
Les levains de panification : Microbiote et Fonctionnalités

Emilie LHOMME, Xavier DOUSSET ^{1,2} & Bernard ONNO¹

¹ Oniris, Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle, UMR GEPEA CNRS 6144, Rue de la Géraudière CS 82225, 44322 Nantes Cedex 3, France

² SECALIM UMR1014, Oniris, INRA, Université BretagneLoire, Nantes, France. UMR INRA 1014 Secalim, La Chantrerie CS, 40307 Nantes Cedex 3, France

Mots clés : levain, microbiologie, bactéries lactiques, levures, fonctionnalités, panification

Correspondant : Bernard ONNO, bernard.onno@oniris-nantes.fr

Résumé : Les levains de panification sont l'objet d'un intérêt croissant en termes de recherche et d'application, en raison de la diversité du microbiote levain et des fonctionnalités associées à l'usage de levains. L'objet de ce document est de faire un état des lieux des connaissances scientifiques sur ces deux aspects. Il est issu de la revue bibliographique de la Thèse d'Emilie Lhomme, thèse soutenue en mars 2015. Après une première partie générale sur les levains en panification, les données récentes sur la diversité de cet écosystème microbien complexe que constitue le levain sont présentées, puis les différentes fonctionnalités des levains sur le plan sensoriel, biopréservation et nutrition, sont décrites. Enfin, l'influence des conditions de mise en œuvre des levains sur leurs propriétés sont explorées.

Titre abrégé : Microbiologie et Fonctionnalités des Levains

Biographie :

- Emilie Lhomme, Docteur Oniris & Université Nantes Angers Le Mans, Description et caractérisation de la diversité bactérienne des levains de panification français, par approche moléculaire (2015).
- Xavier DOUSSET, Enseignant Chercheur au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle – Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique) et UMR 1014 INRA Secalim
- Bernard ONNO, Enseignant Chercheur au Laboratoire de Microbiologie Alimentaire et Industrielle – Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique). Thème de recherche : Les Ecosystèmes Céréaliers Fermentés.

Table des matières

1 - Le pain au levain	3
1.1 - Histoire et définition du levain et du pain au levain	3
1.2 - La consommation du pain	4
1.3 - Le pain au levain et l'agriculture biologique	5
1.4 - Les céréales utilisées en panification	7
1.42 - Les autres céréales panifiables	10
1.43 - Les céréales sans gluten	12
1.5 - Fabrication d'un pain au levain	13
2 - Le levain, un écosystème microbien complexe	18
2.1 - Taxonomie et physiologie des levures des levains de panification	19
2.2 Les bactéries lactiques des levains de panification : taxonomie, biodiversité et rôle	23
2.21 - Le genre Lactobacillus	26
2.22 - Les autres genres de bactéries lactiques retrouvées dans les levains de panification	27
2.23 - Métabolisme des bactéries lactiques issues des levains de panification	28
3 - Fonctionnalités des bactéries lactiques dans le levain de panification	31
3.1 La protéolyse du gluten, un moyen de réduire la teneur en gluten des produits de panification	31
3.2 Impact des bactéries lactiques sur la flaveur du pain au levain	33
3.3 Impact des bactéries lactiques sur la texture du pain au levain	34
3.4 Impact des bactéries lactiques sur la durée de vie du pain au levain	36
3.5 Impact des bactéries lactiques sur les apports nutritionnels du pain au levain	38
4 - Elaboration du levain : mise en place de la flore bactérienne	41
4.1 - Dynamique microbienne : de la farine au levain mature	41
4.2 - Influence des paramètres technologiques sur la mise en place du microbiote du levain	43
4.3 - Facteurs influençant la stabilité d'un levain traditionnel	47
4.31 - Adaptation aux conditions de stress pendant le stockage du levain	47
4.32 - Interactions nutritionnelles entre les micro-organismes	49
4.33 - Stabilité intrinsèque des micro-organismes du levain et diversité intraspécifique	50
4.34 - Interactions antagonistes entre les micro-organismes du levain	51
4.35 - Stabilité de l'environnement boulanger	51
Références bibliographiques	53

