

I. Les principaux groupes microbiens d'Intérêt

I. 1. Bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un groupe de bactéries unies par un ensemble de caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Elles appartiennent à la lignée des *Firmicutes*, à la classe des *Bacilli* et à l'ordre des *Lactobacillales*. Phylogénétiquement, elles appartiennent au phylum des *Clostridium* des bactéries à Gram positif (G+C < 50-55 mol%). Traditionnellement le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu G+C supérieur à 50-55 mol% et affecté au phylum des *Actinomyces*. Néanmoins, les bifidobactéries sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal.

Les bactéries lactiques sont un groupe de bacilles, coccobacilles ou cocci, à Gram positif, asporulés, généralement immobiles, ne possédant ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Se sont des bactéries chimio-organotrophes, très exigeantes du point de vue nutritionnel; elles ont une faible aptitude biosynthétique. Leur croissance nécessite un apport exogène complexe aussi bien quantitativement que qualitativement en éléments nutritifs tels que les sucres fermentescibles, les acides aminés et plusieurs vitamines. Pour un bon déroulement du métabolisme, les bactéries lactiques ont besoin selon l'espèce, de minéraux tels que le manganèse, le magnésium, le molybdène, le sélénium et le fer.

I.1.1. Principaux genres

- *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*

Le genre *Streptococcus* regroupait à l'époque toutes les bactéries en chainettes de cocci à Gram positif, catalase négative et asporogènes avec un métabolisme homofermentaire.

Les espèces initialement regroupées dans ce genre ont été redistribuées en quatre genres : *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Vagococcus* selon les homologues de leur ADN

ribosomal 16S et l'hybridation ADN/ADN. La seule espèce du genre *Streptococcus* faisant partie du groupe des bactéries lactiques est *Streptococcus thermophilus*. Cette bactérie se présente sous forme de cellules sphériques ou ovoïdes (0,7 à 0,9 nm de diamètre) en paires ou en chaînes, elle présente un caractère thermophile qui la distingue nettement des lactocoques qui se développent à 10°C mais pas à 45°C; c'est aussi l'un des streptocoques le plus thermorésistant (65°C/30 min).

Le genre *Lactococcus* comprend les streptocoques lactiques mésophiles avec 5 espèces: *Lactococcus lactis* (avec *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* et *Lc. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*), *Lc. plantarum*, *Lc. hordinae*, *Lc. piscium* et *Lc. raffinolactis*. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* possède un plasmide codant la dégradation du citrate en diacétyle, molécule aromatique responsable de l'arôme du beurre. Les lactocoques se retrouvent principalement dans le lait et les crèmes fermentées ainsi que dans les fromages où ils sont en quantité dominante et dans lesquels ils jouent un rôle irremplaçable en contribuant à la structure et en assurant la conservation et la salubrité des produits.

▪ *Enterococcus*

Le genre *Enterococcus* renferme plusieurs espèces mais uniquement deux d'entre elles sont importantes en tant que probiotiques: *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*. Les entérocoques consistent en des micro-organismes ubiquitaires communément retrouvés dans les produits laitiers et autres aliments. Les entérocoques sont largement distribués dans la nature. Ils sont retrouvés dans de nombreux habitats tels que le tractus gastro-intestinal, cavité buccale et le haut appareil génital de l'Homme et d'autres mammifères et également chez les oiseaux, reptiles, insectes, plantes, dans le sol et l'eau.

Dans les années 1930, et sur base du système *Lancefield Serological Typing*, les *Enterococcus* étaient classés dans le genre *Streptococcus* (groupe D), comme d'autres bactéries lactiques du genre *Lactococcus* et *Vagococcus*. Avec l'avènement de la biologie moléculaire et de nouvelles techniques telles que la détermination du pourcentage G+C, le séquençage de l'ARNr 16S et l'hybridation DNA-DNA, Schleifer et al. (1984) ont reclassé les bactéries *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis* comme *Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, respectivement.

Le genre *Enterococcus* est placé dans le domaine des Bacteria, le phylum des Firmicutes, classe des *Bacilli*, ordre des *Lactobacillales*, famille des *Enterococcaceae*, branche des *Clostridium*. Monstein et al. (1998) ont proposé de subdiviser le genre *Enterococcus* en groupes d'espèces. Actuellement, 35 espèces différentes ont été recensées sur la base de l'analyse de l'ARNr 16S et les groupes suivants peuvent être distingués :

- le groupe *En. avium* : *En. avium*, *En. devriesei*, *En. gilvus*, *En. hermanniensis*, *En. malodoratus*, *En. pallens*, *En. pseudoavium* et *En. raffinosus* ;
- le groupe *En. cecorum* : *En. cecorum* et *En. columbae* ;
- le groupe *En. dispar* : *En. asini*, *En. canintestini* et *En. dispar* ;
- le groupe *En. faecalis* : *En. caccae*, *En. faecalis*, *En. haemoperoxidus*, *En. moraviensis*, *En. silesiacus* et *En. termitis* ;
- le groupe *En. faecium* : *En. canis*, *En. durans*, *En. faecium*, *En. hiraе*, *En. mundtii*, *En. phoeniculicola*, *E. ratti*, *E. thailandicus* et *E. villorum* ;
- le groupe *E. gallinarum* : *En. casseliflavus* et *En. gallinarum* ;
- le groupe *En. saccharolyticus* : *En. aquimarinus*, *En. camelliae*, *En. italicus*, *En. saccharolyticus* et *En. sulfureus*.

▪ Les entérocoques dans l'alimentation

Produits laitiers. Les entérocoques les plus couramment présents dans les fromages sont *E. faecium*, *E. faecalis* et *E. durans*, aussi bien les fromages à base de lait cru que de lait pasteurisé provenant de chèvre, de brebis ou de vache ; on retrouve moins souvent *E. casseliflavus*.

Les entérocoques ont un rôle important dans la maturation de plusieurs variétés de fromages, probablement en raison de leur activité protéolytique, lipolytique, de leur capacité de production du diacétyle et d'autres composants volatils contribuant à l'aromatisation, la flaveur et au goût caractéristique. La concentration d'entérocoques dans les fromages frais se situe entre 10^4 à 10^6 UFC/g, alors que celle des fromages fermentés est de l'ordre de 10^5 à 10^7 UFC/g.

Viandes et poissons. Comme indiqué précédemment, les entérocoques appartiennent à la microflore commensale du tractus gastro-intestinal des animaux. De ce fait, il existe de fortes probabilités qu'ils contaminent la viande au cours de l'abattage. *E. faecium* et *E. faecalis* sont les

espèces prédominantes dans les produits carnés, tandis que *En. hirae* et *En. durans* s'y retrouvent en moindre proportion. Il a été dénombré en moyenne entre 10^4 et 10^8 UFC d'entérocoques pour 100 cm^2 de carcasse de porc après abattage. Dans des échantillons de poulet, on a retrouvé des entérocoques dans les proportions suivantes : *En. faecalis* (50,9 %) suivi d'*En. casseliflavus* (26,3 %), d'*En. gallinarum* (4,2 %) et d'*En. gilvus* (4,2 %). *En. faecium* et *En. mundtii* ont été mis en évidence dans du muscle de turbot. *En. faecium* a été aussi retrouvé dans des poissons et des fruits de mer. *En. faecium* NKR-5-3 a été isolé dans des poissons fermentés.

Au niveau des produits carnés fermentés, on a trouvé des souches de *E. faecalis* IM 388C dans des saucisses italiennes naturellement fermentées, tandis qu'on a isolé *Enterococcus* spp. dans des produits à base de viande transformés au Nord du Portugal.

