*traçabilité, lieu, température*)
 - Paramètres final du produit (humidité, durée de vie, date de péremption, etc.)
-

Commercialisation:

- Les produits sont vendus sur quel point de vente ? (Opportunités; marché local, demande des consommateurs ?)
- De quelle manière commercialisez-vous vos produits ? (Frais ou sec)
- Pouvez-vous me dire la gamme de prix que vous proposez ?

Réseau et consommateurs :

- Quels sont vos liens avec les autres acteurs de la filière ?
- Est-ce que d'autres personnes travaillent comme vous, dans votre région ?
- Pourquoi croyez-vous que les clients achètent vos produits?

Démarche, innovation :

- Quel est l'aspect original et différent que différence votre produit de les autres ? (matière première, recette)
- Pourquoi vous faites votre procédé comme ça et pas autrement ? (*justifier par rapport à des autres procédés connus (expérience ?)*)
- Est-ce que votre procédé est facilement reproductible ? A quelles conditions ? (est-ce que c'est compliqué, coûteux, etc.)

Autres Infos sur les pratiques boulangères

| Composition | |
|--|-----------|
| Ajout de petit son | OUI / NON |
| Origine eau | |
| Origine farine | |
| Variété(s) de céréales dans la pâte | |
| Levures | |
| Utilisation de levures pour panification | OUI / NON |
| Utilisation de levures dans le fournil | OUI / NON |
| Rafraichis | |
| Taux d'hydratation rafraichi | |
| Température rafraichi | |
| Nombre de rafraichis par semaine | |
| Nombre de rafraichis avant utilisation | |
| Nombre de rafraichis entre panif | |
| Ancienneté/Conservation | |
| Age du levain | |
| Origine/Composition levain chef | |
| Température de conservation du levain chef | |
| Boulangier depuis | |

Commentaires :

Annexe D

Retour aux éleveurs de l'expérimentation
sur la fréquence de repiquage du Gwell

Retour des résultats de l'expérimentation sur l'effet de la fréquence de repiquage du Gwell

Lucas von Gastrow, Yu-Xiao Xu, Marie-Noëlle Madec, Florence Valence,
Ferme du Buis-Sonnant, GAEC Lait-Au-Champ, Ferme du Rhun



Table des matières

| | |
|---|-----------|
| 1. Introduction | 3 |
| 1.1. Pourquoi cette étude ?..... | 3 |
| 1.2. Résultats préalablement obtenus..... | 4 |
| 2. Expérience réalisée | 5 |
| 3. Résultats | 7 |
| 3.1. Résultats des contrôles maintenus à 30°C et à 4°C | 7 |
| • La communauté microbienne des Gwell repiqués et maintenus à 30°C remplacée par des bacilles .. | 7 |
| • La sous-espèce <i>cremoris</i> domine dans les Gwell repiqués et maintenus à 4°C | 7 |
| 3.2. Les Gwell repiqués trois fois par semaine n'ont pas été perdus | 7 |
| 3.3. Proportion des différentes espèces en fonction de la fréquence de repiquage | 7 |
| • Les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent moins de moisissures | 7 |
| • Les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent plus de <i>cremoris</i> | 9 |
| 3.4. Les Gwell repiqués trois fois par semaine acidifient plus rapidement le lait | 10 |
| 3.5. Évolution des Gwell pendant les étapes de fermentation et de conservation | 11 |
| • La sous-espèce <i>cremoris</i> est favorisée par l'étape de conservation, <i>lactis</i> par l'étape de fermentation | 11 |
| • Post-acidification des Gwell lors de la conservation | 12 |
| • <i>cremoris</i> présente moins de mortalité que <i>lactis</i> lors de la conservation sur le long terme | 12 |
| 3.6. On détecte <i>Streptococcus thermophilus</i> en grandes quantités dans les 3 Gwell..... | 13 |
| 3.7. Sauvetage en direct live d'un Gwell en perdition | 13 |
| 4. Synthèse et discussion | 14 |
| 5. Suite des expériences | 14 |

1. Introduction

1.1. Pourquoi cette étude ?

L'idée de tester l'effet de la fréquence de repiquage sur l'évolution du Gwell part d'une observation qui semblait assez consensuelle au sein du groupe : des repiquages trop fréquents du Gwell le font dériver et mènent à sa perte. Le ferment n'est alors plus en mesure d'acidifier correctement le lait. Il faudrait laisser le Gwell mûrir suffisamment de temps au frais avant de le réutiliser, typiquement 5 à 7 jours.

D'un point de vue scientifique cette hypothèse est intéressante. En effet de nombreuses études portent sur la dynamique d'un écosystème en réponse à des variations régulières d'environnement, en étudiant par exemple l'évolution des microorganismes du sol en fonction des cycles saisonniers, ou encore celle du microbiote intestinal en fonction de la fréquence des repas. Le Gwell offre un excellent modèle pour étudier ces évolutions. Les repiquages correspondent en effet à des variations très marquées et contrôlées d'environnement, avec un milieu riche en nutriments, à pH neutre et à 30°C au moment où on mélange le Gwell avec le lait et pendant la fermentation, puis un milieu pauvre en nutriments, acide et à 4°C pendant la conservation. On considère généralement que des variations régulières d'environnement permettent à plusieurs espèces de cohabiter. Dans un milieu restant extrêmement stable au cours du temps, une espèce pourra s'installer, s'adapter, et finira par être plus compétitive que n'importe quel autre organisme tentant de s'y développer. Cette situation est représentée sur la figure suivante.

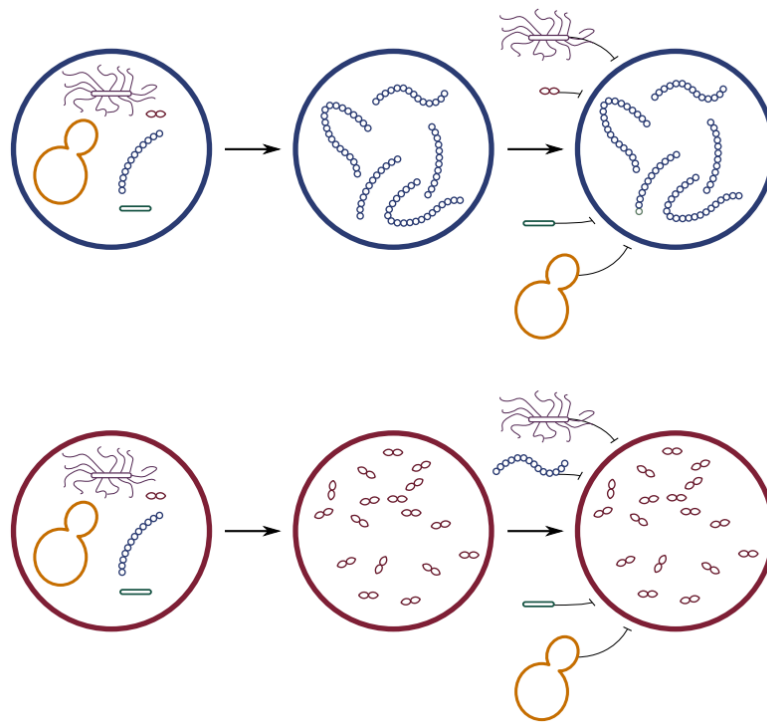


Fig. 1 : Schéma de la sélection d'espèces microbiennes dans un environnement stable. Sur la première ligne, les coques en chaînes (en bleu) sont plus compétitives que les autres dans le milieu. Elles finissent par les supplanter, et les autres espèces ne peuvent plus coloniser le milieu. Sur la deuxième ligne, on a un milieu différent, favorisant cette fois les diplocoques allongés (en rouge).

Si cependant les conditions du milieu varient régulièrement, il sera plus difficile voire impossible pour une espèce d'être plus compétitive que n'importe quel autre organisme dans toutes les conditions. On observe alors généralement un phénomène de spécialisation, où plusieurs espèces cohabitent en étant chacune spécialisée pour une des conditions. Cette situation est schématisée ci-après.

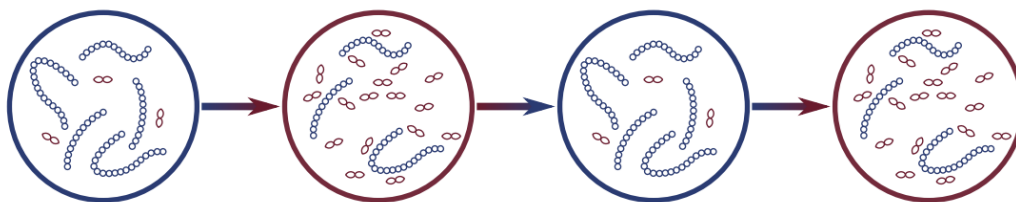


Fig. 2 : Schéma de la sélection d'espèces dans un environnement changeant. Le milieu change cette fois d'un milieu favorisant successivement les coques en chaînes (en bleu) puis les diplocoques allongés (en rouge). Si les variations d'environnement sont suffisamment rapides, aucune espèce ne prend totalement le dessus sur l'autre et les deux se maintiennent dans le temps.

On comprend alors que la fréquence des changements d'environnement est un paramètre important pour l'évolution de la composition de l'écosystème. Si l'environnement favorisait trop longtemps les bactéries bleues, on reviendrait au cas de la figure 1 et on n'aurait plus qu'une espèce dans l'écosystème. Avec une fréquence adaptée de changement d'environnement, les deux espèces se maintiennent en équilibre dynamique. Dans le cas du Gwell, on s'attend donc à ce que certaines espèces soient favorisées par les conditions de fermentation et que d'autres soient favorisées par les conditions de conservation. L'alternance des cycles de fermentation/conservation permettrait à toutes de coexister, et la durée de la conservation déterminerait la composition globale de l'écosystème en favorisant plus ou moins les espèces adaptées à la conservation. Une durée de conservation trop courte ou trop longue favoriserait trop certaines espèces au détriment d'autres et pourrait mener à la perte du Gwell. Afin de préciser cette hypothèse, revenons sur les résultats obtenus précédemment concernant la description de l'écosystème du Gwell.

1.2. Résultats préalablement obtenus

- On détecte systématiquement dans le Gwell les bactéries *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* sp. *lactis* biovar *diacetylactis* (on les appellera respectivement *cremoris* et *lactis* par la suite), ainsi que la moisissure *Geotrichum candidum*.
- Le Gwell contient parfois des levures ainsi que *Streptococcus thermophilus*.
- Les deux sous-espèces *cremoris* et *lactis* ont des caractéristiques différentes :
 - *cremoris* fait généralement de longues chaînes de cellules rondes (coques). Elle est capable d'acidifier rapidement le milieu.
 - *lactis* est sous forme de coques seuls ou associés deux par deux. Elle acidifie lentement le milieu, et produit de nombreux composés importants pour les arômes du Gwell (notamment le diacétyle).