1 - Le pain au levain

1.1 - Histoire et définition du levain et du pain au levain

Le pain est sans doute l'un des produits alimentaires pour lequel la charge symbolique est la plus forte. Il est intimement associé aux religions et aux traditions ainsi qu'à l'Histoire. Pour les Chrétiens, Jésus-Christ se définit lui-même comme « pain de vie » (Jean 6:35), les Juifs utilisent du pain azyme (*masta*) pour célébrer la Pâques et commémorer la fuite d'Égypte. Pendant la Révolution française, le peuple affamé va chercher le « Boulanger » (Louis XVI), la « Boulangère » (Marie-Antoinette) et le « Petit Mitron » (le Dauphin). Aujourd'hui encore, le slogan « du pain, de l'éducation et de la liberté » a été scandé lors des manifestations protestataires qui ont eu lieu lors de la crise de la dette en Grèce. Enfin, l'importance du pain en tant que symbole et valeur est également démontrée par les différentes expressions utilisées telles que « gagner son pain », « pour une bouchée de pain » ou encore « avoir du pain sur la planche » (Calvel, 1964; De Tonnac, 2010; Roussel and Chiron, 2005).

L'histoire du pain est étroitement attachée au développement et à l'Histoire de la civilisation humaine, des débuts de l'agriculture jusqu'à nos jours. Une des premières traces de fabrication de pain au levain remonte à l'Égypte ancienne (- 3000 avant JC). Les Égyptiens pétrissaient le grain de blé écrasé au mortier avec de l'eau du Nil, riche en limons et ferments naturels. La pâte reposait quelques heures, fermentait naturellement et était cuite dans des moules préalablement chauffés par le feu, permettant ainsi d'obtenir les premiers pains au levain. La légende évoque même une pâte naturellementensemencée par les larmes d'Osiris, faisant référence à la pluie qui aurait hydraté de la farine et provoqué sa levée naturelle (De Tonnac, 2010; Onno and Roussel, 1994).

Le levain est longtemps resté le seul moyen de faire lever la pâte à pain, associé ou non, à l'utilisation de mousse de bière (cervoise), puis de levure de bière. A la fin du XIX^{ème} siècle, la mise au point de procédés de production de biomasse a permis l'introduction et la généralisation de la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, comme agent levant. L'utilisation de la levure de boulanger permet de réduire les temps de fermentation et prend peu à peu la place du levain dans la fabrication des pains français. Son succès est tel, qu'en 1964, Raymond Calvel, ambassadeur exceptionnel du pain français à l'étranger, écrit que « la fabrication de pain au levain n'existe

plus ». Cependant, dans les années 1980, le pain au levain connaît un regain de popularité grâce aux consommateurs toujours à la recherche de l'authenticité et du goût du pain (Calvel, 1980).

Depuis les années 1990, les cultures starters permettent de réduire le temps de fermentation des pains au levain et facilitent ainsi la réintroduction du levain dans le procédé de panification. Ces cultures starters sont des préparations permettant d'améliorer le commencement des fermentations car elles sont composées de bactéries lactiques et de levures sélectionnées. Enfin, en ce qui concerne la France, le décret N°93-1074 de 1993 définit précisément ce que sont le levain et le pain au levain. Selon l'article 4 de ce décret, « 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 microflore 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% par rapport au poids de farine mise en œuvre à ce stade. »

L'article 3 de ce même décret déclare que « peuvent seuls être mis en vente ou vendus sous une dénomination comportant la mention complémentaire "au levain" les pains (...) présentant un potentiel hydrogène (pH) maximal de 4,3 et une teneur en acide acétique endogène de la mie d'au moins 900 µg/g ». Cependant, toujours pour la France, le Syndicat national des Fabricants de Produits intermédiaires pour boulangerie, pâtisserie et biscuiterie (SYFAB) travaille sur une nouvelle définition du levain, et du pain au levain, plus proche de la réalité (Cappelle et al., 2013; Roussel and Chiron, 2005).