Légumes fermentés. L'origine de la présence d'entérocoques dans le règne végétal n'est pas clairement définie. Elle peut être endogène comme elle peut résulter d'une contamination environnementale. Dans les olives vertes fraîches, *E. faecium* et *E. faecalis* sont des espèces prédominantes, elles sont retrouvées également dans les olives fermentées. On a signalé que les entérocoques trouvés dans les olives ($2,2 \times 10^3$ UFC/g) sont bien adaptés aux valeurs de pH initial (9,0) et à la concentration en sel de la saumure employée lors de la transformation.

Dans les alimentations asiatique et africaine, *En. faecium* et *En. faecalis* sont généralement liés à la fermentation du sorgho et du soja. De même, *En. mundtii* est retrouvé majoritairement dans le soja, la chicorée fraîche et dans l'ensilage d'herbe. Certaines de ces bactéries sont non seulement essentielles à la fermentation de ces aliments, mais elles possèdent également des propriétés technologiques intéressantes comme la dégradation du raffinose et du stachyose, sucres non digestibles, ou encore la production de bactériocines (entérocoques).

- ***Lactobacillus***

Le genre *Lactobacillus* a été décrit en 1901 pour regrouper des bactéries à Gram positif, isolées de produits laitiers et à métabolisme fermentaire. Se sont des bactéries très polymorphes, leur forme varie d'une espèce à l'autre, de coccobacilles aux bâtonnets fins et allongés, isolés ou en chaînes, immobiles, anaérobies ou micro aérophiles et leur métabolisme est soit homo ou hétérofermentaire. La taxonomie actuelle des lactobacilles est basée sur leurs caractéristiques fermentaires, ce qui a permis de les classer en trois groupes:

Groupe 1: Homofermentaires obligatoires, fermentent les hexoses majoritairement en acide lactique, ne fermentant ni les pentoses ni le gluconate. Ils représentent le groupe *Thermobacterium* d'Orla-Jensen et les espèces les plus importantes associées aux aliments sont *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. helveticus*.

Groupe 2: Hétérofermentaires facultatifs, fermentent les hexoses en acide lactique et peuvent produire du gaz à partir du gluconate mais pas à partir du glucose. Ils fermentent également les pentoses par une phosphocetolase inductible en acide lactique et acétique. Les espèces les plus importantes, associées aux aliments incluent *Lb. casei* et *Lb. plantarum*.

Groupe 3: Hétérofermentaires obligatoires, fermentent les hexoses en acide lactique, acétique et/ou éthanol et CO₂. La production du CO₂ est une caractéristique de ce groupe. Parmi ces bactéries on a *Lb. fermentum*, *Lb. kefir*, *Lb. brevis* et *Lb. reuteri*.

Carnobacterium : Des souches de lactobacilles isolées de produits carnés

Pediococcus : Genre se regroupant en tétrade, d'origine végétale mais se retrouvant dans le lait et les produits laitiers. Ex. *Pd. acidilactici*. Utilisé comme probiotique chez le poulet de chair.

Leuconostoc : Espèce type : *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* : cocci hétérofermentaire (production de CO₂).

Oeonococcus : Ex-souches de *Leuconostoc* isolées de boissons alcoolisées (vin, bière, cidre...).

Weissella : Ex-souches de *Leuconostoc parmesenteroides*. Ex. *Weissella confusa*

I. 1. 2. Rôle

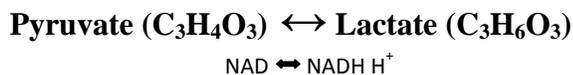
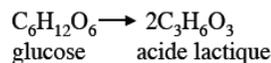
Les bactéries lactiques sont utilisées pour la fermentation d'un grand nombre de produits d'origine animale ou végétale. Le rôle principal de ces bactéries est la production d'acide lactique qui influence la texture, le goût et la qualité microbiologique des produits fermentés. L'abaissement du pH limite aussi la croissance des bactéries indésirables.

I. 1. 2. 1. Les bactéries lactiques en tant que ferments

C'est vers la fin du XIX^{ème} siècle que certains chercheurs démontrèrent qu'il était possible de fabriquer des produits de qualité constante en utilisant des cultures pures de micro-organismes. Les bactéries ferments ou « Starter » peuvent être définies comme étant des isolats capables de produire suffisamment d'acides pour réduire le pH du lait à moins de 5,3 au bout de 6 h à 30-37°C.

Actuellement, on définit les levains ou ferments lactiques comme étant des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés. Parmi ces cultures, on distingue les ferments naturels, souvent des mélanges de nombreuses souches de bactéries lactiques dont la composition exacte est indéterminée des ferments mixtes, composés de cinq ou six souches soigneusement sélectionnées et cultivées séparément jusqu'au stade de culture mère ou de ferment. Au cours de la fermentation, les bactéries se multiplient et produisent des composés conférant à l'aliment ses propriétés organoleptiques comme l'acidité, la saveur, l'arôme et la texture.

La fermentation lactique: C'est une fermentation anaérobie, transforme les sucres en acide lactique sous l'action de la lactate- déshydrogénase (LDH). Cette enzyme catalyse la transformation du pyruvate en lactate et vice versa. Selon le stéréo-isomère (D ou L) du lactate on distingue deux types de lactate déshydrogénase. Le cofacteur le plus souvent utilisé est le NADH, H⁺ qui est convertis en NAD⁺.



I. 1. 2. 2. Les bactéries lactiques en tant que probiotiques

Bien que le premier lait fermenté aux probiotiques ait été mis sur le marché il y a près de 50 ans, le domaine des aliments probiotiques ne s'est développé que dans les années 70. En 1997, plus de 70 produits laitiers industriels (dont plus de la moitié au Japon) tels que des laits fermentés, du fromage blanc, du babeurre et des desserts surgelés contenaient des bactéries probiotiques.

Le concept de probiotiques dérive d'une théorie proposée pour la première fois par le scientifique russe (prix Nobel), Elie Metchnikoff en 1908, qui pensa que la longévité remarquable des paysans bulgares résultait de leur consommation de laits fermentés. Il suggéra que les bactéries ingérées pouvaient avoir une influence positive sur la flore intestinale. Le terme probiotique a été proposé par Lilly et Stillwell en 1965. La FAO et l'OMS (2001) définissent les probiotiques comme étant «des microorganismes vivants, qui une fois consommés en des quantités adéquates en tant que partie d'un aliment, confèrent un bienfait pour la santé de l'hôte».

De nouvelles recherches ont élargi la définition des probiotiques du fait qu'il a été montré que des micro-organismes génétiquement générés et des microorganismes non vivants peuvent posséder un potentiel bénéfique pour la santé humaine et animale. De ce fait, ils ont été définis comme étant des suppléments microbiens vivants ou des composants de bactéries capables d'avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine. Les probiotiques les plus fréquemment étudiés sont des espèces de *Lactobacillus*, incluant *Lb. rhamnosus* (GG), *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. johnsonii* et *Lb. reuteri*. *Lb. rhamnosus* (GG) est l'espèce de *Lactobacillus* la plus fréquemment étudiée chez l'Homme. Une attention doit être portée avec rigueur quant à ces microorganismes, leur taxonomie, les noms de genres et d'espèces évoluant fréquemment. Par exemple *Lb. paracasei* ssp. *rhamnosus* est communément désigné comme *Lactobacillus* GG.

Ces bactéries sont capables d'inhiber la croissance *in vitro* de nombreuses bactéries pathogènes entériques, y compris *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium difficile*. Elles ont été utilisées aussi bien chez l'Homme que chez l'animal pour traiter une variété de désordres gastro-intestinaux tels que les diarrhées associées aux antibiotiques, les diarrhées infectieuses bactériennes et virales, les gastro-entérites dues à *Helicobacter pylori*, les maladies inflammatoires, le syndrome irritant du colon (maladie de Crohn) et l'intolérance au lactose.

