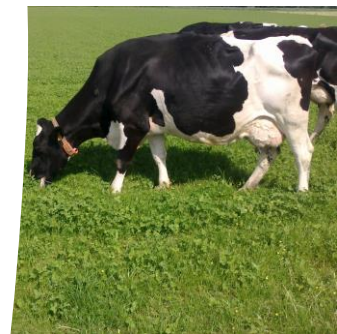


Fermentation: nouveaux avenir pour les légumineuses ?



Isabelle SOUCHON, UMR GMPA, INRA

F. Irlinger, A. Saint-Eve, S. Helinck, P. Bonnarme, S. Landaud



Les aliments fermentés ...entre Art et Sciences

Quelques généralités sur les aliments fermentés



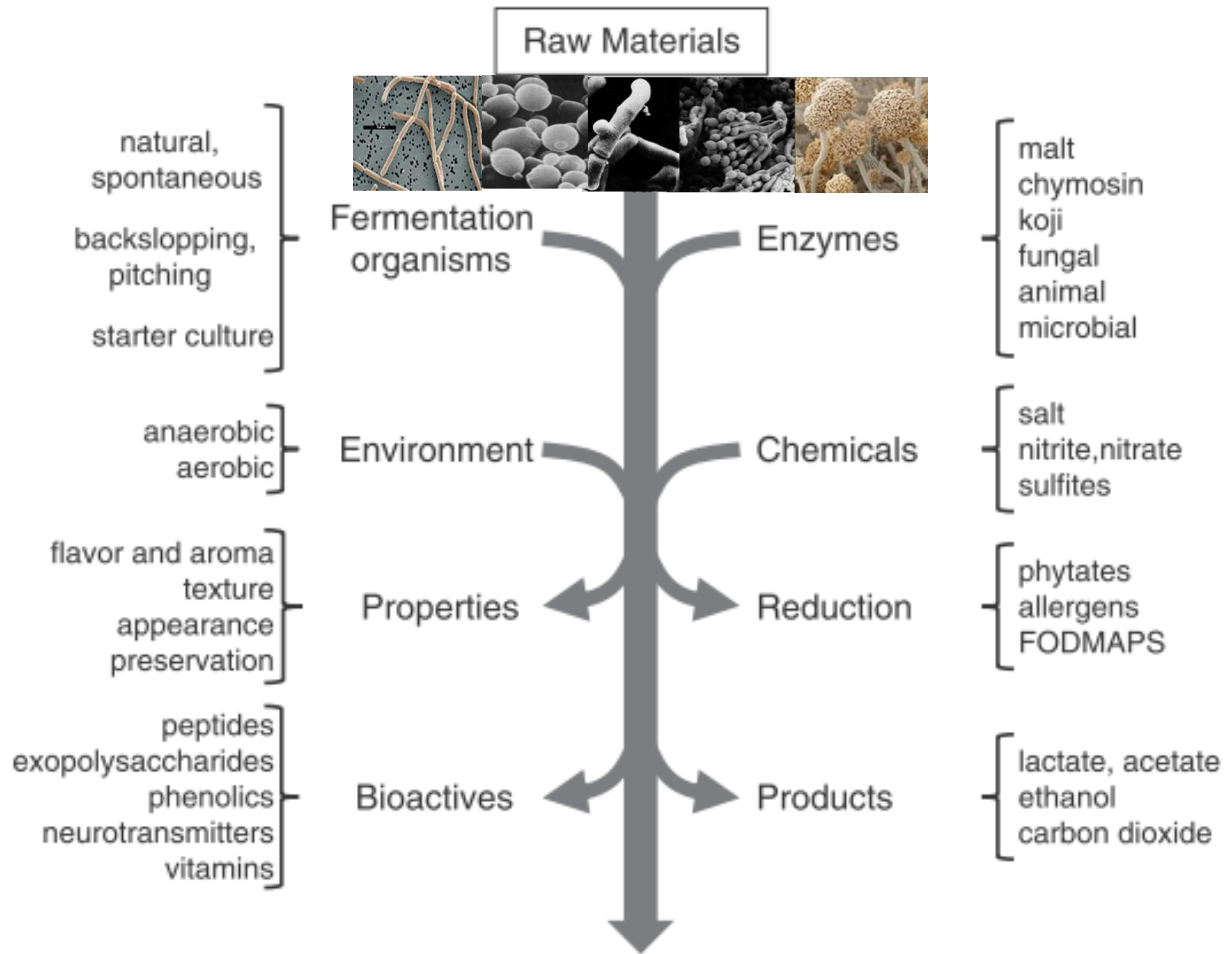
Les aliments fermentés



La fermentation

procédé ancien, sobre, durable, hautement flexible (produits, échelles)

Ensemble de réactions biochimiques



Marco et al., 2017



Des produits traditionnels ... que l'on redécouvre

Les aliments fermentés sont présents dans la diète de tous les pays du monde depuis 10 000 ans

Nombreux ouvrages, nombreux blogs, des festivals ...

Aliments Industriels

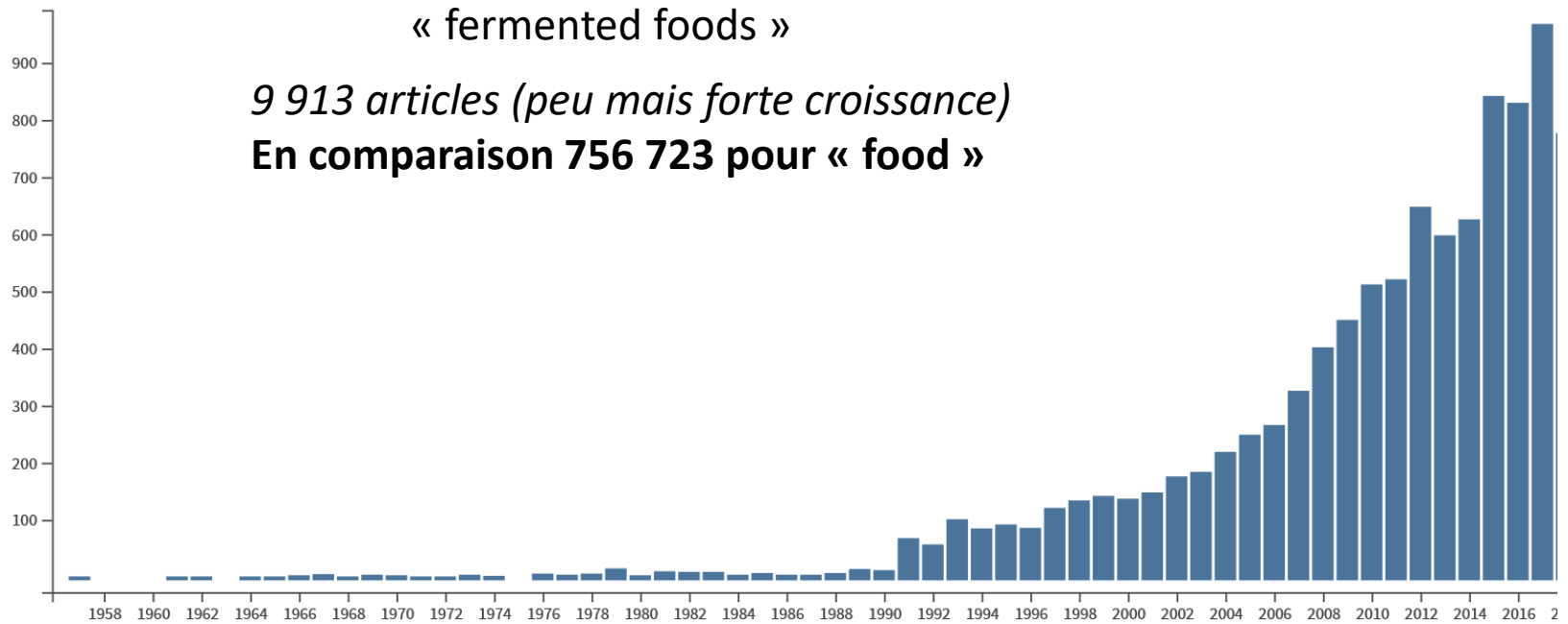


Aliments « naturels »