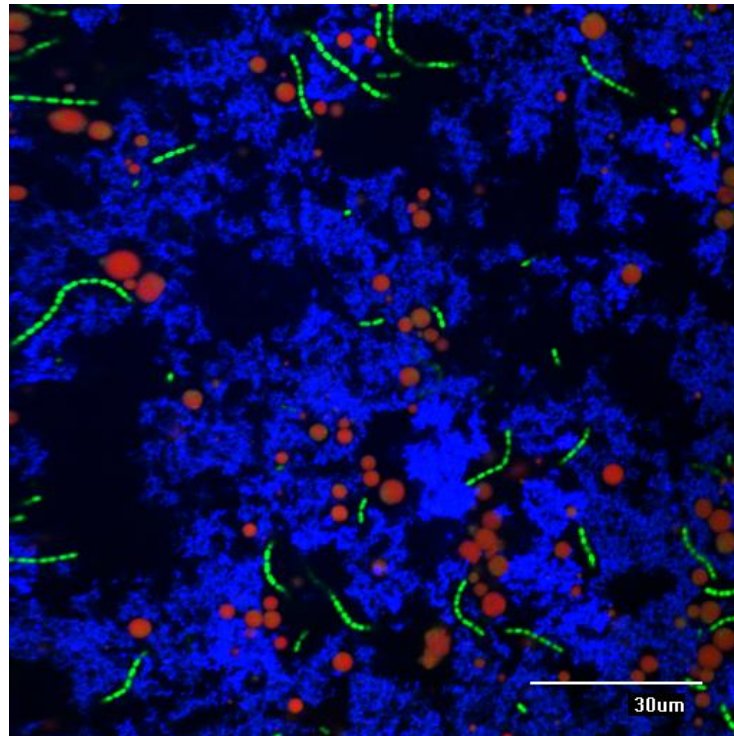


Fig 3 : Photographie d'un Gwell observé au microscope à fluorescence. Le réseau de caséines est coloré en bleu, les globules gras en rouge, et les bactéries en vert. Les chaînes de cellules correspondent généralement à *cremoris* tandis que les cellules seules ou associées deux par deux sont la sous-espèce *lactis*. On n'observe pas sur ce champ de *Geotrichum candidum*, présent en beaucoup plus faible quantité que les bactéries.

2. Expérience réalisée

Afin d'observer l'évolution de la communauté microbienne du Gwell en fonction de la fréquence de repiquage, différents lots de Gwell ont été préparés. Un lot a été repiqué trois fois par semaine, l'autre une fois par semaine. Dans chaque lot, 3 Gwell ont été préparés en parallèle. Ces 3 réplicats d'une même condition permettent de mesurer la variabilité de l'expérience et des mesures. On peut ainsi s'assurer que les différences qu'on observe ne sont pas dues au hasard ou à des biais dans les mesures de pH ou les dénombrements de microorganismes. Les 2 lots de 3 Gwell ont été repiqués pendant 4 semaines, et un prélèvement pour dénombrement microbiologique avant et après fermentation et un suivi d'acidification pendant la fermentation ont été réalisés chaque semaine sur les 6 échantillons.

Par ailleurs, 3 autres lots de Gwell ont été maintenus et analysés au laboratoire. Un lot a été conservé à 4°C et les microorganismes ont été dénombrés après 1, 2, 3 et 4 semaines de conservation afin d'observer l'évolution de la communauté microbienne après de longues périodes de conservation. Deux autres lots ont été repiqués chaque semaine, mais conservés tout le long de l'expérience à 30°C dans un cas et à 4°C dans l'autre. Cet essai peut sembler absurde du point de vue de la production, mais permet de vérifier formellement que c'est l'alternance d'environnements qui permet de maintenir en équilibre dynamique la communauté microbienne du Gwell. L'ensemble de ces manipulations a été réalisé dans 3 fermes différentes : à la ferme du Buis Sonnant avec Marion Henry, à la ferme du Rhun avec Elise Laudren et au GAEC de l'île d'Arz avec Violaine Hautchamp. L'ensemble du plan d'expérience est schématisé sur la figure suivante.

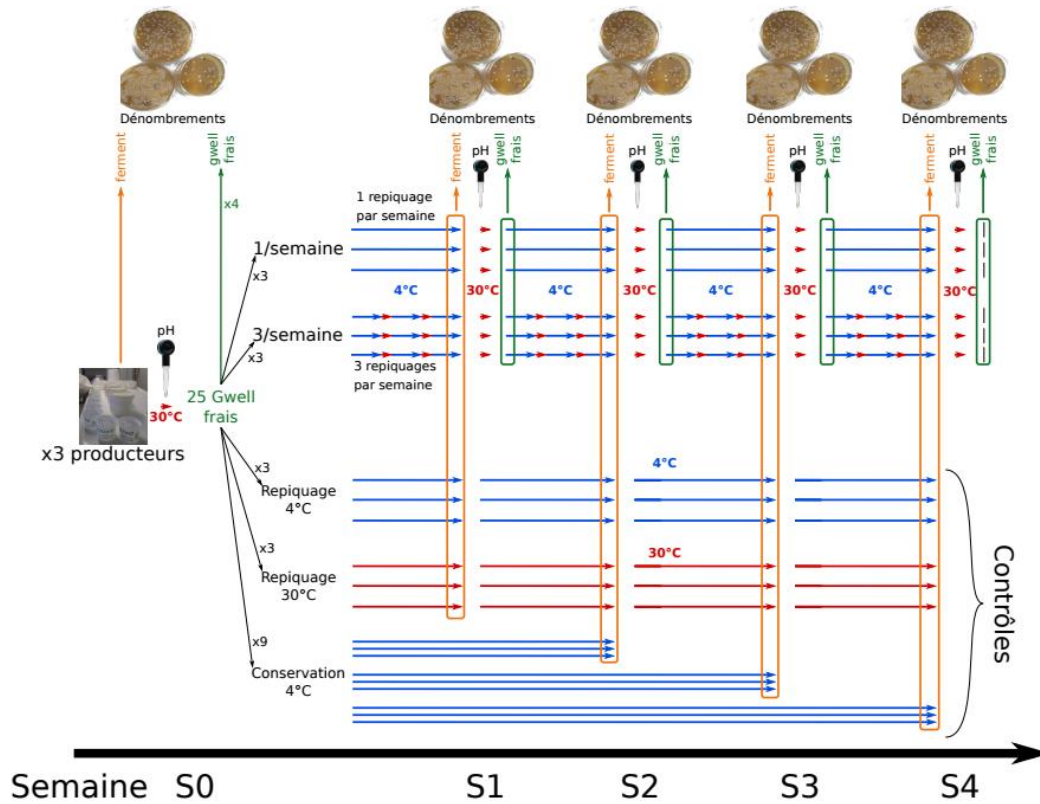


Fig. 4 : Schéma de l'expérimentation. A partir du ferment de départ, une première fabrication permet de préparer 25 pots de Gwell. Ils sont répartis en différents lots de 3 pots, voués à être repiqués 1 fois ou 3 fois par semaine, repiqués 1 fois par semaine à 4°C, repiqués 1 fois par semaine à 30°C, ou conservés à 4°C et analysés après 2, 3 ou 4 semaines. Les 4 pots restants sont utilisés pour l'analyse microbiologique. Les échantillons prélevés sont encadrés, les ferments sont colorés en orange et les Gwell frais produits le jour même sont colorés en vert. Le pH a été suivi dans 6 pots à chaque fabrication.



Les essais ont été réalisés à la ferme :
ici le laboratoire de transformation
d'un élevage partenaire de l'essai.

3. Résultats

3.1. Résultats des contrôles maintenus à 30°C et à 4°C

- **La communauté microbienne des Gwell repiqués et maintenus à 30°C est remplacée par des bacilles**

Pour les Gwell maintenus à 30°C, on observe dès une semaine de conservation un remplacement total de la communauté microbienne par des bacilles. Il s'agit probablement de bacilles déjà présents en très faibles quantités dans les Gwell, qui se retrouvent sélectionnés par ce traitement. On n'observe ensuite plus de changement important de la composition de la communauté microbienne. Cela correspond au cas de figure présenté en figure 1 dans l'introduction.

- **La sous-espèce *cremoris* domine dans les Gwell repiqués et maintenus à 4°C**

Pour les Gwell maintenus à 4°C, seuls les échantillons de Marion Henry sont analysables à cause d'une panne de chambre froide ayant affecté les échantillons de Violaine Hautchamp et Elise Laudren. On observe tout de même que seule *cremoris* se maintient dans ces conditions, alors que *lactis* n'est plus détectée dès 2 semaines de repiquage à 4°C. Les résultats concernant les Gwell conservés à 4°C sans repiquage et analysés chaque semaine sont présentés en figure 10. On obtient un résultat similaire : *cremoris* se maintient mieux à 4°C que *lactis*. Cette dernière ne disparaît cependant pas totalement, même après 4 semaines de conservation à 4°C.

3.2. Les Gwell repiqués trois fois par semaine n'ont pas été perdus

La première chose à constater est que les Gwell repiqués 3 fois par semaine n'ont pas été perdus au cours de l'expérience, contrairement à ce qui pouvait être attendu étant donné les observations en fromagerie.

3.3. Proportion des différentes espèces en fonction de la fréquence de repiquage

- **Les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent moins de moisissures**

Les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent généralement moins de moisissures. On y dénombre en moyenne 5 fois moins de moisissures, et jusqu'à 15 fois moins selon les échantillons. C'est cependant le contraire pour le Gwell d'Elise Laudren, où les Gwell repiqués 3 fois par semaine ont en moyenne 2 fois plus de moisissures que ceux repiqués 1 fois par semaine. Les moisissures d'Elise Laudren avaient une morphologie différente de celles de Marion Henry et Violaine Hautchamp, il est possible que cet effet dépende de la souche de moisissures.

Les levures sont généralement présentes en très faibles quantités. On n'en détecte quasiment pas dans les Gwell de Marion Henry, et une faible quantité, qui diminue jusqu'à devenir nulle dans les Gwell d'Elise Laudren. Il s'agit probablement de contaminations par des levures qui n'arrivent pas à coloniser le Gwell et finissent par s'éteindre. On détecte entre 100 et 1000 levures par mL dans les Gwell de Violaine Hautchamp, ces nombres restent stables au long de l'expérience.



Les analyses microbiologiques et le suivi des essais ont été assurés par Lucas Von Gastrow et Yu-Xiao Xu, de l'INRAE

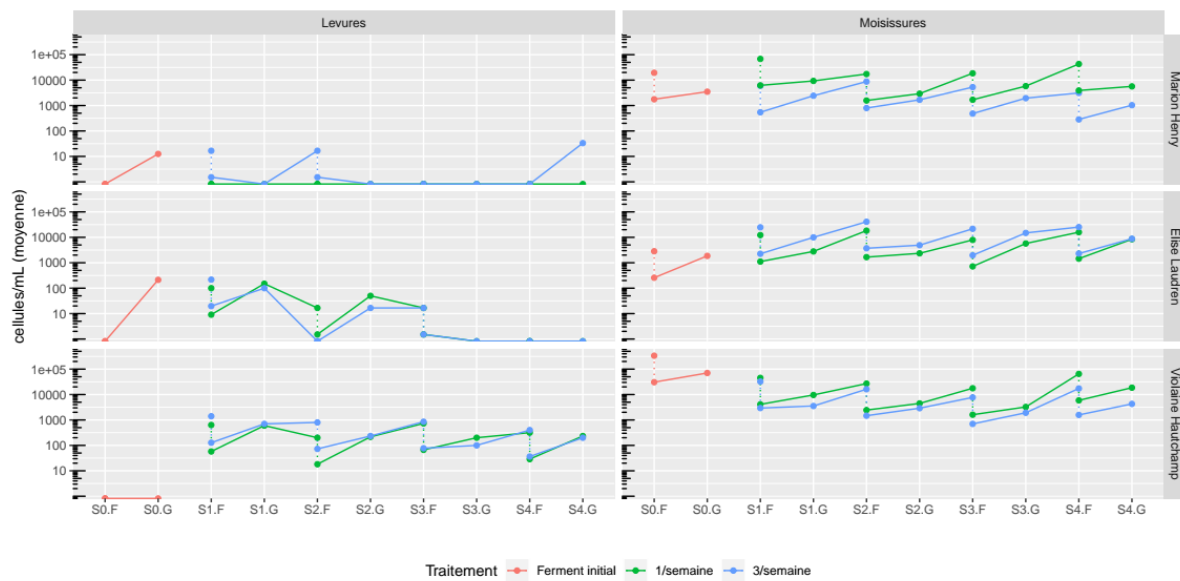


Fig. 5 : Evolution de la quantité de levures et moisissures dans les Gwell. On a en ligne les résultats pour chacun des éleveurs. L'axe horizontal représente le temps, il est subdivisé par semaine et type d'échantillon : ferment (noté F) ou Gwell frais (noté G). Le tiret S2.F correspond ainsi au ferment utilisé à la deuxième semaine d'expérimentation. L'axe vertical donne la quantité de cellules dans le Gwell. La valeur 1e+05 est un format d'écriture scientifique des nombres, et correspond à 10⁵, soit 100 000 cellules/mL. Les lignes verticales en pointillées représentent la dilution des Gwell dans le lait au moment de l'ensemencement. Les couleurs correspondent à la fréquence de repiquage. Les valeurs représentées sont la moyenne des 3 réplicats.