I. 1. 2. 3. Les bactéries lactiques comme agents de conservation

Les bactéries lactiques dont *Lb. paracasei* sont très importantes en industrie, du fait qu'elles n'offrent pas uniquement des fonctions technologiques mais contribuent également à la sécurité microbiologique, à travers la production de substances antimicrobiennes. Les bactériocines ou peptides antibactériens produits par les bactéries lactiques ont suscité un grand

intérêt pour leur utilisation potentielle en tant que bio-conservateurs alimentaires du fait que le consommateur actuel demande de plus en plus de produits transformés dépourvus de conservateurs chimiques. Le lien entre fermentation et conservation est la bio-conservation, qui se réfère à la prolongation de la durée de vie et l'amélioration de la salubrité des aliments en utilisant des microorganismes et/ou leurs métabolites.

Ce procédé est connu depuis longtemps puisqu'il est traditionnellement utilisé pour la conservation des aliments au travers de la fabrication des produits fermentés (saucissons, fromages, végétaux...). Les souches de bactéries lactiques produisent diverses substances antimicrobiennes, dont les acides organiques tels que les acides lactique et acétique, dioxyde de carbone (CO₂), peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), diacétyle, éthanol, bactériocines et reutéline qui inhibent ou réduisent la population des bactéries pathogènes indésirables tels que *Clostridium botulinum*, *S. aureus* et *L. monocytogenes* retrouvées dans les produits alimentaires.

Les bactéries sélectionnées pour être utilisées dans le cadre de la bio-conservation doivent satisfaire aux quatre critères suivants : les souches doivent préférentiellement être isolées d'un produit similaire, elles doivent présenter une bonne aptitude à se développer au froid, ne doivent pas apporter de modifications des qualités organoleptiques du produit et bien sûr inhiber la croissance des microorganismes pathogènes et/ou d'altération.

Parmi les différents genres bactériens pouvant être cités pour leur action de bio-conservation, il y a *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*.

Les modes d'action de cette flore sont variés :

- acidification de l'aliment par production d'acides organiques comme l'acide lactique ou l'acide acétique,
- production de bactériocines comme la pédiocine, la nisine, et divers autres métabolites,
- compétition vis à vis des nutriments,
- production de dioxyde de carbone (CO₂),
- production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Selon le type de fermentation effectué (hétéro ou homofermentaire), les bactéries vont produire des substances différentes : production d'acide lactique majoritairement, en cas

d'homofermentation ; production d'acide lactique mais aussi d'acide acétique, de CO₂, d'éthanol, en cas d'hétérofermentation.

L'acide lactique est un monoacide faible de $Pka = 3,86$. Sa forme non dissociée (et donc hydrophobe) est capable de traverser la membrane plasmique des cellules et va ainsi, en se dissociant dans le cytoplasme, acidifier le milieu intérieur de ces dernières.

Par ailleurs, la présence de cet acide non dissocié dans le milieu extérieur entraîne une baisse du gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane plasmique et provoque ainsi la mort de bactéries sensibles.

L'acide acétique agit en coopération avec l'acide lactique. En effet, la diminution de pH causée par l'acide lactique permet à l'acide acétique d'avoir un effet neutralisant sur le gradient électrochimique membranaire. De plus, l'acide acétique a un pouvoir antimicrobien plus important que l'acide lactique. Ceci est permis par une plus grande proportion de forme non dissociée de ce dernier à un pH donné. L'ensemble des modes d'action de l'acide lactique et de l'acide acétique explique le rôle de l'acidification du milieu dans l'inhibition de microorganismes indésirables.

La production de CO₂ des bactéries hétérofermentaires permet la mise en place d'un milieu totalement anaérobie nécessaire à une bonne fermentation.

Pour pouvoir utiliser ces bactéries il faut démontrer leur innocuité pour le consommateur. Cependant certaines de ces bactéries sont utilisées depuis longtemps dans des produits alimentaires comme ferments. Pour ce type de bactéries les autorités européennes ont défini le concept QPS (Qualified Presumption of Safety) qui confère à ces bactéries un statut de qualification de présomption conditionnelle d'innocuité ou QPS. Ce statut est l'équivalent du statut GRAS (Generally Recognised As Safe) aux Etats unis avec quelques spécificités européennes.

Le statut QPS d'une souche sera déterminé en fonction du groupement taxonomique de la souche, des connaissances sur le groupement taxonomique considéré permettant de tirer des conclusions sur son innocuité, de l'existence ou non de souches pathogènes connues dans le groupe taxonomique considéré et enfin de l'usage final prévu pour le produit.

Les microorganismes considérés comme inadaptés à l'approche QPS devront être soumis à une évaluation complète pour s'assurer de leur innocuité.

I. 1. 3. Exemples d'utilisation des bactéries lactiques

En plus des laits fermentés et des produits laitiers, très décrits dans plusieurs ouvrages, les bactéries lactiques sont également impliquées dans la fabrication d'autres produits alimentaires peu connus dont des boissons fermentées.

I. 1. 3. 1. Les laits fermentés

- **Lait acidifié ou acidulé**

Sa fabrication s'effectue grâce à l'ajout de *Lactobacillus acidophilus* dans le lait. En effet, cette bactérie entraîne une acidification du milieu par la fabrication d'acide lactique à partir du lactose utilisé. Il y a aussi production d'acétaldéhyde donnant ce goût particulier aux laits fermentés. De plus, il peut y avoir ajout de *Bifidobacterium* sp. La fabrication s'effectue à partir de lait écrémé préalablement chauffé pendant 1 heure à 93°C. Puis le produit est refroidi jusqu'à atteindre une température de 37°C, température à laquelle *Lactobacillus* est inoculé afin de commencer la fermentation lactique.

- **Laits fermentés alcoolisés**

Ces laits subissent une double fermentation, une fermentation lactique comme les autres laits fermentés mais aussi une fermentation alcoolique. Pour se faire, il y a utilisation de plusieurs micro-organismes : des bactéries lactiques et des levures. Par exemple nous avons le **kéfir**: il est le plus célèbre des laits fermentés alcoolisés, le **Koumis**: ce lait fermenté alcoolisé est proche du kéfir mais celui-ci était fabriqué à partir de lait de jument. Aujourd'hui, il est fabriqué avec du lait de vache. Les bactéries lactiques fermentent le lactose et libèrent de l'acide lactique, et les levures utilisent le lactose pour fabriquer de l'éthanol, c'est la fermentation alcoolique. Cependant, la teneur en alcool reste faible et avoisine les 2%. Lors sa fabrication le lait est chauffé à 28°C et est inoculé en veillant à incorporer de l'air en même temps. Le produit sera alors incubé pendant 2 heures.

- **Le babeurre**

Le babeurre est fabriqué de deux manières :

- soit à partir du lactosérum. Ce lactosérum est récupéré après le barattage du lait frais lors de la fabrication du beurre.
- soit à partir du lait frais directement avec ajout de ferments.

Ces ferments ajoutés appartiennent à l'espèce *Lactococcus lactis*. Ils permettent la fabrication d'acide lactique et par ce biais l'acidification du produit. De plus, ils permettent aussi

à des bactéries tels que *Leuconostoc cremoris* et *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* de développer la saveur du produit. Il y a production de diacétyl, donnant le goût de noisette au babeurre.

Sa fabrication s'effectue à partir d'un lait pasteurisé faiblement écrémé (2% de matières grasses) à environ 22°C.

- **La crème sure**

Elle est obtenue à partir de crème (18 % de matières grasses) qui a subi une fermentation par des bactéries lactiques homofermentaires. La fermentation dure pendant 9 heures à 20°C.

- **Les fromages**

Le fromage est la plus vieille forme de conservation du lait. Les caractéristiques de chaque fromage dépendent de plusieurs facteurs comme le type de lait utilisé, la technologie suivie mais aussi les micro-organismes qui ont participé sa fabrication.