1.2 - La consommation du pain

Depuis des millénaires, le pain est l'aliment de base de nombreuses civilisations à travers le monde. Bien que les caractéristiques des pains du monde varient considérablement d'une région à l'autre, ils partagent une procédure de préparation semblable : un mélange de farine et d'eau pour former une pâte fermentée puis finalement cuite pour obtenir le pain. C'est en Europe et en Amérique que la consommation de pain est la plus importante. Durant ces dernières années le marché du pain a fortement évolué : longtemps, il a consisté en la production d'une faible variété de produits, le pain blanc et le pain de seigle étant les plus populaires en Europe du Sud et en Europe du Nord et Centrale, respectivement. Aujourd'hui, les boulangers et l'industrie meunière ont développé de nouveaux produits tels que des pains revendiquant une image santé comme les

pains complets ou les pains multi-graines. Le succès des pains aux graines, des pains issus de l'agriculture biologique ou encore des pains additionnés d'oméga-3 pour améliorer la santé du consommateur démontre le pouvoir d'innovation dans ce marché pourtant traditionnel.

En Europe, le marché du pain représente 32 millions de tonnes de produits. Ce marché se divise équitablement entre les boulangers industriels et les artisans-boulangers bien que cette répartition soit différente selon les pays. Par exemple, le marché des pains industriels représente 80% de la production en Grande-Bretagne, 40% en Allemagne, 35% en France et 19% en Espagne. En Europe, la consommation du pain varie également selon les pays, mais en moyenne 50 kg de pain sont consommés par an et par personne (Bakers federation of UK, 2013)

Aujourd'hui, 98% des Français consomment du pain, cependant cette consommation a connu une forte diminution au cours du XX^{ème} siècle. En effet, en 1990, la consommation moyenne par habitant et par jour était de l'ordre de 900 g contre seulement 129,5g en 2010. Aujourd'hui les baguettes de pain représentent 56% de la consommation du pain en France contre 31% pour les pains spéciaux dont 5% pour les pains au levain (Observatoire du pain, 2011).

Dans les pays Européens, 30 à 50% de la production de pains incluent l'utilisation de levain que ce soit pour une fabrication au levain seul ou des fermentations mixtes levain et levures. Le levain traditionnel comme agent levant est plutôt utilisé dans les petites et moyennes boulangeries spécialisées, par exemple pour la production de *Panettone* (en Italie) ou de *Pumpernickel* (en Allemagne). L'utilisation de levain permet également d'obtenir des produits dits « *clean label* » en contribuant à la diminution, voire à la suppression, de nombreux additifs utilisés pour améliorer la qualité et la durée de vie du pain. Dans l'agriculture biologique, le pain occupe une place importante. La majorité des pains dits bios actuels utilisent la panification au levain naturel.

1.3 - Le pain au levain, une place spéciale en agriculture biologique

L'agriculture biologique se définit comme « un système de production qui maintient et améliore la santé des sols, des écosystèmes et des personnes. Elle s'appuie sur des processus écologiques, sur la biodiversité et sur des cycles adaptés aux conditions locales, plutôt que sur l'utilisation d'intrants ayant des effets néfastes. L'agriculture biologique allie la tradition, l'innovation et la science au bénéfice de l'environnement commun et promeut des relations justes et une bonne qualité de vie pour tous ceux qui y sont impliqués. » Cette définition a été proposée par la Fédération internationale des mouvements d'agriculture biologique (IFOAM, *International*

Federation of Organic Agriculture Movements). Cette association, comprenant plus de 108 pays membres, a pour but de soutenir et fédérer l'agriculture biologique à l'échelle mondiale.

L'agriculture biologique se caractérise notamment par le fait que l'épithète « biologique », ou son abréviation « bio », impliquent une certification. En effet, l'agriculture biologique est soumise à une réglementation spécifique européenne applicable par tous les Etats membres *via* le Règlement (CE) n° 834/2007 du Conseil du 28 juin 2007 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques et abrogeant le règlement (CEE) n° 2092/91. Les opérateurs de la filière bio sont contrôlés par des organismes certificateurs agréés. Pour atteindre les objectifs du label, les agriculteurs biologiques doivent respecter des cahiers des charges et des normes qui excluent notamment l'usage d'engrais minéraux chimiques de synthèse et de pesticides de synthèse, ainsi que des organismes génétiquement modifiés (OGM).