« driver » santé

Des évolutions techniques et des avancées scientifiques



Evolution des outils de séquençage

Méta Génomique / Méta transcriptomique / Métabolomique

Meilleure connaissance de la diversité microbienne : Microbiote de l'aliment



Les bénéfices de la fermentation

...des bénéfiques sanitaires :

La diversité microbiennes en particulier dans les fromages permet de combattre des agents pathogènes :

L. monocytogenes, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*

des activités antimicrobiennes et/ou des effets barrières contre des micro-organismes d'altération ou pathogènes :

Saint-Nectaire : Consortium inhibiteur de 27 souches (4 groupes bactéries et levures) avec activité anti-listéria

Callon et al. (2011)



Concentrations de lactate ou acétate

Production de bactériocines, Composés anti-microbiens

Compétitions entre micro-organismes pour les nutriments

(Montel et al., 2014)



Les bénéfices de la fermentation

... des bénéfices nutritionnels

(Health benefits of fermented foods: microbiota and Beyond, Marco et al., 2017)

Diabète de type 2, Maladie Cardiovasculaire ... pas de preuve « solide » / nombre limité d'études cliniques

Dermatite atopique / Etude Coréenne sur cohorte (Park et Bae, 2016)

Mais aussi

production de vitamines B, K ...

Production de peptides bioactifs,

Réduction d'allergènes

Réduction de la teneur en α -galactosides, Acide Phytique, Tannins ...

Consommation de micro-organismes « vivants » / probiotique ?



Les bénéfices de la fermentation

... des bénéfices sensoriels

Des produits ... haut en couleur et en goût

lait



Soja



La fermentation de légumineuses ...entre tradition et innovation



Matières premières variées : légumes, lait, graines, fruits...

Fermentation spontanée

Fermentation « raisonnée »

Isolement, sélection, caractérisation des souches

Communautés microbiennes naturelles

Souches sélectionnées avec fonctions cibles

Aliments fermentés traditionnels

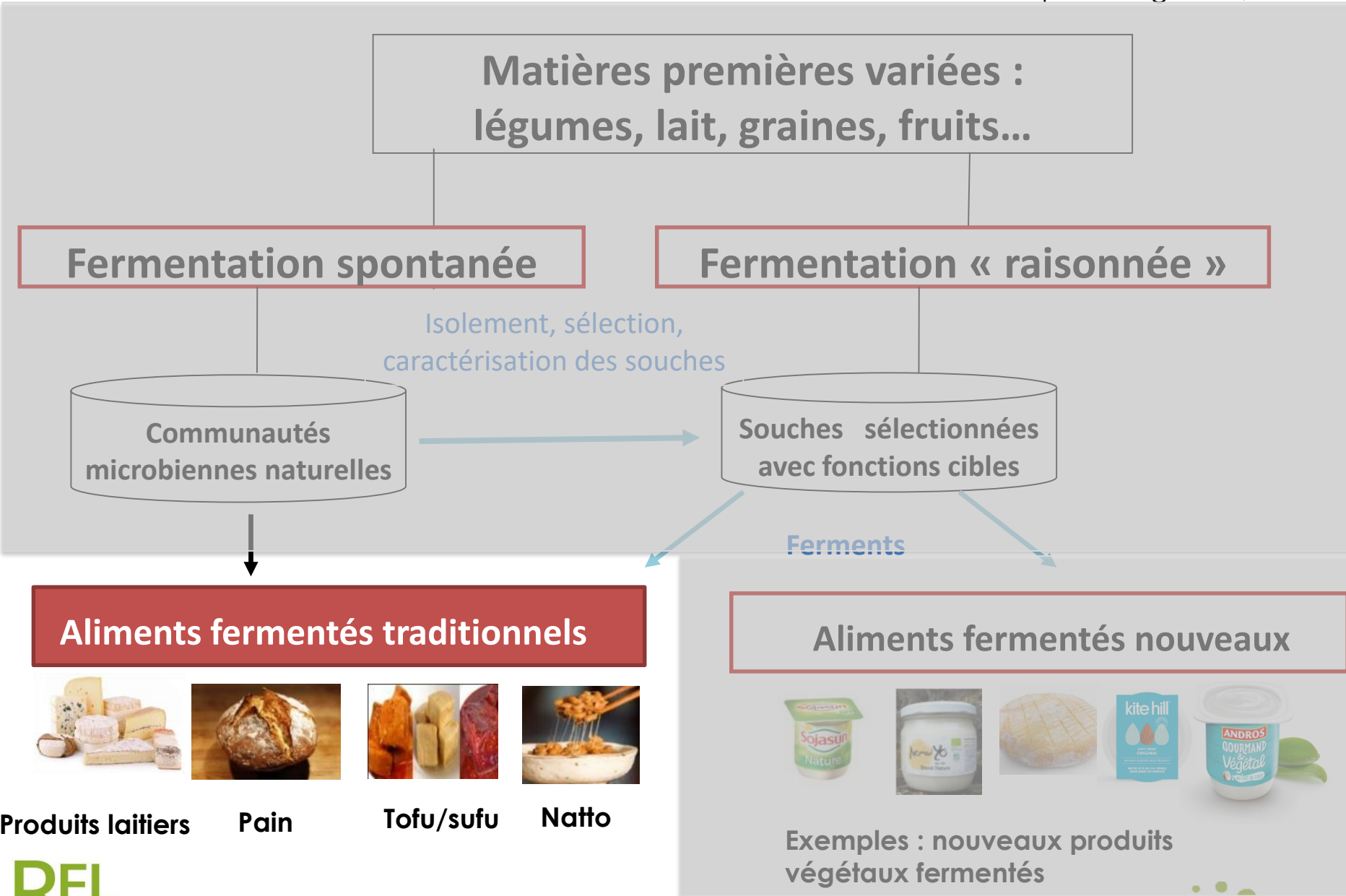
Aliments fermentés nouveaux



Produits laitiers Pain Tofu/sufu Natto

Exemples : nouveaux produits végétaux fermentés





Matières premières variées : légumes, lait, graines, fruits...