- **Les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent plus de *cremoris***

On voit un effet de la fréquence de repiquage sur la proportion des différents microorganismes du Gwell. Notamment, les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent plus de *cremoris*. D'une manière générale, cette différence s'observe dès la première semaine d'analyse.

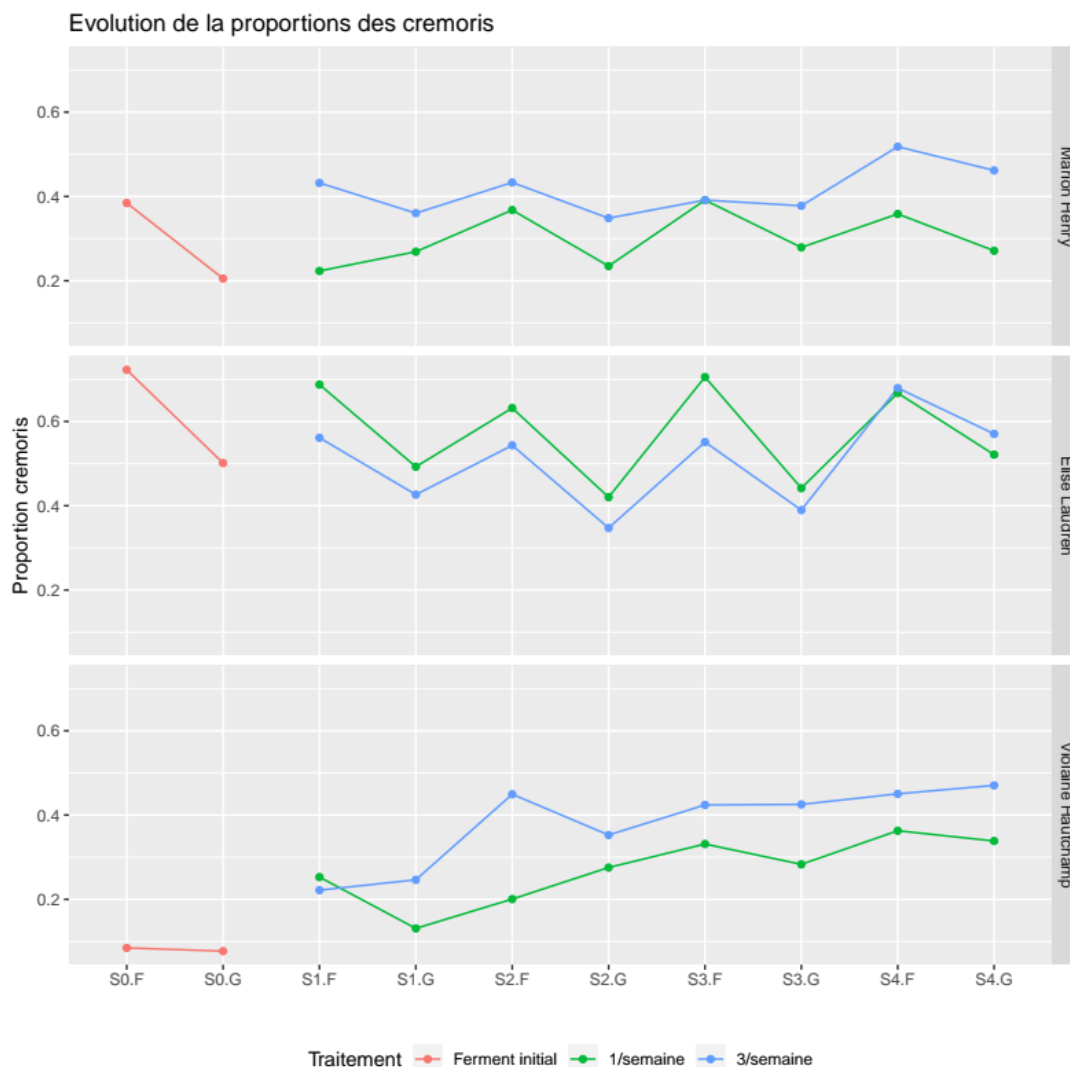


Fig 6 : Evolution de la proportion de cremoris. On a en ligne les résultats pour chacun des éleveurs. L'axe horizontal représente le temps, il est subdivisé par semaine et type d'échantillon : ferment (noté F) ou Gwell frais (noté G). Le tiret S2.F correspond ainsi au ferment utilisé à la deuxième semaine d'expérimentation. L'axe vertical donne la proportion de cremoris dans le Gwell. Les couleurs correspondent à la fréquence de repiquage. Les valeurs représentées sont la moyenne des 3 réplicats.

Les lignes bleues sont généralement au-dessus des lignes vertes, c'est à dire que les Gwell repiqués 3 fois par semaine contiennent plus de *cremoris* que ceux repiqués 1 fois par semaine. La seule exception concerne le Gwell d'Elise Laudren en début d'expérience, mais la quantité de *cremoris* augmente dans ceux repiqués 3 fois par semaine et finit par y devenir supérieure à celle dans les Gwell repiqués 1 fois par semaine.

3.4. Les Gwell repiqués trois fois par semaine acidifient plus rapidement le lait

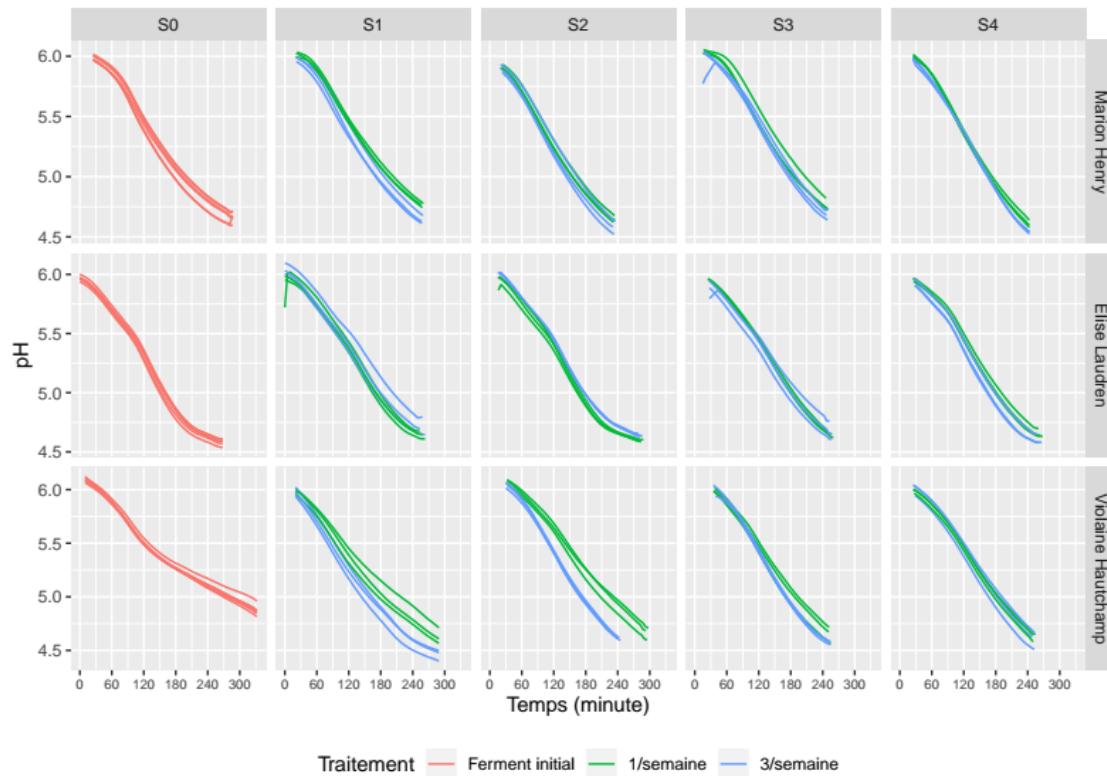


Fig. 7 : Courbes d'acidification des Gwell. Chaque petit graphe correspond aux courbes d'acidification des Gwell à une semaine donnée chez un éleveur donné. On observe que les courbes bleues sont en dessous des courbes vertes dans quasiment tous les cas, c'est à dire que les Gwell repiqués 3 fois par semaine acidifient plus rapidement que ceux repiqués une fois par semaine : le pH y baisse plus vite.

On observe que les Gwell acidifient d'autant plus vite que leur quantité de *cremoris* est grande. Ceci n'est pas étonnant sachant que *cremoris* acidifie le milieu plus rapidement que *lactis*. Notamment, on voit que pour les Gwell d'Elise Laudren, les Gwell repiqués 1 fois par semaine acidifient au départ plus rapidement que ceux repiqués 3 fois par semaine, et que cette tendance s'inverse à la fin de l'expérience. Ceci correspond exactement à l'évolution de la proportion de *cremoris* dans ces Gwell.