I. 1. 3. 2. Production de bière à partir de Sorgho

Les micro-organismes essentiels dans la production de la bière de sorgho sont les bactéries lactiques et les levures. Les bactéries lactiques interviennent au cours de l'étape d'aigrissement et acidifient le mout, créant ainsi des conditions favorables à la croissance des levures. Dans la production des bières de sorgho, les bactéries lactiques sont à l'origine de l'acidité du mout. *Lactobacillus* est le genre de bactéries lactiques communément rencontré dans les bières de sorgho. Mais d'autres genres tels que *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* ont été aussi isolés suivant les pays ou les régions. Par ailleurs, les espèces de *Lactobacillus* isolées varient selon les études. Ainsi, on a identifié les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *Lb. cellobiosus*, *Lb. brevis*, *Lb. coprophilus* et *Lb. hilgardii*.

L'espèce prépondérante dans ces bières traditionnelles est soit *Lb. plantarum*, soit *Lb. fermentum*. Toutes ces variations au niveau des bactéries lactiques pourraient être liées à la méthode d'identification ou aux ingrédients et ustensiles utilisés dans la préparation de la bière.

En effet, on a identifié *Lb. fermentum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecium* sur les grains de sorgho, sur le malt et dans l'eau de trempage. Par ailleurs, les isolats identifiés comme *Lb. delbrueckii* ont été ré-identifiés comme *Lb. fermentum* sur la base de leur séquence nucléotidique

au niveau de la région 16S rDNA. Aussi, par l'utilisation de galerie API 50 CH, on a identifié les espèces *Lb. fermentum*, *Lactobacillus buchneri*. Par ailleurs, par la méthode d'identification chromatographique des acides aminés sur la membrane cellulaire, on a identifié plusieurs espèces appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*.

I. 1. 3. 3. La lacto-fermentation des légumes

Le terme de fermentation végétale regroupe l'ensemble des activités fermentatives des microorganismes présents naturellement au niveau d'un végétal ou inoculés. Ces fermentations développées par l'Homme visent à prolonger la durée de vie d'aliments végétaux tout en modifiant leurs propriétés organoleptiques. L'organoleptie, aussi appelée flaveur, est l'ensemble des sensations olfactives, gustatives et tactiles d'un produit.

En occident, seuls le chou, les olives et les concombres sont des légumes fermentés de façon industrielle. Néanmoins, d'autres légumes peuvent être utilisés pour ces fermentations, tels que des betteraves, carottes, céleris, haricots verts, radis, et tomates.

La lacto-fermentation des légumes se déroule en trois phases :

1. Pendant la pré-fermentation qui dure en général 2 ou 3 jours, de très nombreuses espèces de micro-organismes se développent. Les légumes commencent à se décomposer et ramollissent.
2. L'acidification démarre quand les bactéries lactiques prennent le dessus sur les autres organismes. De nouvelles substances sont produites (de l'acide lactique bien sûr, mais aussi des vitamines et d'autres composés).
3. Quand le pH (" l'acidité ") du milieu atteint une valeur inférieure à 4,1 (au bout de 2 ou 3 semaines), les micro-organismes indésirables ne peuvent plus se développer. Entre 3,5 et 4, la multiplication des bactéries lactiques s'arrête. Commence alors la phase de stockage pendant laquelle se forment les nouveaux arômes. Les légumes lacto-fermentés peuvent se conserver ainsi plus d'une année.

En fonction des végétaux, les espèces sélectionnées pourront être différentes car les attentes ne seront pas les mêmes. Les critères portent sur:

- leur production d'acide ;
- leur contribution au développement des saveurs et des arômes ;
- leur capacité à améliorer la qualité nutritionnelle et réduire la présence initiale de molécules toxiques ;

- leurs aptitudes probiotiques

- **La choucroute : exemple de fermentation spontanée**

La fermentation de la choucroute est la plupart du temps spontanée. Cela signifie que ce sont les bactéries lactiques présentes naturellement sur le chou qui sont responsables de cette fermentation. La fermentation est initiée par *Leuconostoc mesenteroides*.

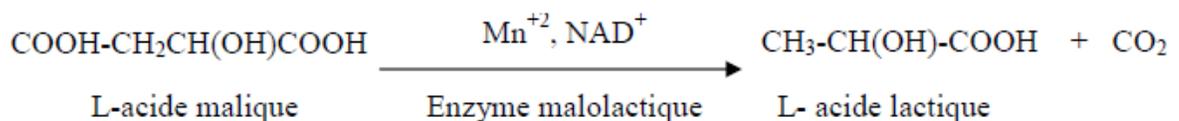
Le dégagement de CO₂ permet l'installation d'une anaérobiose qui entraîne l'inhibition de *Pseudomonas* et des coliformes qui disparaissent au bout de 1 ou 2 jours. Le développement d'acide lactique se poursuit par l'apparition de bactéries hétérofermentaires telles que *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* et parfois *Pediococcus rhamnosus*.

L'acétaldéhyde produit est l'un des composés intervenant dans la flaveur finale de la choucroute. Le processus est stoppé lorsque la teneur en acide lactique atteint 1,5 %. Dans des conditions de température optimale (18°C) et de salinité correcte, 1 à 2 mois sont nécessaires pour l'obtention du produit final. Le temps dépend de la quantité de sucre présente.

Lors de fermentations spontanées, la qualité du produit dépend de la population présente. Pour éliminer ce facteur et s'assurer d'une qualité optimale, il est possible d'utiliser un ferment. Ce sont des souches sélectionnées qui vont être inoculées au produit à fermenter. Ceci se fait lors du démarrage du processus de fermentation. Le saumurage initial est toujours effectué, de la même manière que pour les fermentations spontanées. Cette lacto-fermentation est pratiquée industriellement en Europe et aux Etats Unis.

I. 1. 3. 3. La fermentation malolactique (FML)

La FML désigne la désacidification biologique du vin sous l'action des bactéries lactiques. Elle consiste en une décarboxylation enzymatique de l'acide L-malique plus agressif en acide L-lactique plus doux selon la réaction suivante :



Les bactéries malolactiques proviennent des raisins, du matériel de transport et surtout du processus de vinification. Elles appartiennent aux genres suivants : *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Oenococcus*. Mais, en général, seules les souches appartenant au dernier genre peuvent survivre et effectuer complètement la FML dans le vin tandis que les autres disparaissent très vite après la FA.

L'activité des bactéries lactiques de la FML touche aussi d'autres réactions comme la dégradation de l'acide citrique, la transformation des acides aminés, la production de composés volatils, d'agents antibactériens comme l'acide lactique, l'acide acétique et parfois des bactériocines, ou encore d'amines biogènes.

La FML assure ainsi un caractère organoleptique plus complexe. Il a été prouvé que les composés volatils (des alcools supérieurs comme le 2-3 butanediol, des esters, des acides et des composés cétoniques comme le diacétyle et l'acétoïne) des vins inoculés par des levains malolactiques d'*Oenococcus oeni* ont été significativement augmentés, modifiant les caractères organoleptiques et la qualité du vin.

La FML affecte l'acidité totale, le pH et la sensation acide du vin : l'acidité totale diminue d'environ 1,5 à 4,6 g/L (acide tartrique/L) et le pH augmente de 0,1 à 0,3 point.

A coté de la FML bactérienne, il faut noter que, dans les conditions de la vinification, les levures *Sacharomyces cerevisiae* et certaines non-*Saccharomyces*, particulièrement *Schizosaccharomyces*, peuvent consommer partiellement ou totalement l'acide malique du vin.