Fermentation spontanée

Fermentation « raisonnée »

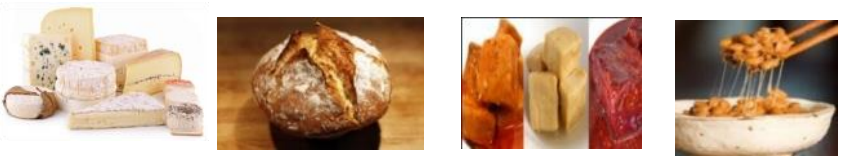
Isolement, sélection, caractérisation des souches

Communautés microbiennes naturelles

Souches sélectionnées avec fonctions cibles

Aliments fermentés traditionnels

Aliments fermentés nouveaux



Produits laitiers

Pain

Tofu/sufu

Natto

Exemples : nouveaux produits végétaux fermentés



Les fermentations des légumineuses

Aliments fermentés traditionnels

≈ 5000 produits fermentés consommés à travers le monde (Tamang *et al.*,2010)

35 produits à base de légumineuses (soja et caroube) (Tamang *et al.*,2016)

identification des espèces présentes (exemples)

Firmicutes

Bacillus licheniformis, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sp*, *Leuconostoc mesenteroides*,

Eucaryotes

Rhizopus oryzae, *Actinomucor elenans*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotricum candidum*, *Candida parapsilosis*

Proteobacteria Actinobacteria

Citrobacter freundii, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus halobius*, *Pediococcus halophilus*, *Staphylococcus saprophyticus*

Diversité et abondance microbienne importante qui s'expliquent par la complexité de la composition de la matière première et le type de procédé utilisé.

9

(Tamang *et al.*,2016)



Les fermentations des légumineuses

Aliments fermentés traditionnels

(Soja)



1. Aliments fermentés avec *Bacillus* spp (*B. subtilis*, *B. licheniformis*)

pH >= 8



Natto



chungkokjang



hawaijar

Fermentation
(25°C à 40°C/3jours à
quelques mois/ aérobic)

B. subtilis ou *B. licheniformis* produisent :

- l'acide γ -polyglutamique (PGA): possède un caractère pseudoplastique fort, lui conférant des propriétés rhéologiques particulières: caractère collant
- Espèces à forte activité protéolytique.

(Tamang *et al.*, 2016a,b; 2015; Shrestha *et al.*, 2013)

Les fermentations des légumineuses

Aliments fermentés traditionnels

(Soja)



2. Aliments fermentés avec des moisissures filamenteuses (*Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*)

pH \geq 8



Miso



Sufu

pH = 5



Tempe

Fermentation
(25°C 3 jours à quelques
mois/aérobie)

Alcalinisation du milieu : protéolyse générée par les moisissures (pH alcalin)

Acidification du milieu dans le tempe: générée par l'action du *Rhizopus oryzae* (production de l'acide lactique et l'acide fumarique)

Diversité des propriétés sensorielles (arome, texture)

(Tamang *et al.*, 2016a,b; 2015; Shrestha *et al.*, 2013; Yin *et al.*, 1997)



Fermentation des légumineuses

α -galactosides (Stachyose) et fermentation

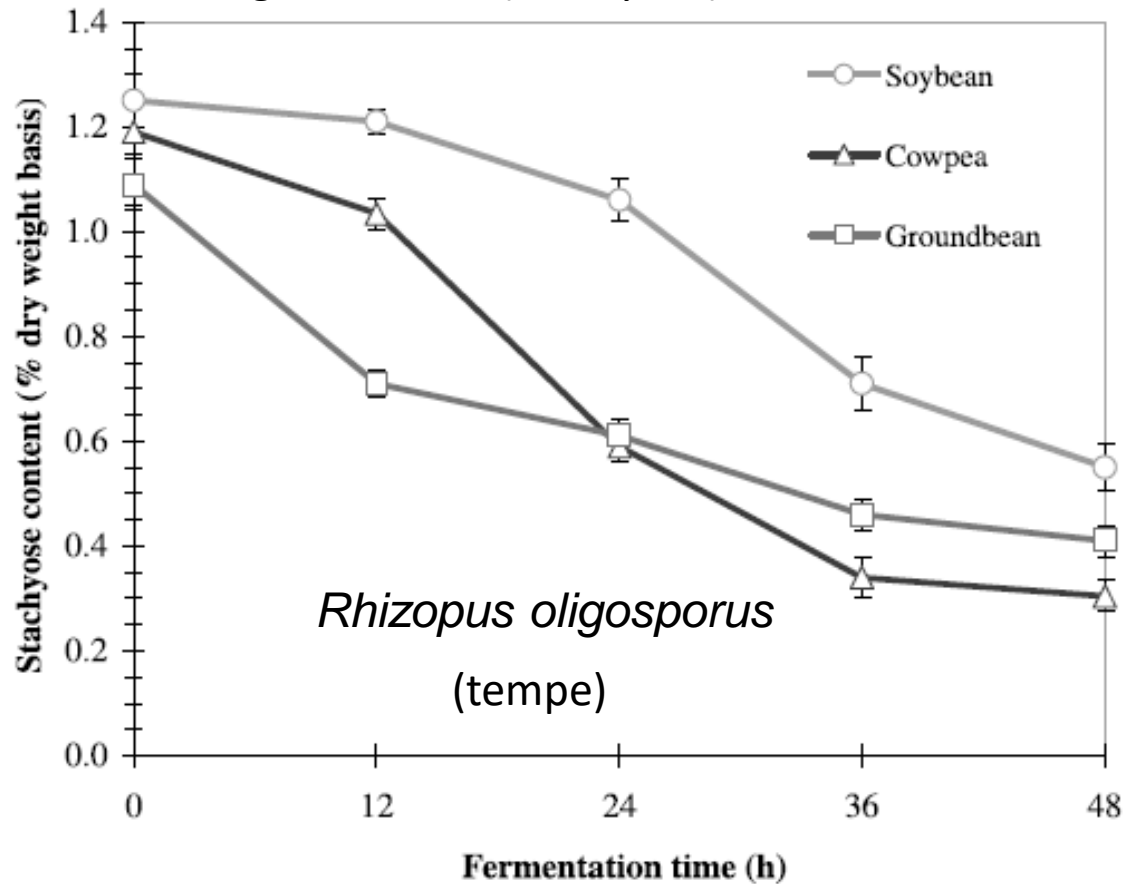
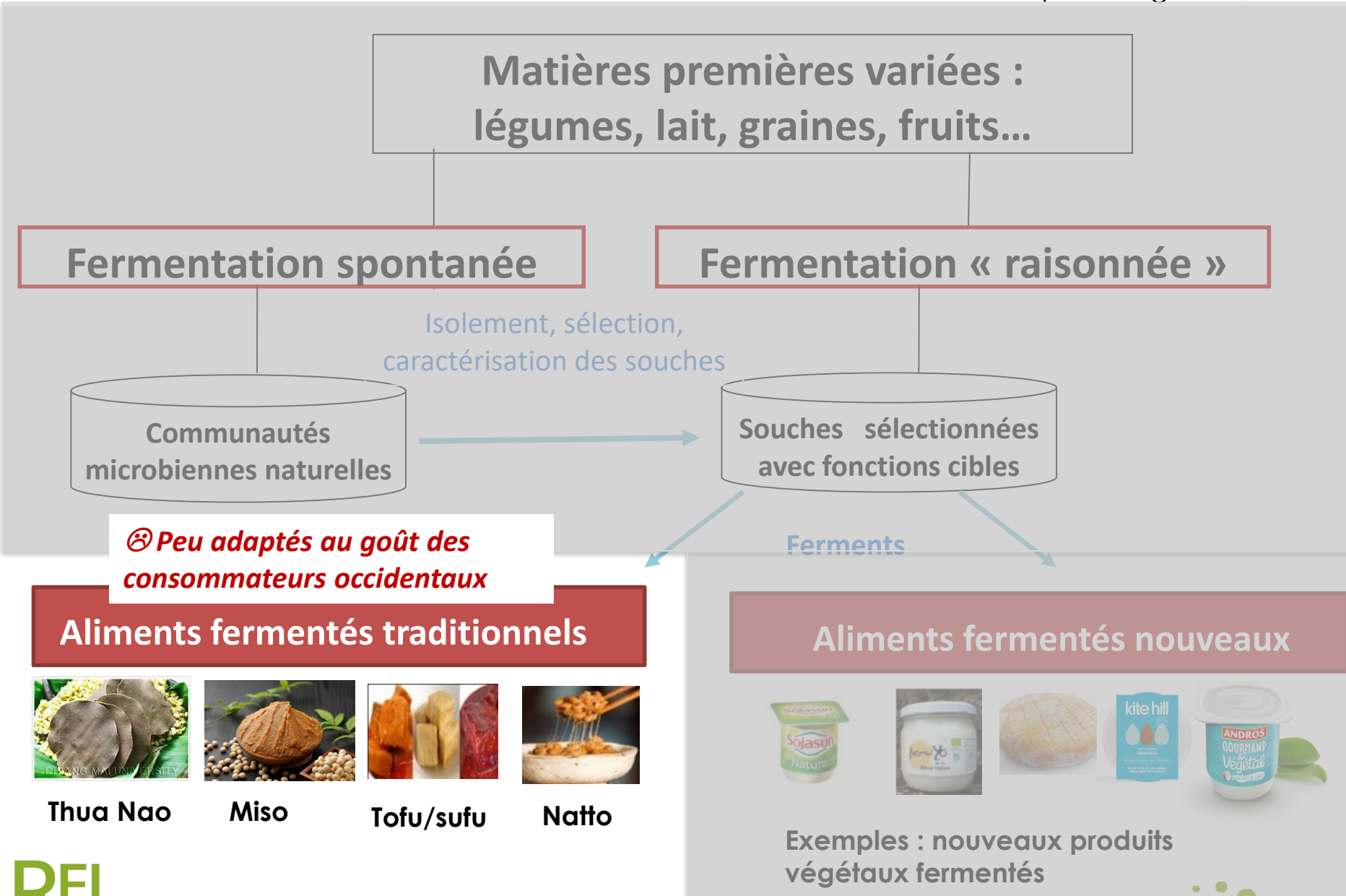