3.5. Évolution des Gwell pendant les étapes de fermentation et de conservation

- La sous-espèce *cremoris* est favorisée par l'étape de conservation, *lactis* par l'étape de fermentation

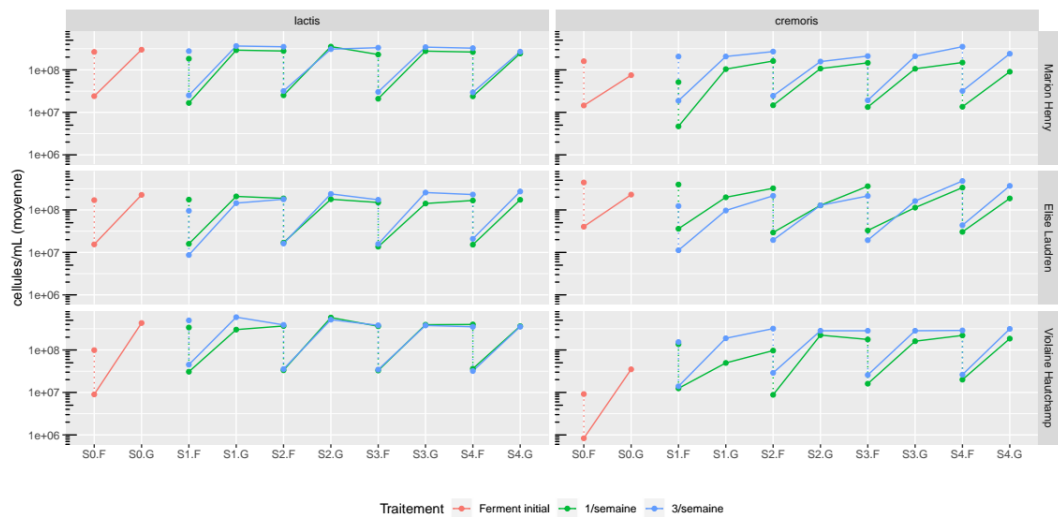
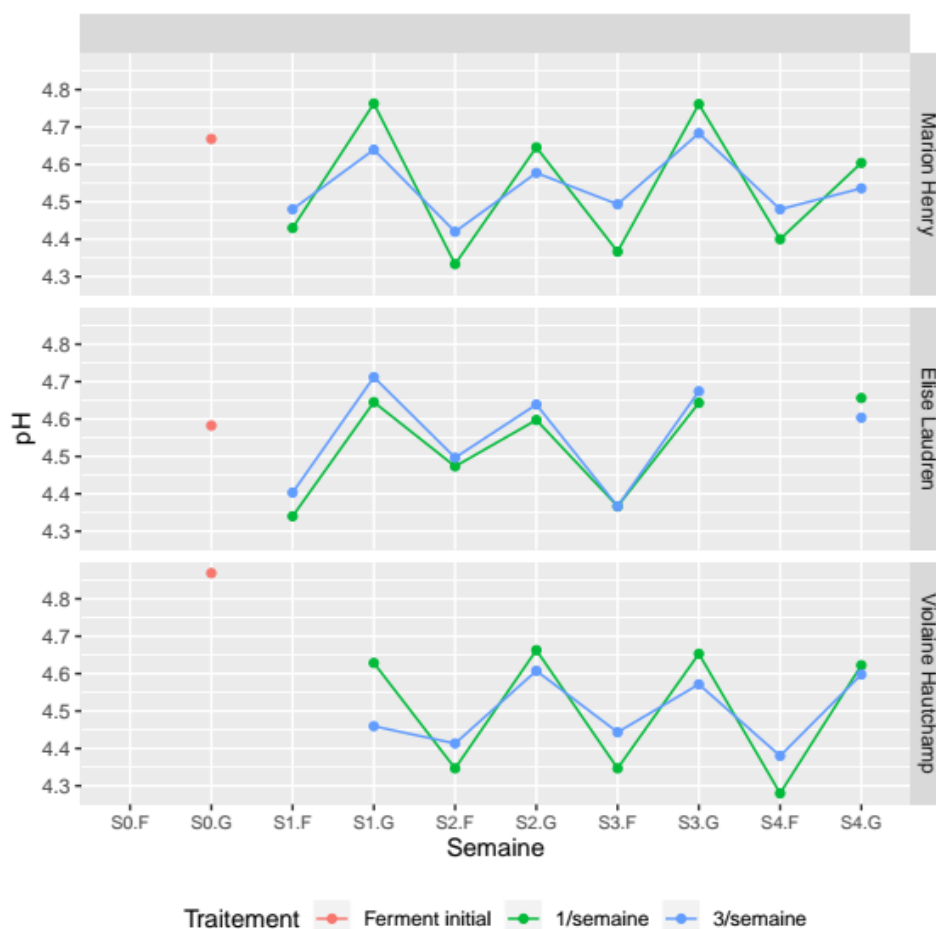


Fig. 8 : Evolution du nombre de *cremoris* et *lactis* dans les Gwell. Comme pour le graphique 6, on a en ligne les résultats pour chacun des élevés. L'axe horizontal représente le temps, il est subdivisé par semaine et type d'échantillon : ferment (noté F) ou Gwell frais (noté G). L'axe vertical donne le nombre de cellules par millilitre de Gwell, exprimé en puissances de 10. 1e+08 correspond à 10⁸, c'est à dire 100 million de cellules par mL. Les lignes verticales en pointillées représentent la dilution des Gwell dans le lait au moment de l'ensemencement. Les couleurs correspondent à la fréquence de repiquage. Les valeurs représentées sont la moyenne des 3 réplicats.

Les deux sous-espèces de *Lactococcus lactis* ont un développement différent pendant la fermentation et pendant la conservation. La sous-espèce *lactis* augmente plus que *cremoris* lors de la fermentation. Elle reste ensuite stable voire diminue pendant la conservation à 4°C, entre Gwell frais et ferment de la semaine suivante. *cremoris* quant à elle n'atteint pas son maximum à la fin de la fermentation, elle continue de se développer lors de la conservation.

- **Post-acidification des Gwell lors de la conservation**

Les Gwell continuent de baisser en pH pendant la conservation au froid. Ils sont sortis de l'étuve à un pH entre 4.6 et 4.8, et atteignent un pH entre 4.3 et 4.45 après conservation. On ne peut pas vraiment comparer la post-acidification des Gwell repiqués 1 et 3 fois par semaine car la durée de conservation au froid n'est pas la même. On observe tout de même que les Gwell repiqués 1 fois par semaine sortent de l'étuve à un pH plus élevé (de 0.1 en moyenne) que ceux repiqués 3 fois par semaine, ce qui est cohérent avec les observations des courbes d'acidification. Encore une fois, le Gwell d'Elise Laudren est différent des autres. L'évolution du pH est quasiment



la même quelle que soit la fréquence de repiquage.

Fig. 9 : Evolution du pH au cours de l'expérimentation dans les ferments et les Gwell frais. La disposition du graphique est la même que dans les précédents, l'axe vertical indique cette fois le pH, chaque point est la moyenne des 3 réplicats. Certaines mesures n'ont pas été réalisées, le graphique doit être complété en mesurant le pH des échantillons congelés.

- **cremoris présente moins de mortalité que lactis lors de la conservation sur le long terme**

Les Gwell analysés après 2 à 4 semaines de conservation permettent de connaître le développement des différents organismes lors d'une conservation sur le long terme. Les échantillons de Violaine Hautchamp et d'Elise Laudren ne sont malheureusement pas exploitables à cause d'une panne de chambre froide. Les échantillons de Marion Henry donnent tout de même une indication. On observe que la quantité de cellules

augmente jusqu'à 2 semaines de conservation, de manière beaucoup plus prononcée pour les *cremoris* que pour les *lactis*. La quantité de cellules diminue ensuite, plus rapidement pour les *lactis* que pour les *cremoris*.

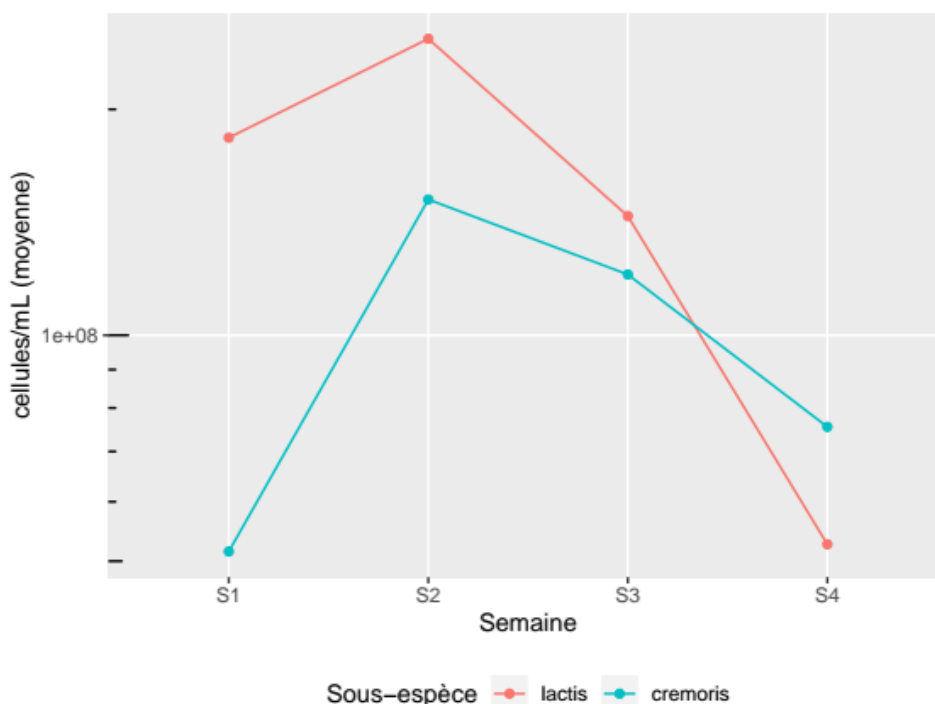


Fig. 10 : Evolution du nombre de lactis et cremoris en fonction de la durée de conservation. L'axe vertical indique le nombre de cellules par millilitre de Gwell, l'axe horizontal le nombre de semaines de conservation.

3.6. On détecte *Streptococcus thermophilus* en grandes quantités dans les 3 Gwell

Il n'était pas prévu de dénombrer les *Streptococcus thermophilus*, mais elles ont pu être détectées sur les milieux servant à dénombrer les lactocoques. Les mesures n'étaient cependant pas très fiables, car les colonies étaient très petites et difficile à observer et à compter. On peut tout de même donner une estimation de leur nombre, autour de 10^8 (100 millions) cellules/mL, soit le même ordre de grandeur que pour les lactocoques. Ce résultat est étonnant, les *Streptococcus thermophilus* ayant été détectés seulement en très faibles quantités dans les études précédentes. Cette espèce est généralement thermophile (d'où son nom), on ne s'attend donc pas à la trouver en grandes quantités dans un lait fermenté à technologie mésophile. Il pourrait s'agir de souches ayant évolué et maintenant adaptées à ces conditions.

3.7. Sauvetage en direct live d'un Gwell en perdition

Le ferment de départ utilisé chez Violaine Hautchamp présente un très faible nombre de *cremoris* : 10^7 /mL dans le ferment, soit 10^6 /mL une fois dilué dans le lait (voir figure 8, colonne "cremoris", ligne "Violaine Hautchamp", les points rouges à S0.F). Ce ferment était aussi celui qui acidifiait le plus lentement, on arrive à un pH de 4.85 après 5h30 de fermentation, contre 4.7 après 4h environ pour les autres. La quantité de *cremoris* augmente dans les Gwell de Violaine Hautchamp au cours de l'expérience, et on revient à des taux et une acidification normale après quelques repiquages. Le Gwell revient à la normale plus rapidement pour les Gwell repiqués 3 fois par semaine.

4. Synthèse et discussion

Les Gwell repiqués 3 fois par semaine n'ont pas été perdus. On observe cependant des différences entre les deux modalités de repiquage testées. Les Gwell repiqués 3 fois par semaine acidifient plus rapidement et contiennent plus de *cremoris* (des tests statistiques non présentés ici le démontrent). Il n'est pas étonnant que ces deux caractéristiques soient liées étant donné qu'on sait que *cremoris* est la principale responsable de l'acidification dans le Gwell. Il n'y a pas de différence sensible du nombre de *lactis* entre les deux modalités de repiquage.

On observe également que les sous-espèces *cremoris* se développent différemment lors des passages à 30 et à 4°C : le nombre de *cremoris* augmente moins que celui de *lactis* pendant la phase de fermentation à 30°C et continue d'augmenter pendant la phase de conservation à 4°C, alors que la quantité de *lactis* reste stable voire diminue. L'évolution du nombre de chaque sous-espèce lors d'une conservation sur le long terme est cohérente avec ces observations : à partir de 3 semaines de conservation le nombre de cellules chute, et la diminution est plus importante pour les *lactis* que pour les *cremoris*. *cremoris* est donc plus adaptée que *lactis* à la conservation à 4°C mais l'est moins à l'étape de fermentation à 30°C.