I.2. Les bactéries acétiques

Auparavant (années 90), les bactéries acétiques sont divisées en les genres *Gluconobacter*, *Acetobacter* et *Fratueria*. Parmi elles, *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter liquefaciens* et *Acetobacter hansenii* sont naturellement associées avec les grappes de raisons et le vin. Cependant, les bactéries acétiques sont actuellement reconnues comportant 4 genres : *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Gluconobacter* et *Gluconacteobacter*. Les deux genres les plus importants sont *Acetobacter* et *Gluconobacter*.

Les espèces d'*Acetobacter* préfèrent l'éthanol comme source de carbone et dominant souvent durant les dernières étapes de la fermentation de vin.

Les espèces d'*Acetobacter* ont été isolées du vin de vigne.

I. 2. 1. Rôle

Les souches de bactéries acétiques sont utilisées pour la production de vinaigre et de vin; cependant, le manqué de cultures « ferments » pures bien définies est du aux problèmes liés à l'isolement de souches, culture et conservation des bactéries acétiques.

Les bactéries acétiques sont capables de produire de grandes quantités d'acide acétique à partir d'alcool. De plus, ces bactéries peuvent produire d'autres composés, que l'acide acétique qui peuvent influencer la qualité du vin. Des études antérieures ont également montrées que les bactéries acétiques (genres *Acetobacter* et *Gluconobacter*) ont été capables de produire certains polysaccharides tel que la cellulose et le dextrane.

L'acide acétique (CH_3COOH) est un des plus simples acides carboxyliques. Cet acide doux et incolore est caractérisé par un gout acide distinctif et une odeur piquante. De nos jours, cet acide est considéré un intermédiaire clef pour plusieurs industries incluant : les industries chimiques, des détergents, bois et alimentaires.

Actuellement, la production d'acide acétique est réalisée par des moyens chimiques en utilisant des produits pétrochimiques ou par une approche traditionnelle de conversion d'alcool par voie fermentaire en utilisant un type spécifique de bactéries acétiques. Parmi les différentes méthodes chimiques employées, la décarboxylation du méthanol est la technologie de production dominante et représente plus de 65 % de la capacité globale suivie de l'oxydation de l'éthylène et des procédés d'oxydation alcaline.

Malgré le fait que le procédé biologique de production d'acide acétique compte pour uniquement 10% du marché de production global, il reste un procédé important du fait que plusieurs réglementations communautaires stipulent que le vinaigre de grade alimentaire doit provenir d'un procédé biologique (fermentation). Par conséquent, l'optimisation des procédés biologiques pour la production d'acide acétique est l'une des recherches industrielles des plus importantes et est sujette à de nombreuses études en utilisant aussi bien des systèmes de cellules libres (en suspensions) ou immobilisées. Pour ces bioprocédés, il ya diverses bactéries qui peuvent contribuer à la production d'acide acétique, dont les espèces d'*Acetobacter* et de *Gluconabacter* qui tolèrent de fortes concentrations d'acide acétique.

Pour la production industrielle, diverses espèces d'*Acetobacter* sont décrites comme les principales productrices d'acide acétique telles que: *A. aceti*, *A. patourianus*, *A. peroxydans*, *A. orleaniensis*, *A. lovaniensis*, *A. estuniensis*, *A. malorum*, *A. cerevisiae* et *A. oeni*. Par conséquent, *Acetobacter* est souvent utilisé pour la production de vinaigre à partir d'éthanol via l'acétaldéhyde par consommation d'oxygène. Ce procédé de production est très sensible aux conditions de culture appliquées et à la composition chimique du milieu de production. La source

de carbone utilisée joue un rôle important pour la croissance bactérienne et la production d'acide acétique. Il a été rapporté que, les sucres tels que: l'arabinose, xylose, ribose, glucose, galactose, mannose, mélibiose, et le tréhalose peuvent être fermentés par les souches d'*Acetobacter*. Cependant, le besoin important d'oxygène pour la conversion par *Acetobacter* fait du procédé très consommateur d'énergie. De plus, *Acetobacter aceti* peut croître en milieu de culture à une température située entre 28°C et 34°C. Une température supérieure à 37°C résulte en une mort cellulaire complète.

La fermentation acétique : se fait en présence d'oxygène (fermentation aérobie), elle est réalisée par des bactéries acétiques qui transforment l'alcool en acide acétique principal constituant du vinaigre. Cette fermentation est particulière, en effet elle est réalisée par des souches aérobies (*Acetobacter*, *Gluconobacter*). La présence d'oxygène est nécessaire à la formation de coenzymes réduits (NADH, H⁺). Cependant c'est une fermentation car les bactéries ne peuvent pas oxyder complètement le substrat. L'alcool éthylique (éthanol) présent dans le milieu ne sera que partiellement oxydé en acide acétique. La réaction est la suivante :



I. 2. 2. Exemple d'utilisation : Production de vinaigre

Les fermentations naturelles comme le vin, le cidre, mais aussi la bière ou l'hydromel peuvent être utilisées. Les vinaigres dits d' « alcool » sont issus d'un alcool de distillation (souvent issu de betterave à sucre) dilué puis acétifié en machine.

Le vinaigre est un condiment permettant de relever le goût des aliments et d'aider à l'assimilation des graisses cuites (déglacage). Il est également un conservateur naturel. Au niveau législation, l'Europe impose aux vinaigres de vin et d'alcool un minimum de teneur en acide acétique de 6°, soit 60g d'acide acétique par litre. Cette teneur est ramenée à 5°, en France, pour les autres vinaigres. La teneur en alcool ne doit pas dépasser 1° pour les vinaigres de vin et 0,5° pour les autres vinaigres. Les degrés indiqués sur les étiquettes de vinaigre, quels qu'ils soient, sont donc des degrés d'acide acétique et non des degrés d'alcool. Il n'y a pas d'alcool dans le vinaigre ! Il faut de l'alcool pour le produire, mais si la fermentation acétique est bien menée, il ne doit plus en rester. Nous avons donc un processus de double fermentation : du sucre tout d'abord (issu de fruits, de miel, d'une céréale, etc.) qui se transforme en alcool, suivi de la fermentation acétique de ce même alcool.

La fabrication par synthèse chimique d'alcool pur ou d'acide pyroligneux (dérivé du bois), bien que tolérée encore dans certains pays pour les vinaigres de table, est aujourd'hui réservée, en France, aux fabrications industrielles d'acide acétique ou d'essence de vinaigre. Les procédés pour la fabrication des vinaigres de consommation ont variés selon les époques. Nous en retiendrons deux :

- **La méthode immergée ou méthode par acétateur ou fermenteur** : C'est la méthode actuellement la plus utilisée : 98 % des vinaigres produits aujourd'hui, y compris les vinaigres biologiques, sont transformés selon ce procédé.

La dilution alcoolique (vin, alcool, cidre...) est stockée dans de grandes cuves verticales et traversée par de minuscules bulles d'air insufflées au bas de la cuve et chargées de bactéries acétiques. Pour le vinaigre d'alcool, comme nous sommes en présence d'alcool de distillation, un produit inerte, on rajoute des sucres et des phosphates qui aident au développement des bactéries. La méthode immergée permet une fabrication très rapide. Chaque machine fabrique entre 20 000 et 30 000 litres en 24 h. Les vinaigreries possèdent entre 5 et 10 machines de ce type et appartiennent généralement à des grands groupes industriels.

- **La méthode « Orléanaise »** : Utilisée depuis le Moyen Age, elle consiste en une série de tonneaux de 220 litres (appelés « vaisseaux ») périodiquement remplis et soutirés, avec une aération naturelle et la formation en surface de la fameuse peau gluante et gélatineuse communément appelée « mère » de vinaigre. Contrairement à la croyance populaire, celle-ci ne sert en rien à la fabrication du vinaigre. Ce sont des bactéries acétiques mortes agglomérées - donc inactives ! Les bactéries acétiques vivantes nécessaires à la transformation de l'alcool en acide acétique sont dans l'air et invisibles.