Fig. 2. Changes in stachyose content during fermentation of soybean, cowpea and groundbean with *R. oligosporus*.

Egounlety and Aworh (2003)





Matières premières variées : légumes, lait, graines, fruits...

Fermentation spontanée

Fermentation « raisonnée »

Isolement, sélection, caractérisation des souches

Communautés microbiennes naturelles

Souches sélectionnées avec fonctions cibles

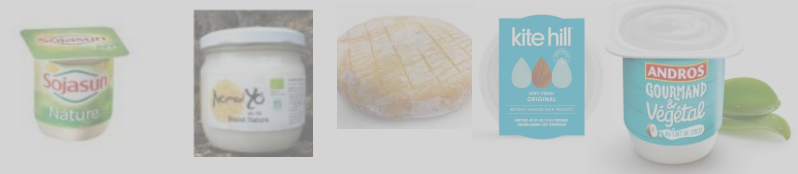
☹️ *Peu adaptés au goût des consommateurs occidentaux*

Aliments fermentés traditionnels



Thua Nao Miso Tofu/sufu Natto

Aliments fermentés nouveaux



Exemples : nouveaux produits végétaux fermentés



Matières premières variées : légumes, lait, graines, fruits...

Fermentation spontanée

Fermentation « raisonnée »

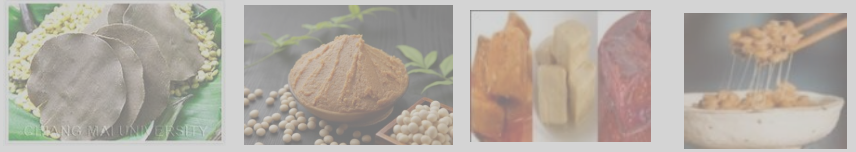
Isolement, sélection, caractérisation des souches

Communautés microbiennes naturelles

Souches sélectionnées avec fonctions cibles

Ferments

Aliments *Peu adaptés au goût des consommateurs occidentaux*



Thua Nao Miso Tofu/sufu Natto

Aliments fermentés nouveaux



Exemples : nouveaux produits végétaux fermentés



Fermentation des légumineuses

Aliments fermentés nouveaux



Soja (3.8%)



Coco
Pois (0.4%)



Soja (4.6%)



Soja (2.5%)



<http://www.petits-veganne.fr/>



...matière premières : pas uniquement des légumineuses / amandes, noix de cajou, soja, pois

Fermentation des légumineuses

Aliments fermentés nouveaux

farines, fractions (MPV)



Farine de féverole +
pois chiche

- digestibilité (*in vitro*) (dégradation des facteurs antitrypsiques)
- propriétés fonctionnelles (capacité d'absorption d'huile et d'eau)

L. bulgaricus et *S. thermophilus*
(30°C/20h)-Anaérobie

(Chandra-Hioe et al., 2016)



Farine de lupin

- Dégradation partielle des facteurs antinutritionnels (acide phytique)
- Germination / fermentation (notes vertes)

L. plantarum
(37°C/48h,
Anaérobie)

(Fritsch et al., 2015)

L. bulgaricus et *S. thermophilus*
(30°C/20h)-Anaérobie

Kaczmarska et al., 2018



Extraits protéiques de pois

Lactobacillus plantarum
Pediococcus pentosaceus
(37°C/48h)-Anaérobie

(Schindler et al., 2012)



Mélanges de poudre de lait/protéines
de pois

Diminution des notes "vertes" indésirables

Streptococcus thermophilus,
Lactobacillus delbrueckii subsp.
bulgaricus, *Lactobacillus helveticus*,
Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus*
delbrueckii subsp. *bulgaricus*,
Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus*
casei subsp. *casei*
(37°C/24h)-Anaérobie

(Youssef et al., 2016)



La fermentation comme levier pour éliminer les défauts organoleptiques des légumineuses (farines / ingrédients)

REVIEW

Flavor Aspects of Pulse Ingredients

Wibke S. U. Roland,¹ Laurice Pourreau,¹ Julianne Curran,² Fred van de Velde,¹ and Peter M. T. de Kok^{1,2}

Cereal Chem. 94(1):58-65

ABSTRACT

Pulses (Fabaceae) have regained interest for their high protein level. However, food application of pulses and pulse ingredients is hampered by several issues around their off-flavor. Off-flavors in pulses are partially inherent and partially produced during harvesting, processing, and storage. Generally, volatile off-flavor compounds in pulses belong to the categories of aldehydes, alcohols, ketones, acids, pyrazines, sulfur compounds, and others, and off-taste is strongly correlated to the presence of saponins, phenolic compounds, and sometimes alkaloids. No systematic studies have been performed on the identification of the off-flavor compounds present in

pulses in relation to their contribution to the overall perception of pulses. This review article aims to provide a concise overview highlighting the most important aspects of the knowledge available on the off-flavor compounds present in various pulses, their possible origins, and the technologies available to prevent, reduce, or mask these off-flavor compounds. Rather than attempting to make a full inventory of the literature in the field, this paper addresses the most relevant topics referring to a selected set of relevant papers on each topic to substantiate the observations and conclusions that may guide the reader toward additional literature.