Au début des années 2000, le marché des aliments et autres produits biologiques ne cesse de croître atteignant 63 milliards de dollars US dans le monde en 2012. La demande pour des produits bios est principalement localisée en Amérique du Nord et en Europe, ces deux régions concentrent plus de 90% des ventes de produits bios (Willer and Kilcher, 2013).

Fin 2012, l'Union Européenne comprenait 11,2 millions d'hectares de terres agricoles utilisées dans un cadre bio, représentant 5,4 % des terres agricoles cultivées. Comparé à 2003, le nombre d'hectares consacré à l'agriculture biologique a augmenté de 75%. En 2012, le marché des produits bios représentait 20,9 milliards d'euros, l'Allemagne étant le plus grand marché européen avec 7,04 milliards d'euros. La France se place en seconde position avec 4,0 milliards d'euros (Willer and Kilcher, 2013). Une étude de la Commission Européenne, portant sur l'analyse de 45 000 réponses, rapporte que les consommateurs européens achètent des produits bios principalement pour limiter leur impact sur l'environnement (83%) et parce qu'ils sont sans résidus de pesticides et sans OGM (81%). De plus, 78% des sondés indiquent qu'ils sont prêts à payer plus cher pour un produit bio (Schaack et al., 2014). La France représente 18% du marché européen. Un rapport de l'Agence Française pour le Développement et la Promotion de l'Agriculture Biologique (Rapport Agence Bio, 2010) indique que deux tiers des Français ont consommé des produits bios en 2012. Cette étude rapporte également que la consommation de produits bios à domicile est estimée à 2,5 % du marché alimentaire total. Cependant, ce rapport indique que la part du marché bio est plus ou moins importante selon les secteurs. En valeur, elle de l'ordre de 15% s'agissant des œufs, de 11% pour le lait et de 8% pour le pain et la farine.

Dans l'agriculture biologique, le pain occupe une place primordiale. Les filières de fabrication sont diverses allant d'une filière longue (production plutôt industrielle et vente en supermarchés) à une filière très courte représentée par des paysans-boulangers qui fabriquent leurs pains à la ferme et les distribuent eux-mêmes. La majorité des pains bios actuels utilisent la panification au levain naturel.

1.4 - Les céréales utilisées en panification

1.41 - La farine de blé

En Europe, c'est la farine de blé qui est la plus utilisée pour fabriquer le pain. On distingue deux espèces : *Triticum aestivum*, « le blé tendre » et *Triticum durum*, « le blé dur ». L'amande (albumen) du blé tendre est relativement friable et lui donne une bonne aptitude à être transformée en farine (particules de taille inférieure à 200 µm). Quant au blé dur, son amande dure le rend apte à donner des semoules (grain compris entre 300 et 900 µm) pendant la mouture (broyage des grains de blé pour obtenir de la farine). Une utilisation en panification est également possible pour ce type de blé, bien que la farine soit plus grossière et plus ronde. L'espèce *T. durum* est plutôt utilisé dans les pays méditerranéens pour des standards de pain différents (Roussel and Chiron, 2005).

L'examen du grain de blé permet de mieux comprendre la technique de transformation du blé en farine, mais aussi de bien situer la répartition des différents éléments nutritionnels et leur devenir lors des opérations de mouture de la céréale en farine et de tamisage de la farine. Le grain de blé comporte trois parties distinctes (Figure 1). Le germe, qui représente environ 3% du grain de blé, contient une proportion élevée de lipides, de protéines, de vitamines et d'éléments minéraux ainsi que de fortes activités enzymatiques. Cette partie est éliminée dans les farines courantes raffinées et se retrouve dans les sons et les farines semi-complètes (bises) ou complètes.