Ces deux observations peuvent sembler contradictoires :

- *cremoris* est moins adaptée que *lactis* à la fermentation à 30°C
- Augmentation du nombre de *cremoris* dans les Gwell repiqués 3 fois par semaine, c'est à dire lorsque l'on augmente la fréquence des passages à 30°C

Une hypothèse pourrait expliquer ces résultats : *cremoris* pourrait être mieux adaptée que *lactis* non seulement à une conservation à 4°C, mais également aux chocs thermiques occasionnés par le passage brutal de 30°C à 4°C. Ainsi, chaque passage à 4°C après repiquage favoriserait *cremoris* au détriment de *lactis*. Une fréquence de 3 repiquages par semaine favoriserait ainsi plus *cremoris* que *lactis*.

5. Suite des expériences

Deux expérimentations sont ainsi prévues en laboratoire.

1. Identification des espèces par séquençage de l'ADN.

Il s'agit de vérifier l'identification des espèces retrouvées par culture sur les milieux sélectifs en séquençant l'ADN des bactéries et moisissures retrouvées dans le Gwell. Ceci sera notamment intéressant pour les contrôles maintenus tout le long de l'expérience à 30°C et à 4°C, où des microorganismes différents de ceux retrouvés classiquement dans le Gwell se sont développés, sans que l'on puisse formellement les identifier.

2. Résistance des souches isolées au froid et aux chocs thermiques

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle c'est la résistance aux chocs thermiques qui explique que *cremoris* se retrouve en plus grandes quantités que *lactis* dans les Gwell repiqués 3 fois par semaine, les souches isolées au début et à la fin de l'expérimentation seront soumises à des variations brutales de température, pour ensuite mesurer leur viabilité et leur taux de croissance. On s'attend à ce que *cremoris* présente moins de mortalité que *lactis* et ait un temps de latence plus court lorsque l'on les cultive à 30°C après un passage à 4°C.

Annexe E

Retour des résultats du projet Gluten

Synthèse : "La diversité des levains naturels en Occitanie"

Document issu du projet "Gluten, mythe ou réalité 2" et de la formation "Pratiques boulangères et diversité des fermentations pour du pain bio au levain naturel" qui a eu lieu le 14 juillet 2019 à Saint Martin de Londres

Rémy Amelot, Kristel Moinet, Diego Segond, Delphine Sicard, Lucas von Gastrow

23 juillet 2020



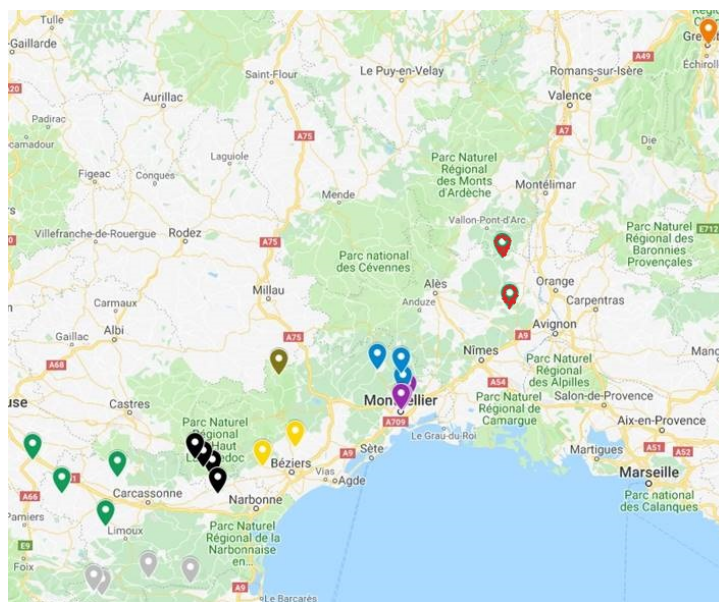
1 Préambule

Le projet Gluten : mythe ou réalité est un projet de recherche fondé sur la participation et collaboration du Biocivam de l'Aude, d'équipes INRA, ainsi que de nombreux acteurs de terrains : Agriculteurs, Transformateurs, Acteurs du conseil agricole, Chercheurs, Médecins, Consommateurs et Personnes hypersensibles au gluten non cœliaque. Ce projet vise à identifier les éventuels déterminants sociologique, génétique, agronomique et/ou technologique de l'hypersensibilité au gluten.

Dans ce cadre, l'UMR SPO de l'INRA a mené un travail visant à rassembler des connaissances sur les pratiques boulangères et la biodiversité des levains naturels dans les filières artisanale/paysanne en Occitanie pour dans la suite du projet comparer l'impact des ferments sur le contenu en gluten des pains. Plus précisément, il s'agissait :

- de caractériser la diversité des pratiques boulangères de la filière artisanale en Occitanie
- de caractériser la diversité microbiologique d'une vingtaine de levains naturels de la région Occitanie,
- de dégager ce qui serait un diagramme de panification artisanal typique, et de sélectionner quatre levains qui auraient des caractéristiques représentatives pour mettre en place des essais de panification pour comparer le contenu en gluten entre pains type « filière artisanale » au levain et pains type « filière industrielle » à la levure commerciale.

25 levains ont été prélevés chez les boulangers par Rémi Amelot et Diego Segond entre le 7 septembre et le 21 novembre 2018 dans différents lieux d'Occitanie.



Carte des collectes réalisées dans le cadre du projet. Des points de même couleur indiquent une collecte réalisée le même jour.

Vous trouverez à continuation une information théorique sur la fermentation, des données moyennes sur l'ensemble des analyses et des informations nécessaires à la compréhension des analyses individuelles de levains.

2 Introduction

2.1 Quelques définitions concernant les microorganismes du levain

Les définitions sont extraites du glossaire construit dans le cadre du projet BAKERY, bientôt disponible en ligne.

Levain :

Écosystème composé de bactéries lactiques et de levures en interaction dans un milieu de farine, d'eau et parfois de sel. Il est aussi le siège d'activités enzymatiques complexes.

- Terme générique utilisé dans différents secteurs d'activité (panification, brasserie, produits laitiers fermentés...) pour dénommer un milieu pré-fermenté servant à ensemercer une fabrication. En panification, c'est une pâte pré-fermentée pouvant être décrite comme un écosystème microbien céréalier complexe constitué de levures et de bactéries lactiques sur un milieu à base de farine et d'eau.

- Le Recueil des Usages des Pains en France, indique pour levain : "Pâte en fermentation à réaction acide, provenant au départ d'un mélange de farine et eau, sans apport volontaire de levures et perpétuée à partir de ce mélange, une fois qu'il a subi une fermentation spontanée, par des additions conduites de façon méthodique. Ces «*rafraîchissements*» successifs provoquent la multiplication et la sélection de la flore microbienne des levains". La fréquence et la mise en œuvre (température, hydratation...) des rafraîchis influent sur les caractéristiques microbiologiques du levain.

Levures :

Micro-organismes unicellulaires qui font partie des champignons. Il en existe de nombreuses espèces. Dans les levains, elles sont principalement responsables de la fermentation alcoolique qui transforme certains sucres (glucose, maltose, saccharose) en alcool tout en dégageant le CO₂, qui permet au levain puis à la pâte de lever; elles produisent aussi une diversité de composés aromatiques et un peu d'acide acétique mais pas d'acide lactique.

Bactéries lactiques :

Micro-organismes unicellulaires qui font partie des espèces de bactéries (règne des procaryotes, cellules sans noyau) et qui se caractérisent par la production d'acide lactique. Dans les levains, elles sont responsables, selon les espèces, de la fermentation dite homofermentaire (acide lactique) et hétérofermentaire (acide lactique + acide acétique + CO₂) et vont acidifier le levain. Elles sont en général présentes jusqu'à 1 milliard (10⁹) /g de levain. Elles sont 10 à 100 fois plus nombreuses que les

levures (eucaryotes, cellules avec noyau), mais leurs cellules sont aussi beaucoup plus petites (10 à 50 fois plus petites). Les bactéries lactiques se développent en absence d'oxygène, elles sont généralement anaérobies. Il existe de nombreux genres et espèces de bactéries lactiques, le principal étant le genre *Lactobacillus*. L'espèce majoritaire des bactéries lactiques du levain est *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Genre :

Les espèces sont regroupées en genre. Les espèces qui appartiennent au même genre sont plus proches génétiquement que celles qui appartiennent à des genres différents. Le genre est donné par le premier nom d'une espèce. Par exemple l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est du genre *Saccharomyces*. L'espèce de blé tendre, *Triticum aestivum*, est du genre *Triticum*.

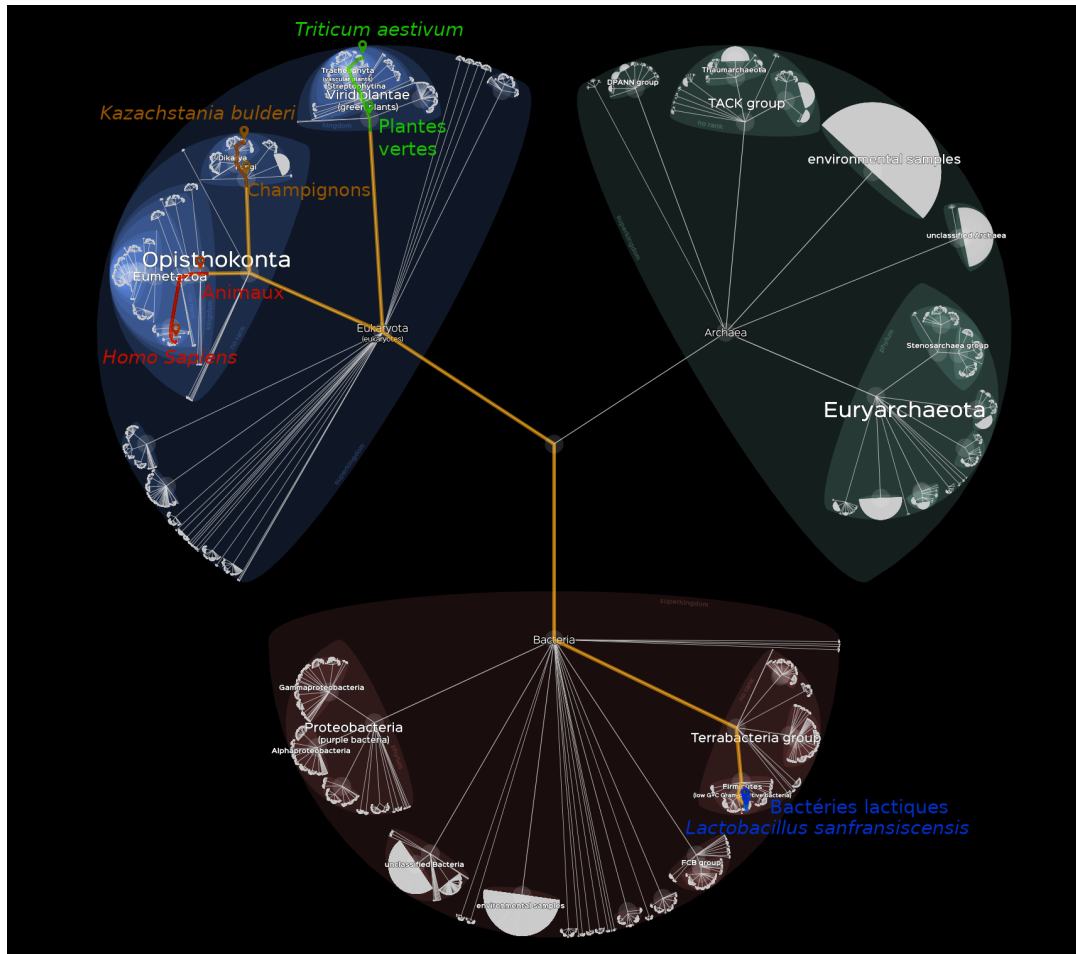
Espèce :

Chez les micro-organismes, une espèce est un ensemble d'individus liés par des liens de parenté proches : ils ont donc un génome (ADN) et des caractéristiques morphologiques et physiologiques très similaires. Chez les bactéries il n'y a pas de reproduction sexuée. Chez les levures, cela dépend des espèces. Quand il y a de la reproduction sexuée, les individus d'une même espèce sont capables de se reproduire entre eux et de donner des descendants eux même fertiles.