« beany off flavor », amertume, astringence

« Aromatics characteristics of beans and bean products : uncludes musty/earthy, musty/dusty, sour aromatics, starchy, powdery feel, green pea, nutty, brown »

Composés volatils

- aldehydes
- ketones
- alcohols
- pyrazines
- others

Composés non-volatils

- saponines
- isoflavones
- flavonoids
- phenolic acids
- alkaloids
- oxidized phosphatidylch
- Peptides
- amino acids

Bott et Chambers 2006



Un exemple : « pois » fermentés




Qualiment[®]

Projet VEGALIM :
Bénéfices sensoriels d'aliments fermentés
enrichis en protéines végétales



La fermentation comme levier pour éliminer les défauts organoleptiques des légumineuses (farines / ingrédients)

Projet VEGALIM



Démontrer un concept de formulation d'aliments fermentés enrichis en protéines de pois, présentant des **qualités sensorielles améliorées sur la base de la connaissance des écosystèmes microbiens laitiers**

Pois

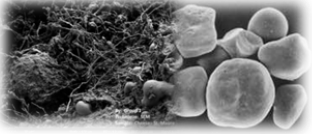
Marché mondial des protéines de pois : ↗ 13.5% /an en volume (Global Market Insights)
Produits alimentaires contenant des protéines de pois : + 80% entre 2013 et 2015 (Mintel's Data)

Mais

Des défauts sensoriels qui limitent leur utilisation ; « beany off-flavour » (note verte / pois)

Stratégie Expérimentale

Gélification



Comment structurer la matrice ?

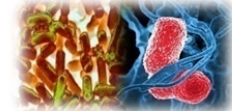
- Solubilité
- Rhéologie
- *Microstructure*

Gel « Type fromage »

Gel végétal
(100% pois)

Gel mixte
(50% pois – 50 % lait)

Formulation microbienne



Quels consortia microbiens ?

Flores « lactiques » / Flores d'affinage

- Potentiel d'adaptation et effet barrière
- Description sensorielle (Arôme)

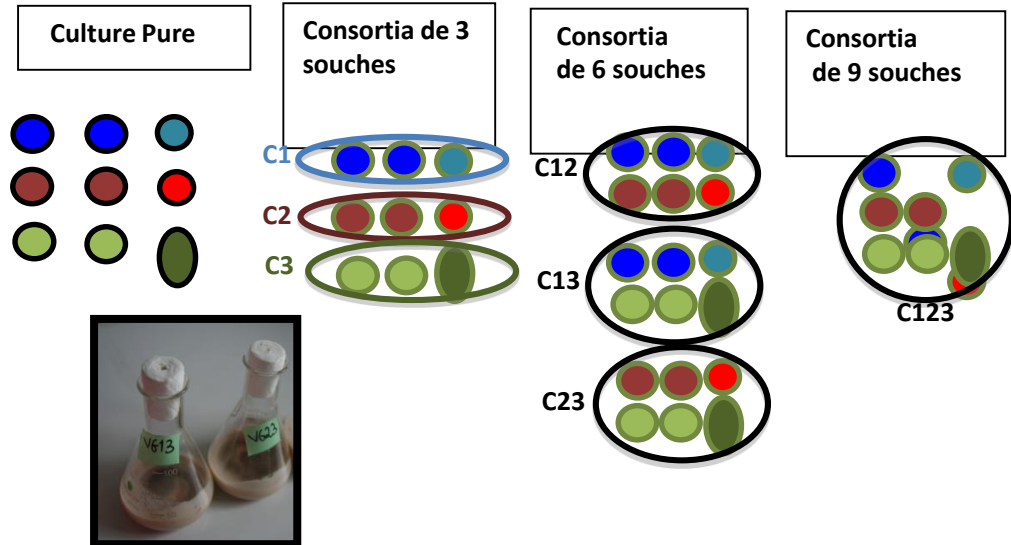
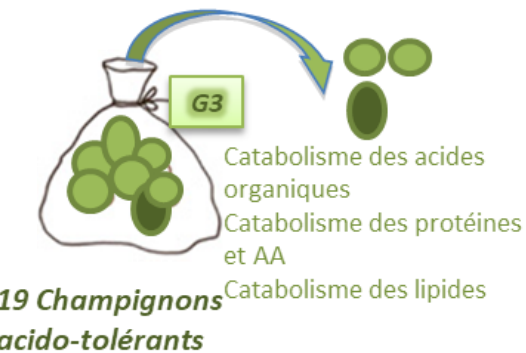
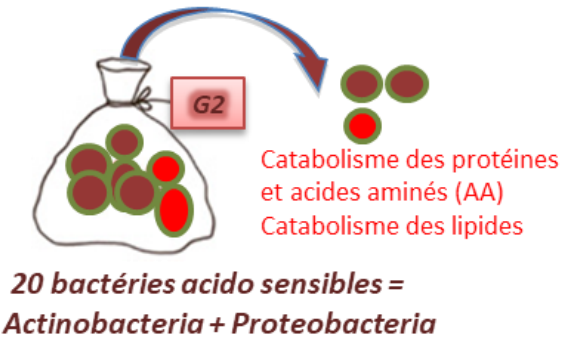
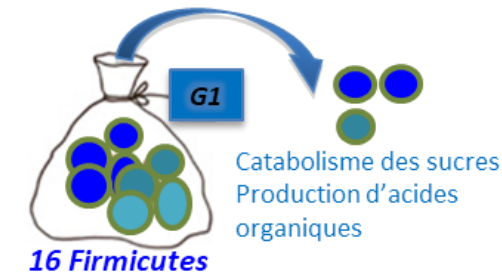
Fermentation des gels

Comment se développent les Consortia microbiens ?
Quelles propriétés sensorielles ?