- Les enveloppes (13 à 15 % du grain) sont constituées du péricarpe (4 %) et du tégument séminal (2 %) riches en cellulose et éléments minéraux, ainsi que de l'assise protéique (7 à 9 %) riches en protéines, en lipides, en vitamines et en composés minéraux. Ces différentes couches sont bien soudées entre elles et représentent une membrane souple et difficile à briser. Ces enveloppes sont, elles aussi, faiblement incorporées dans les farines blanches et se retrouvent aussi dans les sons.

- L'amande (ou albumen amylicé) représente 82 à 85% du grain. Elle est constituée de glucides (principalement d'amidon), de protéines (10 à 12%) et d'éléments minéraux en faibles

proportions (0,3 à 0,6 %). Cette partie du grain est la plus utilisée pour fabriquer les pains courants.

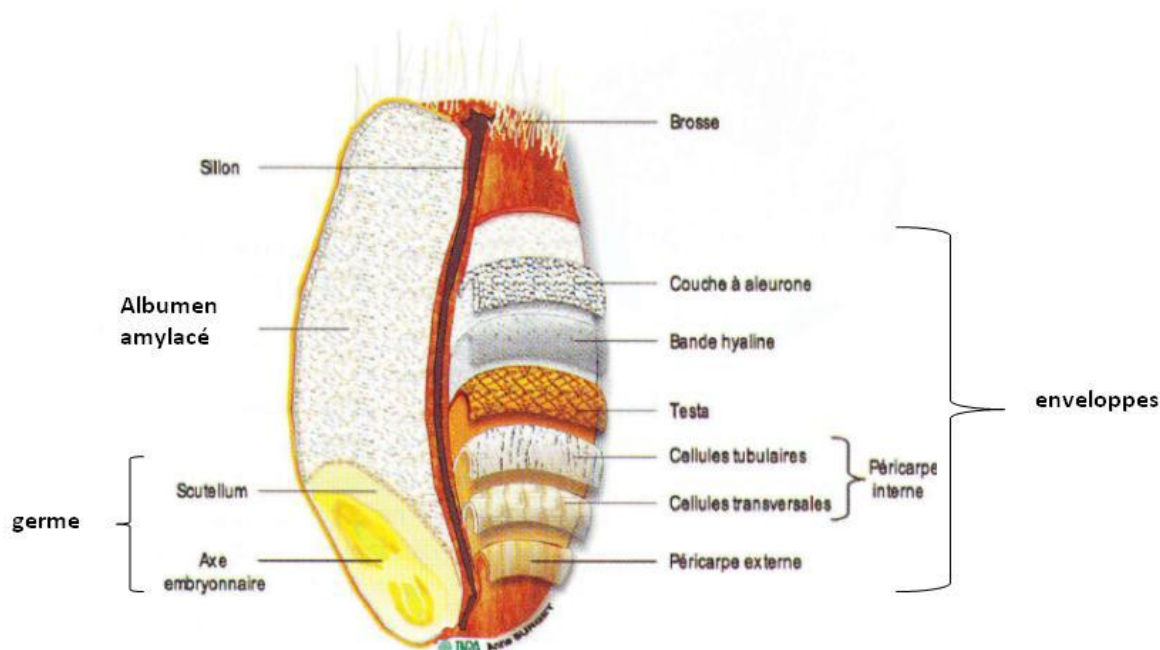


Figure 1 : Schéma d'un grain de blé en coupe d'après Surget and Barron (2005)

Le type de farine est défini à partir de son taux de cendres (masse sèche ou teneur minérale) obtenu après incinération (Tableau 1). Plus la quantité de cendres est faible et plus la farine est raffinée et blanche, puisque les minéraux sont principalement contenus dans les couches externes. Ainsi la farine la plus couramment utilisée est la farine blanche de type 55 qui contient 0,5 à 0,6% de matières minérales. Pour la fabrication de pains « bios », ce sont les farines T65 et T80 qui sont le plus souvent panifiées (Coulombel, 2008). Le son et les germes peuvent être réincorporés à la farine pour donner des farines semi-complètes (type 80), complète (type 110) ou intégrale (type 150).