Cette méthode, lente, mais respectant au maximum les caractéristiques physiques, chimiques et organoleptiques du produit de base, est pratiquement abandonnée de nos jours. Ses rendements sont dérisoires par rapports aux fermenteurs modernes.

I. 3. Les bactéries propioniques

Les bactéries du genre *Propionibacterium* comprend des souches laitières et des souches cutanées (*Propionibacterium acnes*, responsable de l'acné). Les souches intéressant le domaine alimentaire sont les souches laitières. Ce groupe renferme 4 espèces principales :

P. freudenreichi, *P. acidipropionici*, *P. jensenii*, *P. thoeni*.

L'espèce *P. freudenreichi* comprend 2 sous espèces : *P. freudenreichi* ssp. *freudenreichi* et *P. freudenreichi* ssp. *shermanii*. Ce sont les deux sous espèces les plus utilisées en fromagerie.

Les bactéries propioniques ont des formes variables, leur forme dépend de la souche, de l'âge de la culture et des conditions de croissance. Elle peut aller du petit bâtonnet à la forme conoïdale. Généralement décrites comme des bactéries corynéformes. Taille 0,5 à 0,8 µm x 1 à 5 µm, Gram positif, catalase positive, immobiles, asporulées, aérobies facultatives mais aéro-tolérantes, colonies lenticulaires de couleur variable (crème à rouge brun, rose, orange...). Température optimale de croissance allant de 25 à 35°C mais croissance possible entre 15 et 40°C, pH optimal de croissance entre 6,5 et 7 mais supporte des pH de 5,1 à 8,5.

Elles peuvent se développer sur des sources carbonées diverses (glucose, lactose, fructose), alcools (glycérol...), acides (acide lactique, citrique...). Elles sont peu exigeantes en terme de nutrition azotée mais ont des besoins impératifs en biotine (vitamine H), acide pantothénique (B 5) et nécessitent les principaux minéraux. Quel que soit leur substrat carboné fermenté, leur métabolisme conduit à la production d'acides gras à courte chaîne via le cycle de Wood et Workman (ou cycle de la transcarboxylase), spécifique des bactéries propioniques.

Les bactéries fermentent le glucose et il y a alors production de propionate, d'acétate et de CO₂ suivant la réaction :



Ces bactéries sont connues depuis une centaine d'années. Elles d'abord été identifiées comme les bactéries responsables des ouvertures des emmentals. Actuellement, elles sont utilisées pour leur rôle dans la formation de la saveur spécifique des fromages à pâte pressée cuite.

I. 4. Les levures

Les levures sont utilisées depuis plus de 4000 ans pour la conception de la bière, du vin, mais aussi celle du pain grâce aux levains (culture symbiotique de levures et de bactéries lactiques, dans un mélange de farine complète et d'eau). Les Egyptiens qualifiaient autrefois le processus de fermentation de « miracle ». Ce n'est qu'en 1857, après l'invention du microscope

qu'il fut mis en évidence par Louis Pasteur. Aujourd'hui les levures sont les micro-organismes les plus utilisés par l'Homme et sont présentes dans de nombreux domaines comme l'alimentaire, la santé, l'agronomie, etc.

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires, non photosynthétiques qui possèdent une paroi qui est constituée de polymères glucidiques. Leur appareil végétatif qui est sans différenciation cellulaire (Thalle) est unicellulaire (contrairement aux moisissures qui ont un appareil végétatif pluricellulaire filamenteux). Les levures font partie du règne des mycètes (Fungi) et plus particulièrement du groupe des micromycètes, avec les moisissures. Ce sont donc des champignons microscopiques de forme ovoïde. Les levures vivent principalement dans les liquides sucrés (plantes, fruits), mais elles sont présentes également dans le sol, l'air, tube digestif de l'Homme et des animaux, etc. Elles sont omniprésentes dans la nature. Leurs conditions de croissance : température : 12 à 40°C et pH : 2,8 à 8.

Taxonomies des levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*

Taxonomie des levures du genre *Saccharomyces*

Classification de *Saccharomyces*: Règne Fungi, Division Ascomycota, Sous-division Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Ordre Saccharomycetales et Famille Saccharomycetaceae.

Taxonomie des levures non-*Saccharomyces*

Les levures qui ne sont pas classées dans le genre *Saccharomyces* sont nommées non *Saccharomyces*. Les genres de non-*Saccharomyces* les plus fréquemment rencontrés en œnologie sont : *Torulaspota*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* et *Brettanomyces*....

Torulaspota delbrueckii appartient au: **Règne Fungi, Division Ascomycota, Sous-division Saccharomycotina, Classe Saccharomycetes, Ordre Saccharomycetales, Famille Saccharomycetaceae, Genre *Torulaspota* et Espèce *T. delbrueckii*.**

Le genre *Torulaspota* a été défini en 1895 par Lindner. Ce genre a été incorporé entre le genre *Saccharomyces* et le genre *Zygosaccharomyces* en 1952 par Lodder et Kreger-van Rij, et ensuite redéfini en 1975 par van der Walt et Johannsen.

Donc, l'histoire de *Torulaspota* explique sa relation étroite avec *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces*. James *et al.* (1996) par l'analyse des séquences de la région ITS entre les gènes ARNr 18s et 28s, ont montré que *Torulaspota* peut être insérée dans deux espèces de

Zygosaccharomyces (*Z. mrakii* et *Z. microellipsoides*). Enfin, *Oda et al.* (1997) ont réexaminé les souches de levures classées précédemment comme *T. delbrueckii* en utilisant la PCR-RAPD (Polymerase Chain Reaction-Randomly Amplified Polymorphism DNA). Ils ont reclassé les souches types *T. delbrueckii* dans le genre de *Torulaspota*. Ce genre est composé aussi de *T. globosa* et de *T. pretoriensis*.

Tableau I. Les levures des genres *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces*

<i>Saccharomyces</i>	<i>Non-Saccharomyces</i>
<i>Saccharomyces bailii</i> Linder	<i>Brettanomyces/</i> Anamorph.
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> Hansen, 1908 Syn.	<i>Dekkera</i>
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Candida
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen, 1883	Cryptococcus
<i>Saccharomyces delbrueckii</i> Linder	Debaromyces
<i>Saccharomyces exiguus</i> Hansen	Hanseniaspora/ Anamorph.
<i>Saccharomyces fermentati</i> (Saito) Lodder & Kreger-van Rij	Kloeckera
<i>Saccharomyces florentinus</i> (Cast.) Lodder & Kreger-van Rij	Hansenula
<i>Saccharomyces fragilis</i> Jorgensen	Kluyveromyces
<i>Saccharomyces fructuum</i> Lodder & Kreger-van Rij	Torulaspota
<i>Saccharomyces heterogenicus</i> Osterwalder	Metschnikowia
<i>Saccharomyces oleaginosus</i> Santa Maria	Pichia
<i>Saccharomyces rosei</i> (Guill.) Lodder & Kreger-van Rij	Rhodotorula
<i>Saccharomyces steineri</i> Lodder & Kreger-van Rij	Saccharomycodes
<i>Saccharomyces boulardii</i> et <i>Saccharomyces kefir</i>	Schizosaccharomyces

I. 4. 1. Rôle et utilisation

Aujourd’hui les levures sont essentielles dans les biotechnologies et trouvent de nombreuses applications dans plusieurs domaines :

A/ En industries Agro-alimentaires

- **Boulangerie (Panification)** : La levure de boulangerie est *Saccharomyces cerevisiae*, elle est produite à raison de 1,7 million de tonnes/an sur de la canne à sucre ou de la betterave. Le procédé de fabrication est aérobie (car il produit de la biomasse) et continu. Dans ce cas, il ya intervention de *l’effet Pasteur*, cet effet a été découvert en 1857 par Louis Pasteur, qui a constaté qu'en aérant un bouillon de la levure *Saccharomyces cerevisiae* où les concentrations en sucre étaient faibles (inférieures à 2 g/L), on provoquait une augmentation du développement des levures et une diminution de la production d'alcool par la fermentation alcoolique. Pasteur en déduit que la « respiration » inhibe la fermentation alcoolique.