- Potentiel d'adaptation / croissance
- Description sensorielle (Arôme)
- Identification des marqueurs (GCMS) / LC-MS / GCO-MS

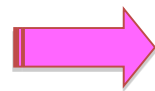
Formulation de consortia microbiens

à partir de 55 souches d'origine animale et végétale



Fermentation durant 3 jours à 28°C: 320 suspensions de protéines de pois et lait

- Description sensorielle (notes aromatiques)
- Mesure de croissance et pH
- Effet barrière contre la flore endogène (métabarcoding)



Sélection de 10 consortia microbiens avec des caractéristiques sensorielles et écologiques

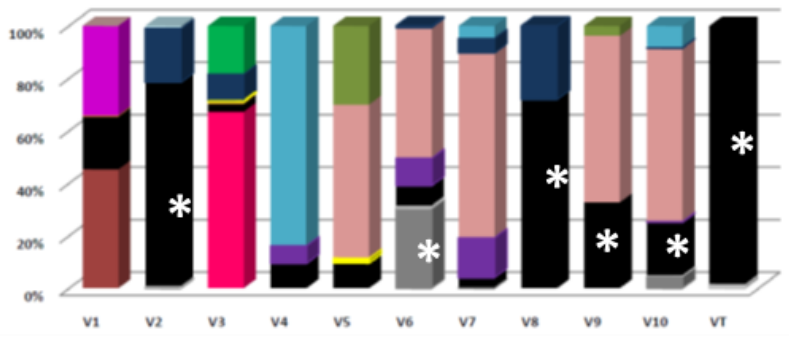


contrôle de la flore endogène de la matière première

Diversité microbienne : métabarcoding

Procaryotes

Log ₁₀ bactériel CFU/g	9,04	8,36	8,31	9,10	9,65	7,56	9,38	8,27	9,09	9,16	7,93
-----------------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

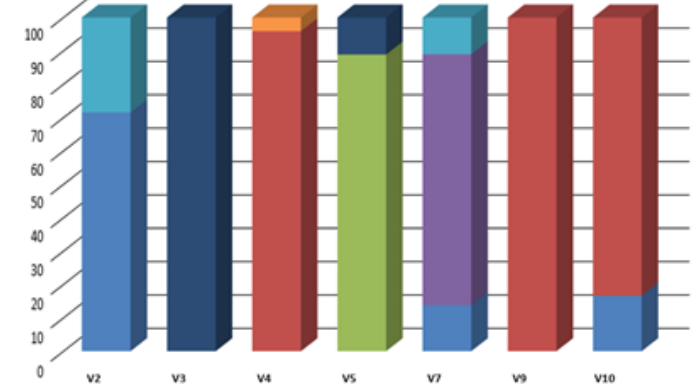


* Flore endogène

- Weissella cibaria
- Leuconostoc lactis
- Corynebacterium group casei
- Bacillus group subtilis*
- Staphylococcus lentus
- Lactobacillus group plantarum
- Brevibacterium casei
- Bacillus group altitudinis
- Staphylococcus group xylosum
- Lactobacillus group casei/rhamnosus
- Brevibacterium antiquum
- Glutamicibacter group arilaitensis
- Psychrobacter celer
- Hafnia group alvei
- Bacillus licheniformis*
- Acinetobacter group johnsonii

Eucaryotes

Total biomass (Log CFU)	6,55	5,00	6,39	4,95	4,96	5,92	6,24
-------------------------	------	------	------	------	------	------	------



- Candida catenulata
- Kluyveromyces marxianus + Yarrowia lipolytica
- Mucor brunneogriseus
- Mucor hiemalis
- Geotrichum candidum
- Kluyveromyces marxianus
- Mucor circineoides

Plus le cocktail microbien est complexe, plus l'effet barrière semble efficace
 Les souches appartenant aux groupes Actinobacteria et Proteobacteria sont peu compétitives vis-à-vis de la flore endogène sauf *Hafnia alvei*
 La grande majorité des eucaryotes testés, en particulier les genres *Mucor* et *Geotrichum* sont capables de s'implanter



Exemple d'une cartographie Sensorielle

Analyse Factorielle de Correspondance

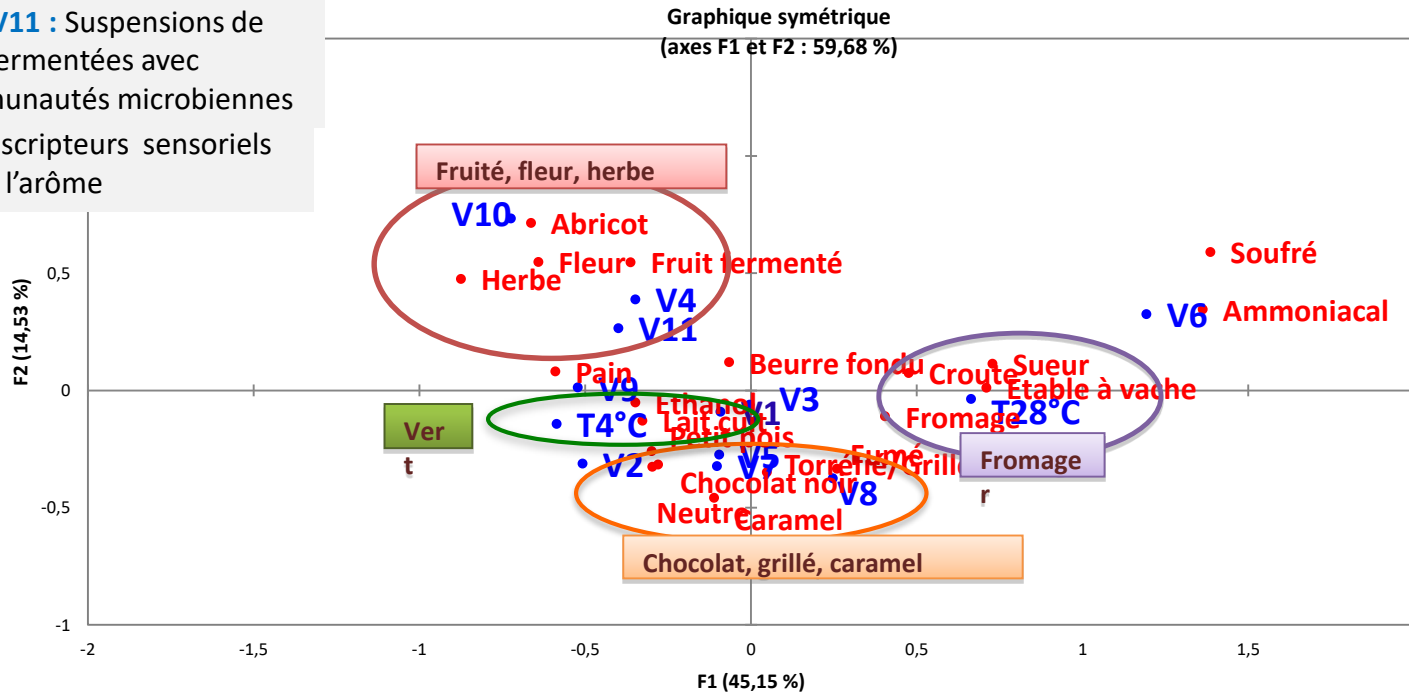
Fréquences des descripteurs sensoriels (CATA)



Gel de pois fermenté

V1 à V11 : Suspensions de pois fermentées avec communautés microbiennes

● Descripteurs sensoriels de l'arôme



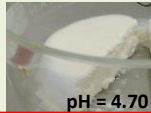
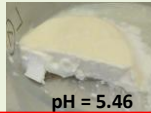
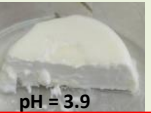
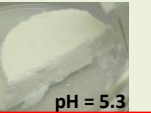

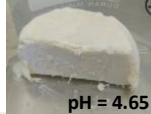
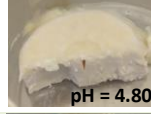
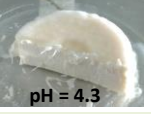
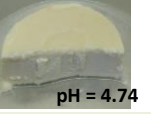