Tableau 1 : Classification des farines françaises (Roussel and Chiron, 2005)

Type de farine	Teneur en cendres (% ramené à la matière sèche)	Dénomination des farines
45	< 0,5 %	Blanches
55	0,5 à 0,6 %	
65	0,62 à 0,75 %	
80	0,75 à 0,90 %	Bises
110	1,00 à 1,20 %	
150	> 1,40 %	Complètes

La valeur boulangère résultant de la norme NF V03-716 met en relation principalement la quantité et la qualité des protéines avec la variété de blé utilisée afin d'appréhender les principales caractéristiques qualitatives d'une variété ou d'un mélange de variétés de blé. La force boulangère (W) est étroitement liée à la teneur en protéines ; elle correspond au travail de déformation de la pâte. Ainsi, en panification cette force boulangère doit être élevée puisqu'elle est liée à l'extensibilité, à l'élasticité et à la tenue de la pâte.

Les protéines de la farine de blé sont multiples et complexes (Figure 2). Certaines d'entre elles, insolubles dans l'eau (gliadines et gluténines) s'associent en milieu hydraté pour former le gluten. Ces protéines, formant le réseau de gluten, apportent à la pâte différentes propriétés rhéologiques telles que la viscosité, l'extensibilité, l'élasticité et la cohésion. Ce réseau de gluten et sa qualité sont responsables de la rétention gazeuse de la pâte et permettent ainsi d'obtenir un pain alvéolé et moelleux. Cette spécificité des protéines de blé lui donne le qualificatif de panifiable, c'est-à-dire apte à produire des pains à structure alvéolaire aérée. Cette propriété différencie le blé des principales autres céréales.

Traditionnellement, les protéines sont classées selon leurs caractéristiques de solubilité dans l'eau. Les protéines de blé sont divisées :

- Les albumines (5 à 10% des protéines totales de blé) sont globulaires et solubles dans l'eau. Elles sont principalement localisées dans la périphérie du grain et dans le germe.
- Les globulines (5 à 10% des protéines totales du blé) sont globulaires et solubles dans les solutions salines diluées. Elles se concentrent dans les parties périphériques de la graine.
- Les gliadines (40 à 50% des protéines totales du blé) sont solubles dans l'alcool. Elles sont principalement localisées dans l'albumen et l'endosperme du blé. On les retrouve dans le gluten, lui apportant ses propriétés d'extensibilité.
- Les gluténines (30 à 40% des protéines totales du blé) sont solubles dans les solutions acides. On les détecte également dans l'albumen du grain. Elles confèrent au gluten ses propriétés d'élasticité, sa cohésion et sa résistance aux déformations.