En fin de production, les levures sont concentrées par centrifugation puis filtration, la « pate » obtenue est à environ 30% de matière sèche et se conserve à quelques semaines à 4°C. Pour une longue conservation, elle subit un séchage et une déshydratation. Les caractéristiques

recherchées chez ces levures sont : un très bon rendement de croissance, résistance au séchage et à la congélation, un bon pouvoir fermentaire, la tolérance à l'acide propionique utilisé dans la fabrication du pain de mie pour inhiber le développement des moisissures. La qualité aromatique est également recherchée.

Flore naturelle de la farine

La farine, élément de base de la fabrication du pain, contient une population initiale de levures et de bactéries lactiques évaluée entre 10^3 et 10^4 par gramme selon les types de farines. Les levains naturels (utilisés pour la technique dite sur levain) présentent une flore comprenant 10^6 à 10^7 levures par gramme de levain et 10^9 bactéries lactiques par gramme de levain.

Les levures sont principalement représentées par *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis* et *Saccharomyces dairensis*. Les espèces les plus fréquentes de la flore lactique des levains sont des lactobacilles (*Lactobacilles plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. sanfrancisco*...). Cette flore est hétérogène : elle présente des espèces homofermentaires (espèces qui produisent majoritairement de l'acide lactique par fermentation des sucres de la pâte à pain) et des espèces hétérofermentaires (espèces qui produisent de l'acide lactique, de l'éthanol et du CO_2).

Différents procédés de fermentation de la pâte à pain

Il existe trois grands types de procédés de fermentations :

- **La première méthode est la plus mise en œuvre** : c'est une technique dite « **directe** ». Les levures déshydratées sont directement ajoutées dans le pétrin. A la pâte, sont ajoutées 10^8 levures par gramme et la pâte fermente très peu de temps. Le temps de pointage en cuve est réduit, voire supprimé. Ceci apporte des avantages et des inconvénients pour la fabrication du pain : le temps de fabrication est réduit, donc une réduction de l'énergie est aussi requise pour cette fabrication, le pain produit est plus volumineux et la mie est très blanche, mais on a un pain dont la saveur a disparu.
- **Le deuxième procédé est la technique dite « viennoise »**. Le pétrin estensemencé avec une pâte liquide déjà fermentée par des levures industrielles. Cette technique permet de produire des pains avec un goût plus marqué que la méthode précédente. Par ce procédé, la pâte est renforcée, les arômes développés, la mie est nettement plus alvéolée. Ce pain a également une meilleure conservation.

▪ **La troisième méthode est la technique dite « sur levain »** : la fermentation est assurée par un morceau de pâte (le levain) renfermant une population sauvage de levures et des bactéries acidifiantes. Le levain apporte un goût acidulé. La fermentation est néanmoins plus longue que les deux précédentes (5 heures environ). Cette technique permet de produire un pain dont la croûte est plus épaisse, ce qui augmente le temps de conservation.

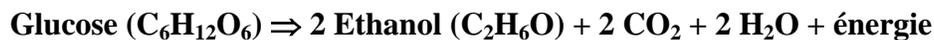
- **Brasseries (Fabrication de boissons alcoolisées)** : Transformation des substrats carbonés ou amylacés en produits riche en alcool. En présence de grandes quantités (à partir de 2 g/l) de substrat carboné (glucose par exemple), *Saccaromyces cerevisiae* ne métabolise les sucres que par la voie fermentaire dans le moût de raisin, la respiration est inhibée même en présence d'oxygène. Ce phénomène est appelé l'effet Crabtree (découvert en 1923 par Crabtree) ou répression catabolique par le glucose, ou encore contre-effet Pasteur.

Fabrication de la bière : La bière est obtenue par la fermentation alcoolique de l'orge germe (malt), puis aromatisée avec du houblon. La germination de l'orge permet l'hydrolyse de l'amidon en glucose, maltose et dextrines. Les levures utilisées sont du genre *Saccharomyces* : Classiquement on a *Saccharomyces cerevisiae* responsable de la fermentation dite « haute », car la levure reste en surface, qui se fait à 18-22°C et *Saccharomyces carlsbergensis*, responsable de la fermentation dite « basse » car la levure floccule en fin de fermentation et qui se fait à 7-15°C.

Fabrication du vin : La fermentation alcoolique dans ce cas est assurée par les levures présentes naturellement sur la peau des raisins. En début de fermentation interviennent principalement les levures non-*Saccharomyces*, principalement *Kloeckera apiculatae* et *Torulopsis*, remplacées ensuite par *Saccaromyces cerevisiae* (var. *ellipsoideus* et *oviformis*) plus tolérantes à de fortes teneurs en éthanol. Plus récemment, le moût estensemencé à partir de levures œnologiques sélectionnées pour leur performances. La deuxième fermentation intervenant en vinification est la fermentation malo-lactique assurée par les bactéries lactiques, principalement *Oenococcus oeni* qui transforme l'acide malique (très agressif) en acide lactique (plus doux). Dans le cas du Sauterne (un vin liquoreux de la région du sauternais à Bordeaux, France, la « pourriture noble » est due à *Botrytis cinerea*, qui sous certaines conditions (raisin complètement mur avant la pourriture et cultivée dans une région qui offre des matins humides et brumeux suivis d'après-

midi ensoleillés et secs), ce qui induit la formation d'arômes fruités caractéristiques (abricots, fruits secs...).

La fermentation alcoolique transforme les sucres en alcool et en gaz carbonique. C'est une fermentation anaérobie (en l'absence d'oxygène). La fermentation alcoolique a lieu dans un milieu à pH acide et riche en sucre. Le glucose est utilisé comme substrat énergétique pour synthétiser de l'éthanol et du CO₂, la zymase est l'enzyme microbienne qui catalyse la réaction. La réaction s'écrit de la façon suivante :



- **Fromagerie (Affinage des fromages)** : Les levures désacidifient la pâte en réduisant l'acide lactique ce qui permet de mettre en place une flore (bactéries et autres) qui participent à la formation du goût. Elles hydrolysent certains peptides au goût amer et augmentent alors la saveur du fromage.

B/ Vecteurs de clonage : Les levures permettent de construire des YAC (*yeast artificial chromosomes*), qui sont très utiles pour le clonage de très grands fragments d'ADN (100 à 2000 kb) ce qui permet de produire des protéines recombinantes (ex. le vaccin contre l'hépatite B et la *Papillomavirus* humain par *Saccharomyces cerevisiae* et la chymosine) et des enzymes (cas de *Pichia pastoris*).

C/Probiotiques : Alternative naturelle aux antibiotiques. Concernent principalement le transit, les défenses immunitaires et la sphère vaginale. La levure utilisée est *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* chez l'Homme et *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* chez l'animal.

D/ Levure aliment : la levure est riche en vitamines (B) et en protéines, donc en acides aminés (notamment la lysine, méthionine, cystéine, cystine, taurine) et peut être utilisée comme complément alimentaire. Elle est produite sur du lactosérum, le pourcentage en matière sèche varie de 35 à 55 %.

E/ Agriculture:

- **Agent de biocontrôle (Protection des cultures)** : Une levure permettrait aujourd'hui de combattre la fusariose (maladie courante chez les végétaux provoquée par un champignon décomposeur) et donc d'augmenter les rendements et la qualité des céréales.