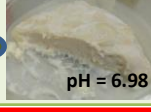
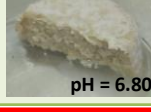
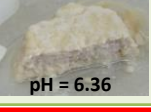
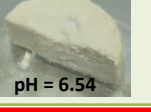
- ✓ Génération de notes diverses (fruits, torréfiées) différentes de celle du témoin (pois)
- ✓ Modulation des défauts d'arômes selon le choix des communautés microbiennes



Fermentation des gels à partir des consortia microbiens sélectionnés

Consortium de référence

↓

	Consortium Fromager	Consortium VEGAN-A	Consortium MEGAN-A	Consortium MEGAN-V
Gel de référence ⇒ Gel LAIT	 pH = 4.70	 pH = 5.46	 pH = 3.9	 pH = 5.3
Gel MIXTE 	 pH = 4.65	 pH = 4.80	 pH = 4.3	 pH = 4.74
Gel Végétal 	 pH = 6.98	 pH = 6.80	 pH = 6.36	 pH = 6.54

Fermentation à 3 et 7 jours (14°C)

- Dénombrement microbien (milieux spécifiques, métabarcoding)
- Mesure de la fermeté des gels (Profil de texture, TaxT2)
- Identification des molécules volatiles par GCMS, Métabolome LC-MS, composés odorants « clé » GC-olfactométrie
- Profils sensoriels odeur (CATA) et arôme et saveur (profil)**



Quelques résultats : Identification des composés odorants « clé »

TR	Compounds	Experimentaldescriptors	% detection
Mixed control			
6,8	2 propanone	roasted/grilled (11/16), fruity (2/16), vegetal (3/16)	84
8,28	butanal,2methyl	vegetal (7/17), not identified(6/17), lactic (4/17),	85
8,49	butanal,3methyl	vegetal (8/17),not identified (5/17), lactic (3/17),	85
9,96	2,3-butanedione	lactic (20/20)	100
14,97	1 pentene 3methyl	vegetal (11/14), roasted/grilled (3/14)	70
16,88	hexanal	vegetal (19/20)	95
Mixed-MEGAN-A			
5,85	acetaldehyde	lactic (10/16), other (3/16), not identified (3/16),	80
8,1	propanal,2methyl	roasted/grilled (11/16), lactic (5/16)	80
8,28	butanal,2methyl	lactic (8/20), roasted/grilled (5/20),fruity (3/20), not identified (4/20),	100
8,49	butanal,3methyl	lactic(6/19),roasted/grilled(5/19),fruity(2/19), not identified (4/19), vegetal (2/19)	95
9,96	2,3-butanedione	lactic (20/20)	100
Mixed-MEGAN-V			
8,1	propanal,2methyl	roasted/grilled (12/16), vegetal (2/16), lactic(2/16)	100
8,3	butanal 2methyl or butanal 3methyl	roasted/grilled (11/14), vegetal (1/14), lactic(1/14), fruity (1/14)	93
9,96	2,3-butanedione	lactic (12/14), fruity (2/14),	93
11,6	2 methylpropanoic acid(ethyl ester)	fruity (14/14)	93
16,2	dimethyldisulfide	fruity (12/12)	80

Gel non fermenté

Gel fermenté MEGAN-A

Gel fermenté MEGAN-V

Zones odorantes « grillées »

Zones odorantes «vertes »

Zones odorantes «lactées »

Zones odorantes «fruitées »

Impact de la Fermentation

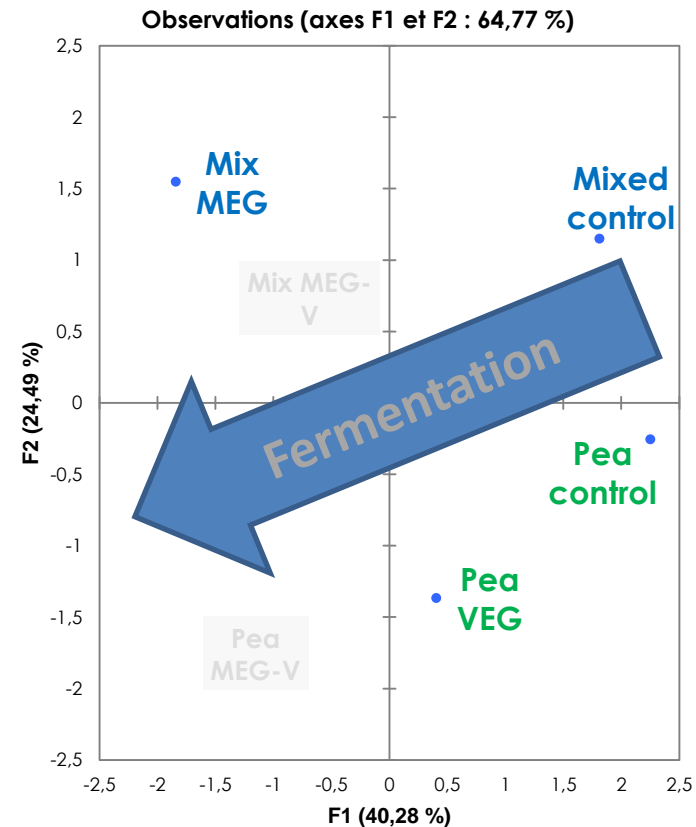
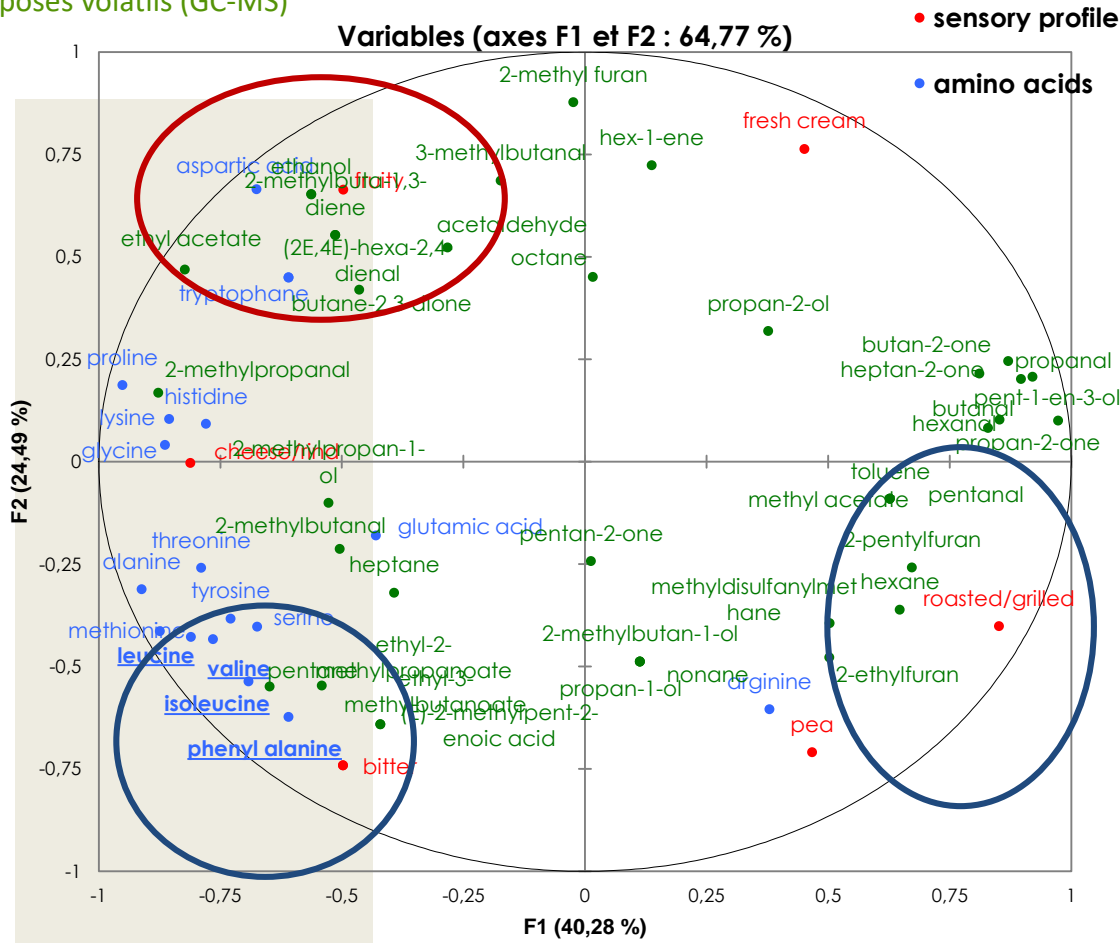
Disparition des notes vertes
Apparition de notes lactées