Souche :

Au sein d'une espèce il existe de la variabilité génétique, morphologique ou physiologique entre populations (entre souches). Une souche est une population de cellule qui vient d'une même cellule ancêtre commun par reproduction asexué (bourgeoisement pour les levures, division pour les bactéries). Une souche est donc un ensemble de cellules identiques aux mutations près. Chez les micro-organismes, une souche est en quelque sorte l'équivalent d'une "variété homogène" pour les plantes cultivées.

2.2 Positionnement dans un arbre du vivant des microorganismes retrouvés dans les levains



Arbre du vivant positionnant les bactéries lactiques et les champignons. Pour chaque groupe, une espèce est indiquée en exemple avec son nom latin. Les plantes vertes et les animaux sont également indiqués pour se repérer. *Homo sapiens* : être humain ; *Triticum aestivum* : blé tendre. On remarque qu'en ce qui concerne l'évolution des espèces, les champignons sont plus proches des animaux que des plantes (et encore bien plus proches des animaux que des bactéries !). Image modifiée à partir de <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/>

On distingue 3 grands groupes d'êtres vivants :

- Les **eucaryotes**, les organismes qui ont des cellules avec un noyau.
- Les **bactéries**, qui sont quasiment toutes unicellulaires et qui n'ont pas de noyau.
- Les **archées**, qui sont également unicellulaires et qui n'ont pas de noyau, mais qu'on distingue depuis la fin des années 70 des bactéries car leurs génomes et les composants de leurs cellules sont très différents.

Aucune archée n'a jamais été identifiée dans un levain. On y retrouve cependant des eucaryotes : les levures, qui sont des champignons unicellulaires, et des bactéries lactiques.

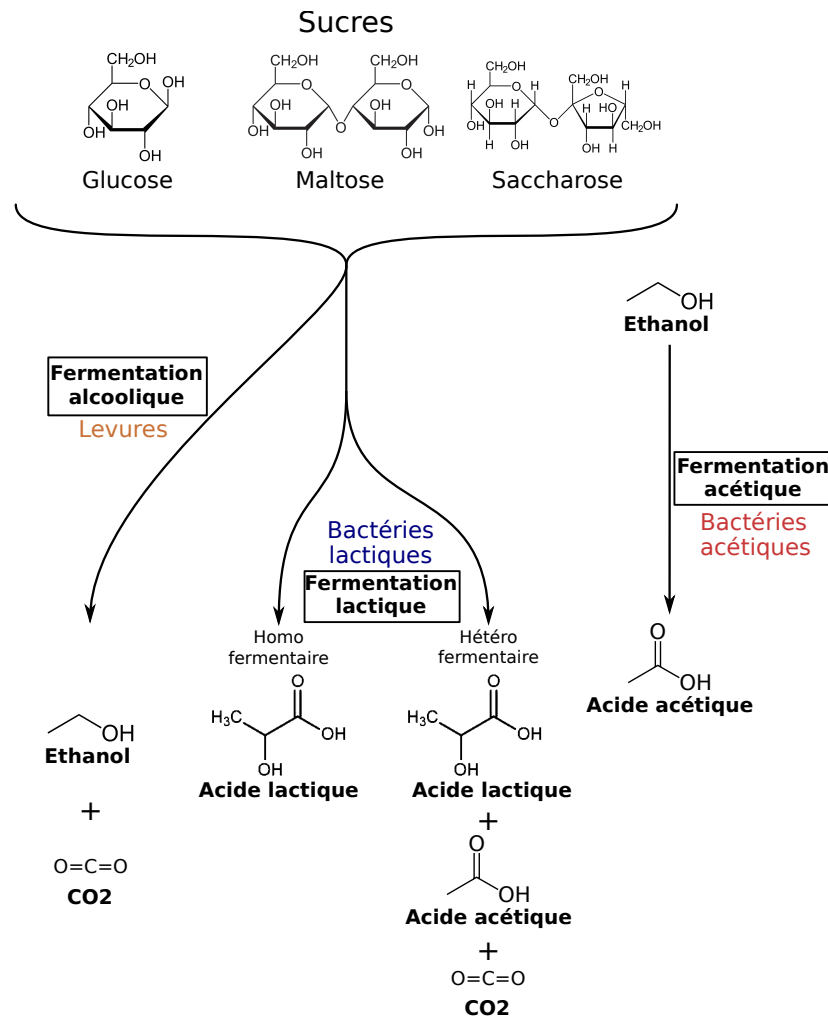
2.3 Les différents types de fermentations dans les levains

Dans un levain de panification, les levures réalisent la fermentation alcoolique, qui transforme les sucres en éthanol et en CO_2 . Elles produisent ainsi la majorité du CO_2 dans le levain et sont principalement responsables de la pousse de la pâte.

Les bactéries lactiques réalisent la fermentation lactique dans les levains, qui transforme les sucres soit entièrement en acide lactique pour des bactéries homofermentaires, soit en acide lactique, acide acétique (ou éthanol) et CO_2 pour des bactéries hétérofermentaires.

Des bactéries acétiques sont parfois présentes et réalisent la fermentation acétique, qui transforme l'éthanol en acide acétique.

Ces différents types de fermentations sont représentées sur le schéma suivant :



Selon l'activité des différents types de microorganismes, différents types d'acides sont produits.

3 Résultats des analyses microbiologiques et biochimiques

3.1 Identification des espèces présentes dans les levains et les farines

Les différentes espèces de levures et de bactéries présentes dans les levains et dans les farines ont pu être identifiées via l'analyse d'une partie de leur ADN. On analyse la séquence d'un gène retrouvé chez toutes les levures, mais qui présente des différences selon les espèces. Il peut être vu comme un "code-barre" nous permettant d'identifier les espèces. On peut ainsi identifier les espèces présentes dans un échantillon. Ces analyses nous informent également sur les proportions dans lesquelles les différentes espèces sont présentes. En effet, on obtient un nombre de copies du gène "code-barre" d'une espèce proportionnellement à sa présence dans l'échantillon. Si une espèce est présente en grande quantité, on obtient beaucoup de copies de son gène et inversement.

Identification des levures

On observe sur le graphique suivant la proportion des espèces de levures identifiées dans les levains. Chaque barre sur l'axe horizontal correspond à une espèce, la hauteur des barres indique leur proportion, et chaque couleur correspond à un fournil. Pour plus de lisibilité, le graphique a été séparé en deux. Le premier ne concerne que les espèces de levures qui ne fermentent pas dans le levain, et le second celles connues pour être responsables de la fermentation dans les levains.

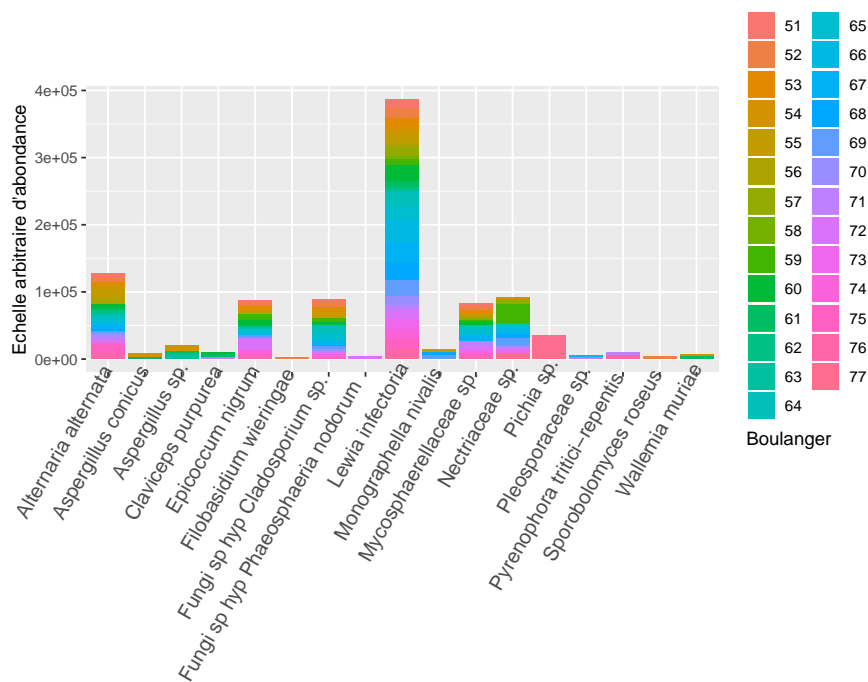


FIGURE 1 – Proportion des levures non fermentaires dans les différents levains

Chaque barre verticale correspond à une espèce. Chaque couleur correspond à un levain. Plus une barre de couleur est haute, plus l'espèce correspondante est en grandes proportions dans le levain.

Les champignons identifiés sur ce premier graphe sont principalement des champignons pathogènes de plantes et notamment du blé, certains se développant lors du stockage du grain ou de la farine. On retrouve notamment les espèces *Alternaria alternata*, *Epicoccum Nigrum* et *Lewia infectoria* en grande proportion dans quasiment tous les levains. Ces espèces sont connues pour être pathogènes de plantes et notamment du blé. On ne connaît à ce jour aucune fonction et aucun intérêt pour la panification à ces espèces.