- **Agents d'ensilage en nutrition animale** : Les levures permettraient d'apporter des nutriments supplémentaires aux animaux et donc d'améliorer les rendements et leur croissance.

- **Dépollution des sols** : Des plantes transgéniques ayant reçues un gène de levure, fixent mieux les métaux lourds, car ce gène les rends plus résistantes à ceux-ci. Cela permettrait de palier au problème de l'accumulation du plomb ou du cadmium dans le sol.

I.5. Les moisissures

Les moisissures sont des champignons filamenteux hétérotrophes, ce sont des eucaryotes non photosynthétiques et immobiles. On les qualifie de multicellulaires mais la notion est assez vague puisqu'il s'agit d'une structure souvent mycélienne et coenocytique (cellules fusionnées à plusieurs noyaux). La structure de la paroi diffère selon les espèces, le cytoplasme contient des ribosomes, des mitochondries, un réticulum endoplasmique et un ou plusieurs noyaux. L'hyphe est l'élément structural des moisissures, il s'agit de filaments dont l'ensemble constitue un réseau appelé mycélium.

I.5.1. Développement des moisissures

Les moisissures doivent puiser dans le milieu ambiant l'eau, les substances nutritives et les éléments minéraux nécessaires à la synthèse de leur propre matière. Elles les absorbent à travers la paroi de leur appareil végétatif. On dit qu'elles sont absorbotrophes. Différents modes de vie existent : symbiose avec des végétaux, parasites d'animaux ou de végétaux, certaines se développent aussi sur des déchets organiques ou contaminent les produits alimentaires (cette troisième catégorie constitue les saprophytes).

La source de carbone et d'énergie des moisissures provient de molécules carbonées organiques, il faut en plus, pour le développement de moisissures, une quantité d'oxygène suffisante, une température comprise entre 5 et 25°C (un développement est possible entre 0 et 60°C, mais en dehors des températures optimales, il sera plus lent), une humidité suffisante.

La croissance des hyphes est strictement apicale, elle met en jeu la lyse de la paroi apicale et une synthèse de matériel pariétal nouveau (grâce à des hydrolases et synthases contenues dans des vésicules souvent issues de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique)

La reproduction sexuée ou asexuée se fait par des spores, minuscules particules vivantes, ce sont des cellules déshydratées, au métabolisme réduit, entourées de parois protectrices épaisses qui les isolent du milieu ambiant. Elles sont produites en très grand nombre, et peuvent survivre

longtemps (plusieurs mois voire plusieurs années). Elles sont déposées et germeront lorsque les conditions (essentiellement les conditions d'humidité) deviendront favorables. La germination des spores est à l'origine de la forme végétative des moisissures ; en effet, le développement de celles-ci comprend une phase végétative, de croissance et de nutrition, et presque simultanément, une phase reproductive au cours de laquelle a lieu la formation des spores.

I.5.2. Principales moisissures

On pourra citer les principaux genres de moisissures que sont *Penicillium* et *Mucor*; *Mucor* ne possède pas de rhizoïdes, se développe sur tous les substrats humides mais aussi sur les grains de riz, de seigle, ou de blé. Ces moisissures interviennent dans les processus de saccharification (transformation de substances amylacées ou cellulosiques en sucres fermentescibles. Quant au genre *Penicillium*, l'appareil sporifère présente une forme comparable à celle d'un pinceau, avec un thalle vert ou blanc. Les espèces appartenant au genre *Penicillium* se développent dans les sols, dans les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, les graines... Elles sont très utilisées dans l'industrie notamment pour la fabrication de fromages (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*), mais aussi pour la fabrication de métabolites : fabrication d'antibiotiques de type pénicilline.

Il existe des espèces qui sont intermédiaires entre levures et moisissures, elles doivent être classées dans les champignons levuriformes. C'est le cas des espèces du genre *Geotrichum*. De plus, les champignons filamenteux peuvent se diviser en plusieurs groupes, selon la présence de paroi dans leur appareil végétatif, leur type de spores.

I. 5. 3. Utilisation des moisissures dans les industries alimentaires

Les moisissures sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, protéolytiques...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (notamment lors de l'affinage de fromages ou la production d'enzymes). L'action « positive » des moisissures est d'une grande utilité dans l'agriculture (le champignon filamenteux *Botrytis cinerea* à l'origine de la « pourriture noble » des raisins du Sauternes : vignoble de Bordeaux en France), ainsi que dans l'industrie (production de fromages, production de molécules à activité pharmacologiques, d'enzymes industrielles).

Elles permettent l'affinage des fromages et se développent à la surface de la croûte donnant aux différents fromages leur aspect spécifique. En effet, l'espèce *Penicillium camemberti*

est responsable de la croûte fleurie du Camembert ou encore *Penicillium roqueforti* responsable de la couleur bleuâtre à l'intérieur du Roquefort.

Comme pour les levures, les moisissures étant à la surface de la croûte, elles consomment l'acide lactique et contribuent à la diminution du pH du fromage, avec une efficacité supérieure à celle des levures. De plus, elles ont une activité enzymatique protéolytique et lipolytique qui permet de libérer divers produits (acides aminés et acides gras) participant à la flaveur du fromage. Quoique la plupart des espèces d'*Aspergillus* sont pathogènes, *Aspergillus oryzae* est une moisissure « noble » proche de *Penicillium* et donc des moisissures de fromages à pâtes persillée. Nous avons également, *Aspergillus sojae*, utilisée au Japon pour fermenter la sauce de Soja, du miso (aliment), du mirin (liquide jaunâtre, sirupeux et assez sucré alcoolisé) et d'autres condiments lacto-fermentés tels que le Tsukemono (produits macérés). *Aspergillus terreus* est utilisée industriellement pour produire de grandes quantités d'acides organiques (acide itaconique et cis-itaconique) et la première source de la mévinoline (un anti-cholestérolémiant).

I.6. *Bacillus*

Les espèces du genre *Bacillus* sont des bâtonnets Gram-positifs, aérobies, sporulés, ubiquitaires, retrouvés dans différents environnements tels que le sol, rochers, poussière, environnement aquatique, végétaux, aliments et le tractus gastro-intestinal de divers insectes et animaux. Des produits commerciaux incluant les enzymes (protéases), antibiotiques, acides aminés et insecticides sont produits par *Bacillus* sp. Le potentiel des espèces de *Bacillus* à sécréter de nombreux peptides antimicrobiens a été connu depuis plus de 50 ans et de nombreux peptides ont été rapportés. Parmi ces peptides, nous avons lipopeptides cycliques (surfactine, iturine et fengycine), qui sont utilisés dans des processus biotechnologiques et pharmaceutiques à du fait de leurs propriétés de surface et antimicrobienne. Elles sont également utilisées en tant que probiotiques pour l'Homme (*B. coagulans*) et pour l'animal (*B. subtilis*).

I.7. Les Actinobactéries

L'ordre des *Actinomycetales* (communément désigné Actinomycètes) est un groupe dans le phylum des bactéries Gram-positives *Actinobacteria* contenant des genres filamenteux tels que *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora* et *Streptomyces* et unicellulaires tels que *Corynebacterium* et *Mycobacterium*.

Les membres de l'ordre *Actinomycetales* montrent une diversité physiologique. La plupart des Actinomycètes sont aérobies, saprophytes avec un cycle de vie complexe (Fig. 1) mais des exceptions existent. Elles sont ubiquitaires dans l'environnement et sont capables de vivre seules ou en symbioses. En plus certains membres particulièrement du genre *Streptomyces*, sont des producteurs de plusieurs métabolites d'intérêt.

Ces bactéries sont une source de nombreuses molécules bioactives et 2/3 des antibiotiques utilisés en clinique et d'une large gamme d'enzymes industrielles.