Disparition des notes vertes
Apparition de notes fruitées



Analyse Factorielle Multiple : liens entre le profil sensoriel, composition en acides aminés et molécules volatiles des gels fermentés (à 3 jours de fermentation)

Descripteurs sensoriels (profil)
 Métabolome AA (LCMS)
 Composés volatils (GC-MS)



38

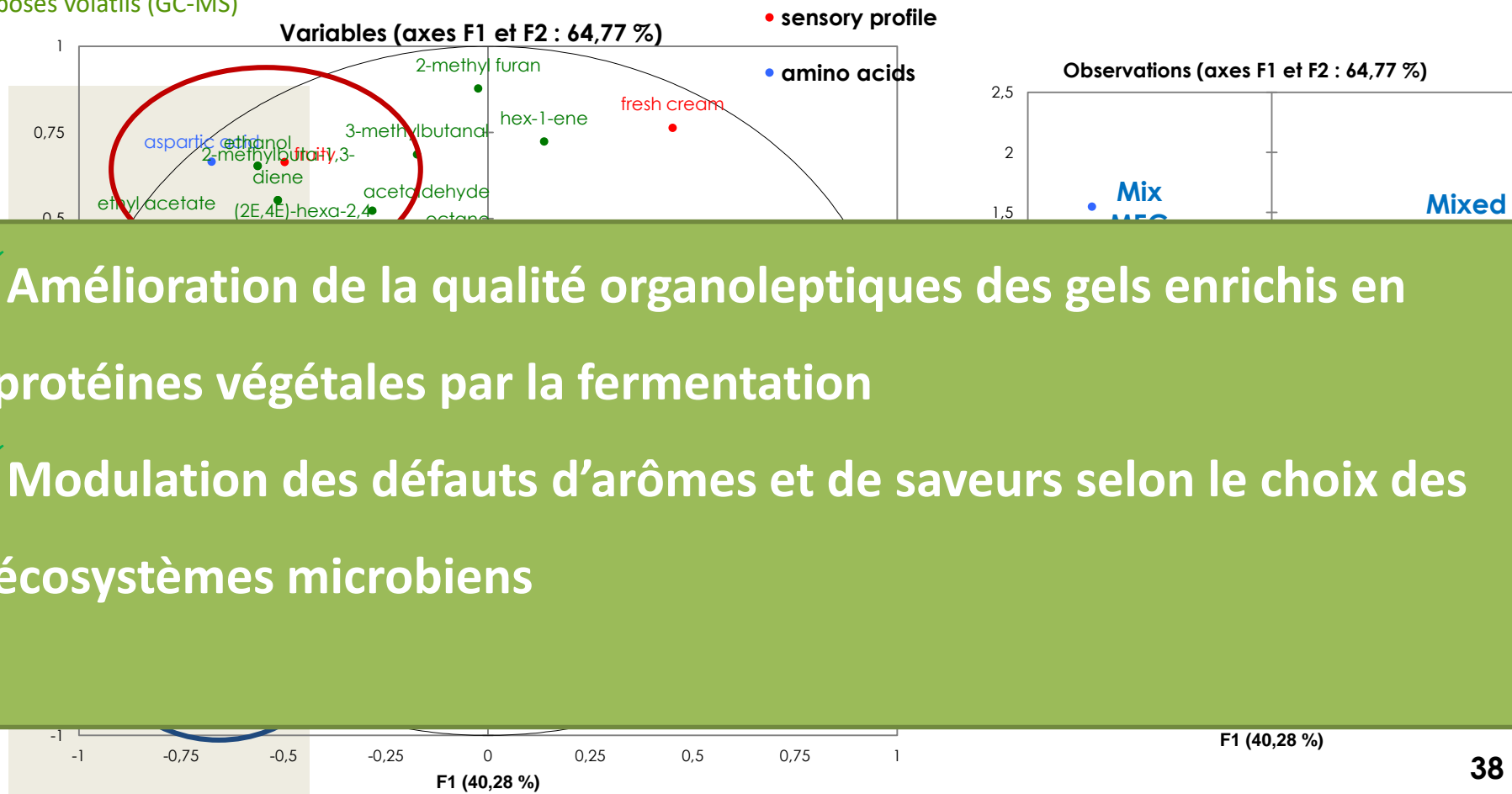


Analyse Factorielle Multiple : liens entre le profil sensoriel, composition en acides aminés et molécules volatiles des gels fermentés (à 3 jours de fermentation)

Descripteurs sensoriels (profil)

Métabolome AA (LCMS)

Composés volatils (GC-MS)



- ✓ Amélioration de la qualité organoleptiques des gels enrichis en protéines végétales par la fermentation
- ✓ Modulation des défauts d'arômes et de saveurs selon le choix des écosystèmes microbiens



Conclusion

- **Nombreux bénéfices de l'usage des micro-organismes pour bio-préserver, transformer, fonctionnaliser les légumineuses**
- **Revisiter les procédés de fractionnement via l'utilisation de communautés microbiennes**
- **Vers de Nouveaux Produits « inspirés » de procédés traditionnels**
 - Assemblage de communautés microbiennes pour des fonctions cibles
 - Besoin de mieux cibler les attentes consommateurs et de l'ensemble des acteurs de la filière
 - Exploration plus large possible du périmètre d'innovation en terme de texture et goût (arômes et saveurs),
- **Aliments fermentés & bénéfiques santé : besoin de recherche**





AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY OF LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

INRA
SCIENCE & IMPACT

université
PARIS-SACLAY

Merci pour votre attention !

INSTITUT
CARNOT
QUALIMENT

Qualiment

<https://www6.versailles-grignon.inra.fr/gmpa/>