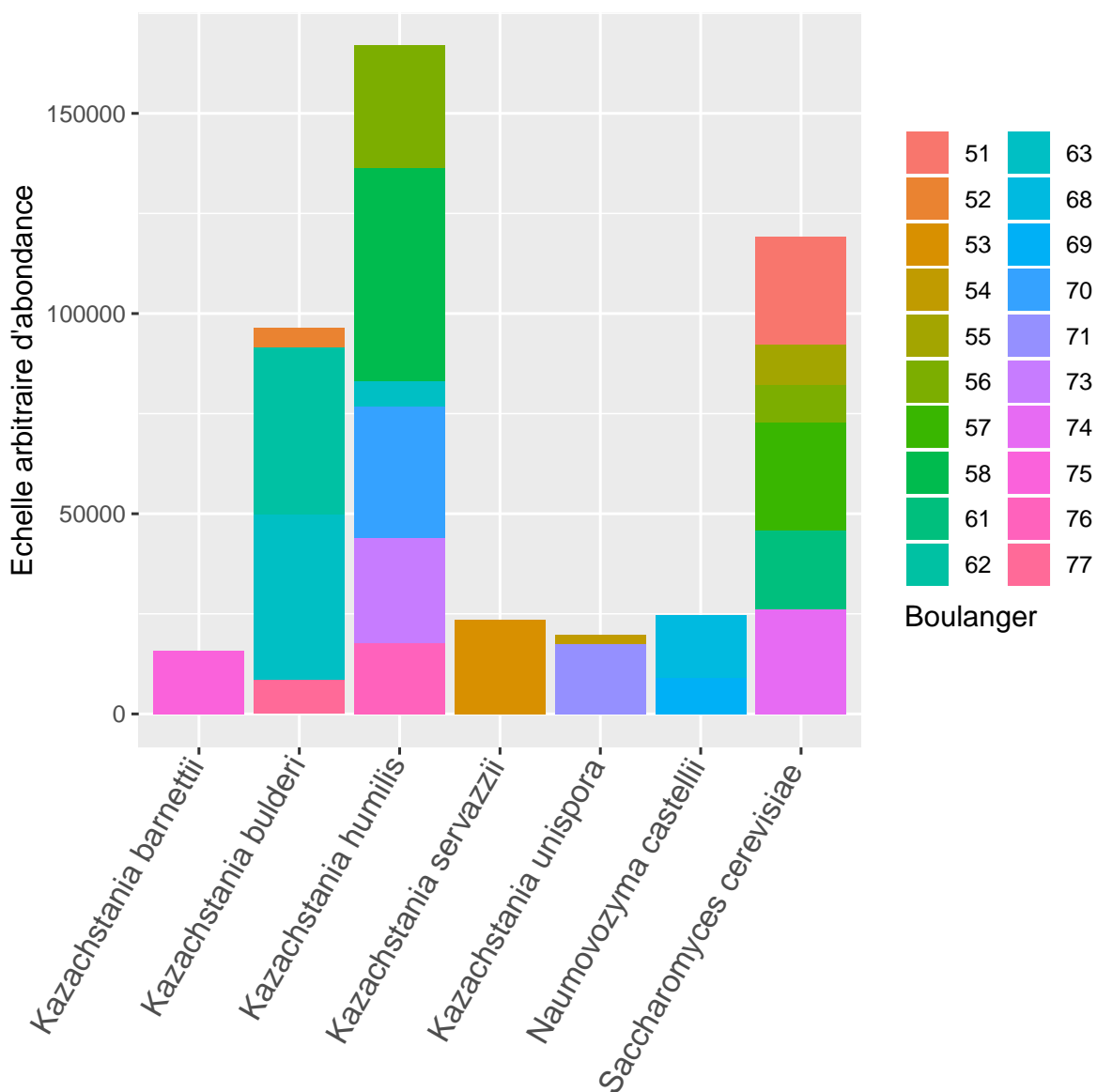


FIGURE 2 – Proportion des levures fermentaires dans les différents levains

Chaque barre verticale correspond à une espèce. Chaque couleur correspond à un levain. Plus une barre de couleur est haute, plus l'espèce correspondante est en grandes proportions dans le levain. 7 levains ne sont pas représentés sur ce graphique car aucune espèce de levure fermentaire n'y a été détectée.

On observe que les espèces *Kazachstania bulderi*, *Kazachstania humilis* et *Saccharomyces cerevisiae* sont présentes chacune dans plusieurs levains, tandis que les autres levures fermentaires ne sont retrouvées que dans un ou deux levains. 7 levains ne sont pas présents sur ce graphique, c'est qu'aucune levure typiquement fermentaire n'a y été identifiée. Différentes hypothèses peuvent permettre d'expliquer ceci :

- Elles n'ont pas été détectées alors qu'elles étaient présentes (problème technique)
 - Elles sont mortes lors du transport, avant les analyses
 - Leur ADN n'a pas été extrait, ou leur gène "code-barre" n'a pas pu être amplifié
 - Il s'agit de levures atypiques qui ne sont pas connues dans les bases de données et qui n'ont donc pas pu être identifiées
- Elles sont effectivement absentes des levains
 - Les bactéries produisent suffisamment de CO₂ pour faire lever la pâte
 - Les espèces de levures identifiées et considérées comme non fermentaires sont en fait capable de fermenter la pâte

Des analyses complémentaires ont été réalisées en octobre 2019 sur les levains ne présentant pas de levure fermentaire.

Analyses complémentaires

Une vingtaine de souches de levures ont été isolées de chaque levain lors de la récolte des échantillons. Elles sont conservées dans un congélateur à -80°C, ce qui permet de les garder en vie de nombreuses années. 16 souches ont été analysées pour chaque levain.

Nous avons ainsi pu identifier des levures fermentaires dans 7 levains :

- Levains 60 et 72 : *Torulaspora delbrueckii*
- Levains 60, 64, 65 et 67 : *Kazachstania servazzii*
- Levains 68 et 69 : *Naumovozya castellii*

Kazachstania servazzii a été identifiée dans d'autres levains dans cette étude, et *Torulaspora delbrueckii* a déjà été identifiée dans des levains dans d'autres études et est connue et utilisée pour son activité de fermentation.

Dans un levain, toujours aucune levure fermentaire n'a pu être identifiée :

- Levain 59 : levures du genre *Cryptococcus* et *Naganishia*

Par ailleurs, un levain ne contenait pas du tout de levure, nous n'avons donc pas pu mener d'analyses complémentaires puisque aucune souche n'avait pu être isolée.

On peut enfin comparer les espèces de levures identifiées dans les farines et dans les levains. Le graphe suivant présente la proportion des espèces identifiées dans les farines (en haut) et dans les levains (en bas).

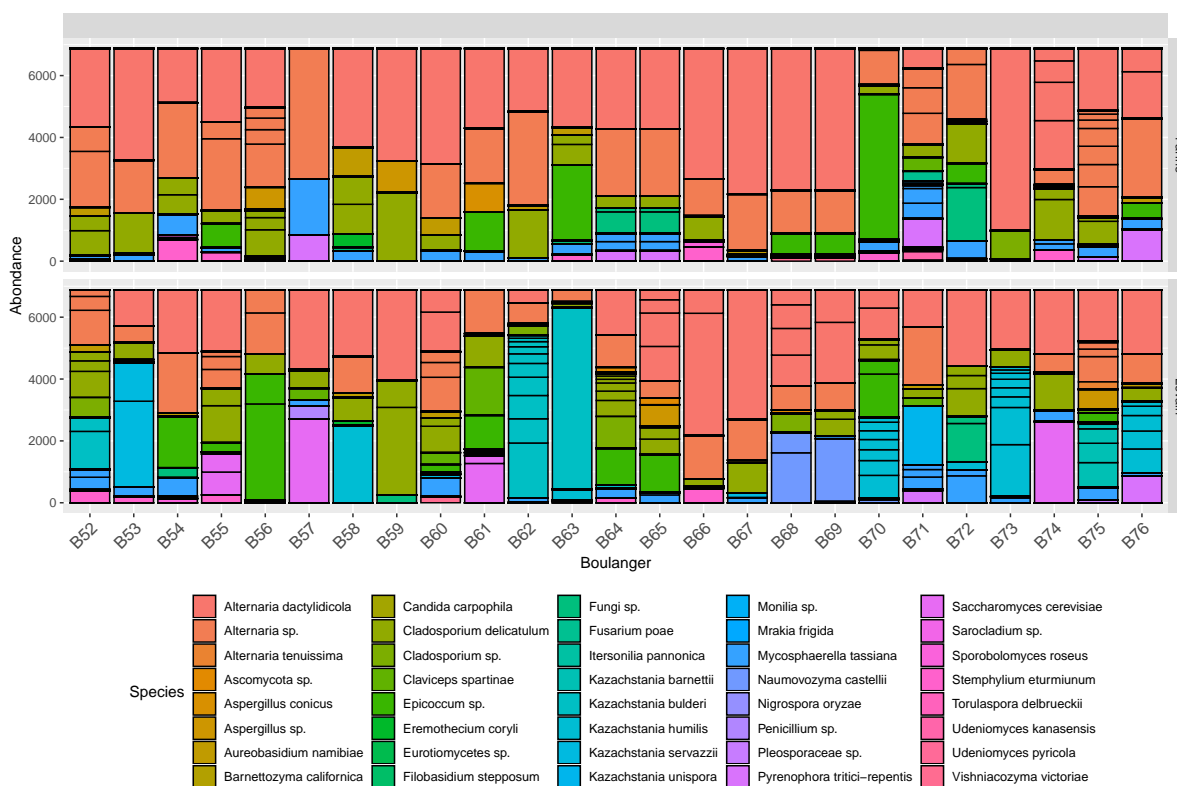


FIGURE 3 – Proportion des levures dans les farines et dans les levains.

Chaque barre horizontale correspond à un échantillon de farine ou de levain. Chaque couleur correspond à une espèce.

On observe que les espèces pathogènes de blé évoquées précédemment comme *Alternaria alternata* en orange ou *Lewia infectoria* en bleu clair sont présentes dans presque tous les levains, et dans toutes les farines. Aucune levure fermentaire n'est retrouvée dans les farines.

Identification des bactéries dans les levains et dans les farines

Le même graphique donnant la proportion des différentes espèces dans les farines (en haut) et dans les levains (en bas) est réalisé pour les bactéries.

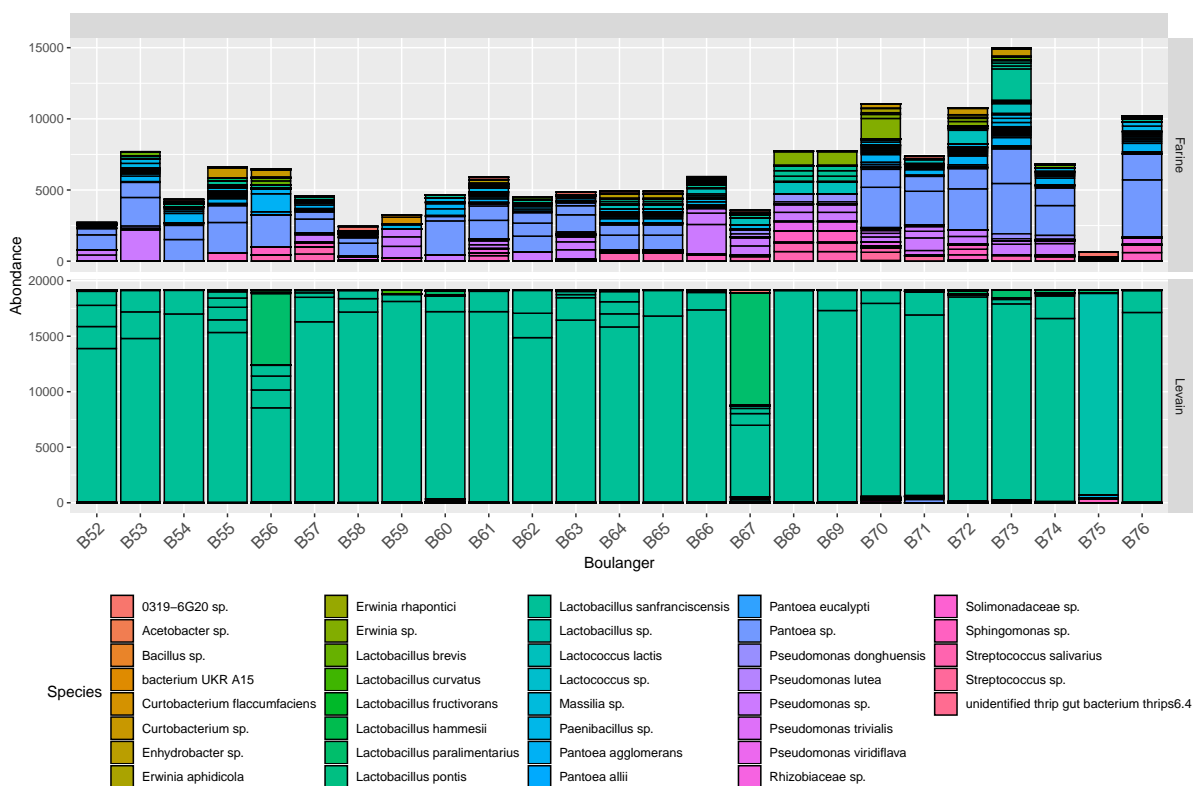


FIGURE 4 – Proportion des bactéries dans les farines et dans les levains

Chaque barre horizontale correspond à un échantillon de farine ou de levain. Chaque couleur correspond à une espèce.