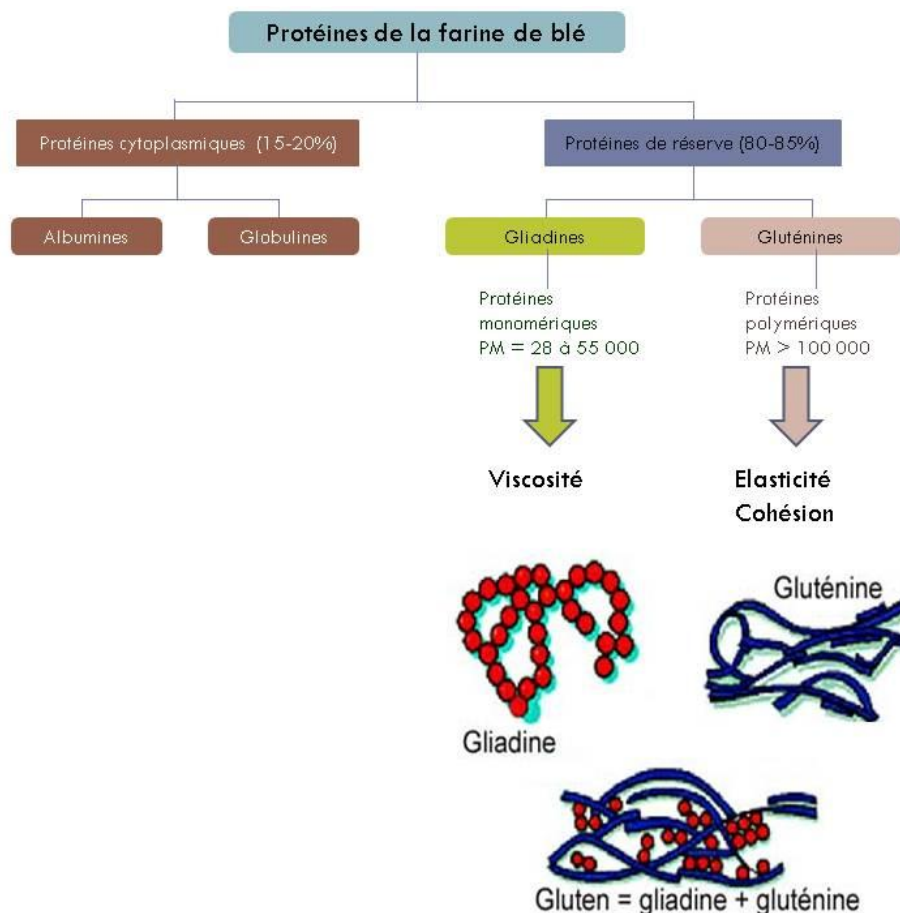


Figure 2 : Familles de protéines de blé et leurs rôles (Gänzle et al., 2008)

Les blés issus de l'agriculture biologique (blés bios) sont caractérisés par des teneurs en protéines plus faibles et variables. Ceci s'explique par l'absence de fertilisation minérale et un recours limité à une fertilisation organique. Or, pour que le blé bio puisse répondre au besoin de la panification, en particulier à la levure, il doit avoir des teneurs en protéines proches de celles des blés conventionnels. Cependant, il est possible d'obtenir des pains semblables à ceux fabriqués à partir de blé conventionnel, en choisissant une bonne variété ou un mélange de variétés de blé bio (Coulombel, 2008). Un des intérêts potentiels de la panification au levain est de valoriser des blés à plus faible valeur boulangère et qui, grâce à une fermentation longue, permettront d'obtenir des pains à densité satisfaisante.

1.42 - Les autres céréales panifiables

La famille botanique des céréales est la famille des *graminées* ou *poacées* regroupant le blé, le riz, l'orge, l'avoine, le maïs, le millet et le sorgho. Le sarrasin (appartenant à la famille des

polygonacées) ou encore les *Chénopodiacées* regroupant le quinoa ou l'amarante ne sont pas des céréales *stricto sensu*, d'où leur nom de pseudo-céréales.

Les céréales, au sens large, sont définies comme des graines amylacées (riches en amidon) pouvant être transformées en farine et semoule à usage alimentaire. Les graines céréalières sont considérées comme des produits d'intérêt nutritionnel par leur valeur énergétique, bien qu'elles soient déficientes en certains acides aminés et vitamines. Elles peuvent contenir des facteurs antinutritionnels, comme l'acide phytique, présent dans les enveloppes, qui possède un effet déminéralisant par complexation des minéraux.

Les céréales représentent un des aliments de base le plus consommé au monde. Les principales céréales sont le blé, le maïs, le riz, l'orge, le sorgho, le millet, l'avoine et le seigle (Tableau 2). La composition chimique des graines de céréales est caractérisée par un taux élevé de sources de glucides (55 à 75 %) et de protéines (8 à 11 %) et des faibles teneurs en lipides et en minéraux. Cette composition chimique diffère entre les différentes céréales affectant fortement la qualité du produit fini.

Tableau 2 : Production de céréales en 2010 (FAO, 2010)

Espèces	Espaces cultivés (million ha)	Production (millions de tonnes)
Maïs	162	844
Riz	154	672
Blé	217	651
Orge	48	123
Sorgho + millet	76	85
Avoine	9	20
Seigle	5	12

En France, et surtout en Allemagne et dans les pays de l'Europe de l'Est, une céréale, autre que le blé, fortement utilisée pour fabriquer du pain est le seigle. Le goût et les arômes du seigle, ainsi que son aptitude à ralentir le rassissement, font de cette céréale une matière première ajoutée à de nombreux pains spéciaux. Les teneurs en protéines du seigle (8 à 12%) sont inférieures à celles du blé (10 à 14 %). Ces protéines, appelés sécalines, ont une mauvaise aptitude à former un réseau de gluten. Toutefois en abaissant le pH de la pâte avec des levains ou des agents acidifiants, il est possible d'améliorer la liaison entre les agrégats protéiques et de produire avec cette céréale, des pains denses mais avec une structure alvéolaire (Roussel and Chiron, 2005).