La diversité d'espèces de bactéries dans les levains est très inférieure à celle des levures. On retrouve généralement une seule espèce de bactérie. Il s'agit de la même pour quasiment tous les levains : *Lactobacillus sanfranciscensis*, certains ayant *Lactobacillus paralimentarius*. Le genre *Acetobacter* est retrouvé dans deux levains. On retrouve plus d'espèces dans les farines, *Lactobacillus paralimentarius* étant la plus fréquente. On retrouve également des espèces du genre *Pantoea* et *Pseudomonas*. la composition en espèces varie peu d'une farine à l'autre.

Quantités absolues de levures et de bactéries dans les levains

Ces analyses ne permettent pas de connaître la quantité absolue de microorganismes présents dans les levains, on n'a accès qu'aux proportions. Les bactéries et les levures ont donc par ailleurs été dénombrées pour savoir en quelles quantités elles sont présentes. Les résultats de ces dénombrements sont donnés dans le tableau suivant :

Valeurs minimales, médianes, moyennes et maximales des quantités de levures et bactéries par gramme de levain

| | Nombre de levures par gramme de levain | Nombre de bactéries par gramme de levain |
|----------------|--|--|
| <i>Minimum</i> | 0 millions | 0.07 milliards |
| <i>Médiane</i> | 10.5 millions | 1.87 milliards |
| <i>Moyenne</i> | 15.4 millions | 2.03 milliards |
| <i>Maximum</i> | 77 millions | 7.42 milliards |

Tableau 1 – **Nombre de microorganismes dans les levains**

Les valeurs données sont calculées sur l'ensemble des 25 levains analysés dans le projet.

On pourra se référer à ce tableau pour comparer aux autres levains les résultats affichés sur les fiches individuelles. L'encadré suivant explicite les notions de moyenne et de médiane.

Moyenne et Médiane

Moyennes et médianes sont deux indicateurs permettant de décrire un jeu de données chiffrées.

Pour calculer la médiane, on procède de la façon suivante :

- On classe l'ensemble des valeurs dans l'ordre croissant
- On prend la valeur centrale, telle qu'il y ait autant de valeurs inférieures que supérieures.

Ici, la médiane du nombre de levures par gramme de levain est de 10.5 millions. Cela signifie que la moitié des levains analysés ont moins de 10.5 millions de levures par gramme, et l'autre moitié en ont plus.

La moyenne est calculée en additionnant l'ensemble des valeurs et en divisant le tout par le nombre de valeurs. Cela donne une bonne estimation de la valeur typiquement attendue, à condition que les valeurs ne soient pas trop dispersées.

3.2 Analyse biochimique des levains

Différentes caractéristiques des levains ont été mesurées. Le tableau suivant renseigne les valeurs minimales, maximales, médianes et moyennes de ces caractéristiques.

Valeurs minimales, médianes, moyennes et maximales
des variables mesurées sur les levains

| | pH | TTA (mL) | Quotient fermentaire | Pourcentage d'hydratation |
|----------------|------|----------|-------------------------|------------------------------|
| <i>Minimum</i> | 3.90 | 4.46 | 1.64 | 34.27 % |
| <i>Médiane</i> | 4.15 | 11.09 | 3.67 | 50.92 % |
| <i>Moyenne</i> | 4.19 | 10.97 | 3.74 | 51.09 % |
| <i>Maximum</i> | 5.47 | 18.46 | 5.72 | 62.59 % |

| | Acides Totaux | Lactate | Acetate | Ethanol | |
|----------------|---------------|---------|---------|---------|---------------|
| <i>Minimum</i> | 4.44 | 3.32 | 0.49 | 1.53 | g/L de levain |
| <i>Médiane</i> | 9.62 | 7.34 | 1.45 | 4.59 | g/L de levain |
| <i>Moyenne</i> | 9.93 | 7.44 | 1.46 | 5.58 | g/L de levain |
| <i>Maximum</i> | 15.94 | 11.75 | 2.45 | 10.88 | g/L de levain |

Tableau 2 – **Caractéristiques biochimiques des levains**

Les valeurs données sont calculées sur l'ensemble des 25 levains analysés dans le projet.

Le pH et le TTA (Total Titratable Acids) donnent une idée de l'acidité des levains, mais donnent des informations différentes.

Le pH est une mesure de l'**acidité de l'eau**. Il s'exprime sans unité et peut valoir entre 0 et 14. Plus le pH est faible, plus le milieu est acide. Il se mesure avec un pHmètre.

Le TTA est le volume de soude à une concentration donnée qu'il faut ajouter à une masse donnée d'échantillon pour atteindre un pH de 8.6. C'est une mesure de la **quantité globale d'acides** dans l'échantillon. La soude réagit avec les acides et les neutralisent, ceci fait monter le pH. Il faudra ajouter un grand volume de soude à un levain contenant beaucoup d'acides pour atteindre un pH de 8.6, le TTA sera donc élevé.

pH et TTA donnent donc des informations relativement proches et d'une manière générale un levain peu acide, qui a donc un pH élevé aura un TTA faible et inversement. Il est cependant très compliqué de calculer précisément l'un à partir de l'autre.

Le quotient fermentaire est le rapport entre le nombre de molécules d'acide lactique et d'acide acétique. Un quotient fermentaire de 2 indique que deux molécules d'acide lactique ont été produites pour une molécule d'acide acétique.

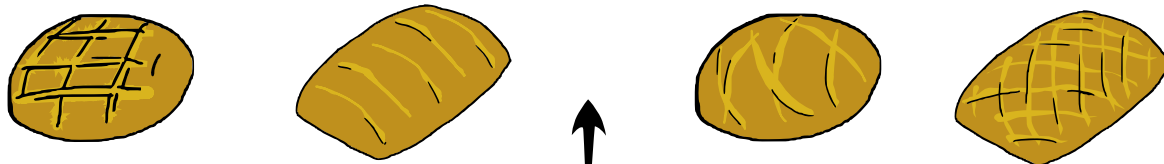
Le pourcentage d'hydratation présenté est calculé en déshydratant le levain et en comparant sa masse de départ à sa masse sèche. Il ne correspond pas forcément au pourcentage d'eau ajouté à la farine pour préparer le levain, cela dépend de l'hydratation de la farine. C'est une caractéristique pouvant influencer sur la composition en espèces du levain.

Les quantités d'acides donnent une idée du type de fermentation qui a eu lieu dans le levain. **La quantité d'éthanol** est un indicateur de l'avancée de la fermentation au moment de l'analyse.

Annexe F

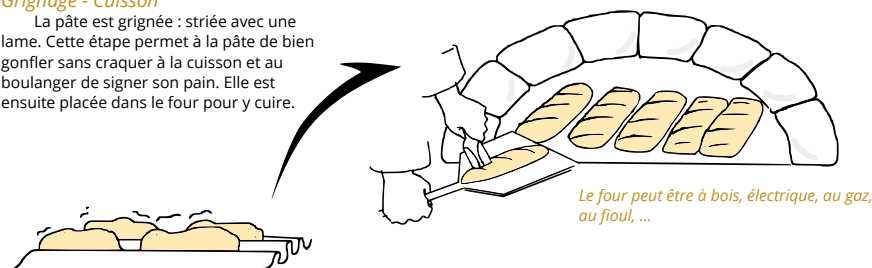
Poster "La panification au levain"

La panification au levain : du blé au pain



Grignage - Cuisson

La pâte est grignée : striée avec une lame. Cette étape permet à la pâte de bien gonfler sans craquer à la cuisson et au boulanger de signer son pain. Elle est ensuite placée dans le four pour y cuire.

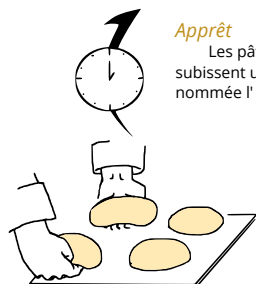


Le four peut être à bois, électrique, au gaz, au fioul, ...

Le pain au levain
Le pain au levain est caractérisé par son acidité, sa longue conservation, sa bonne biodisponibilité des minéraux et par une diversité de goûts et de textures.

Aprêt

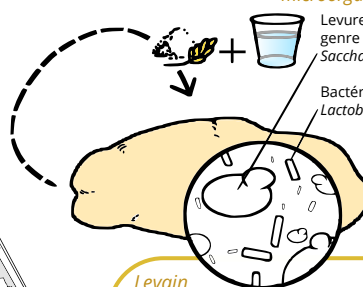
Les pâtons sont laissés à "pousser". Ils subissent une **deuxième fermentation**, nommée l' "apprêt".



Une grande diversité de microorganismes dans les levains

Levures : souvent une espèce du genre *Kazachstania* ou *Saccharomyces cerevisiae*

Bactéries : lactiques, souvent *Lactobacillus sanfranciscensis*



Division - Façonnage

La pâte est ensuite divisée et façonnée en "pâtons".

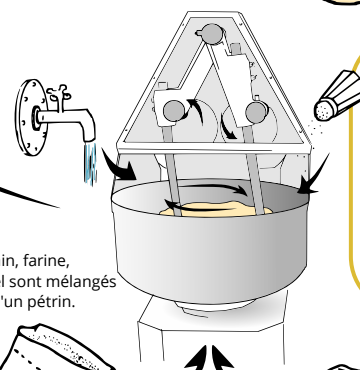
Pointage

La pâte subit une **première fermentation**, nommée le "pointage"



Pétrin

Levain, farine, eau et sel sont mélangés à l'aide d'un pétrin.



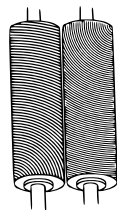
Levain

Le levain est composé de farine et d'eau, permettant aux bactéries et levures **naturellement** présentes de s'y développer. Elles sont à l'origine de la fermentation de ce levain, ce qui a pour conséquence une **production de gaz** (CO2) qui fait **monter** la pâte et une **acidification** et une **production d'arômes** qui donne du **goût** au pain

La farine est produite...

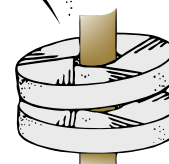
Sur cylindres et plansichter

meilleur rendement
farine blanche, semi-complète ou complète

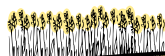


Sur meule de pierre et bluterie

faible rendement
conservation du germe
farine semi-complète ou complète



Variétés modernes de blés sélectionnées par les semenciers
faible diversité
grand rendement



Variétés de blés de pays sélectionnées à la ferme
grande diversité
adaptation locale



© 2014 ANR Bakery. Ce document est une œuvre de l'ANR Bakery. Toute réimpression ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de l'ANR Bakery est formellement interdite. Toute réimpression ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de l'ANR Bakery est formellement interdite.