1.43 - Les céréales sans gluten

Les céréales, telles que le riz, le sorgho, l'amarante ou le maïs ne sont pas des céréales dites panifiables car elles ne contiennent pas de gluten. Pourtant il existe une demande de la part des consommateurs de plus en plus grande pour des pains sans gluten. Selon le *Codex Alimentarius*, (Codex-Stan 118-1979), le gluten est responsable de la maladie cœliaque, aussi connue sous le nom d'intolérance au gluten. C'est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par des villosités altérées dans l'intestin grêle due à l'ingestion de gluten, ou de protéines apparentées, issues de certaines céréales (blé, seigle, épeautre, orge). Cette intolérance au gluten se développe chez certains patients génétiquement prédisposés. De plus, le phénomène d'une alimentation sans gluten, synonyme de bien-être et de bonne santé prend de l'ampleur aux Etats-Unis et en Europe où désormais 20% des adultes sont persuadés d'être allergiques au gluten alors que le taux de prévalence est de 1% (Catassi et al., 2008). Cependant, en plus des allergiques et des intolérants au gluten, il existe une troisième catégorie regroupant les hypersensibles non cœliaques qui semblent de plus en plus déclarés. De plus, depuis quelques années, des leaders d'opinion (sportifs, artistes ou hommes politiques) prônent les vertus du régime sans gluten. La demande d'aliments sans gluten de la part des consommateurs est grandissante. L'AFDIAG (Association Française des Intolérants Au Gluten) recense plus de 80 marques de produits dédiés au sans gluten, soit huit fois plus qu'en 2009.

Ainsi les projets de recherche et les développements de produits sans gluten ne cessent de croître. Cependant les pains sans gluten sont caractérisés par une qualité moindre, une croûte peu croustillante et un goût assez éloigné du pain traditionnel (Gallagher et al., 2003). C'est pourquoi une combinaison de différents ingrédients, d'auxiliaires technologiques et alimentaires et d'additifs, est aujourd'hui utilisée dans la formulation des pains sans gluten pour améliorer leurs qualités (Moore et al., 2004). Malgré des résultats prometteurs, leur incorporation dans la formulation des pains sans gluten présente quelques inconvénients. En effet, certains ingrédients peuvent causer des allergies et les additifs représentent un coût supplémentaire. De plus, ils ne correspondent pas aux attentes de tous les consommateurs et notamment de ceux qui veulent des produits naturels dits « *clean-label* ».

Ainsi, une alternative est d'utiliser le levain qui permet d'améliorer les propriétés rhéologiques et organoleptiques de la pâte et ainsi d'obtenir un pain dont le volume, la texture et la saveur sont améliorés, comparativement à un pain sans gluten et sans levain (Arendt et al., 2007; Decock and Cappelle, 2005). De plus, la durée de vie du produit est allongée ainsi que la valeur nutritive du

pain par une augmentation de la biodisponibilité des minéraux (Katina et al., 2005). Ainsi, le levain apparait comme une alternative efficace, naturelle et peu coûteuse pour la panification sans gluten. C'est pourquoi le pain au levain sans gluten satisfait la demande des consommateurs pour des produits sans additifs avec une meilleure qualité nutritionnelle (Moroni et al., 2009).

1.5 - Fabrication d'un pain au levain

Les levains ont été classés en trois types, selon la technologie appliquée (Tableau 3) (Chavan and Chavan, 2011; Corsetti and Settanni, 2007; Onno et al., 2009). Le type I est généralement utilisé pour lever la pâte sans addition de levure de boulanger. Le levain est élaboré par un mélange de farine et d'eau puis cette pâte est soumise à une première fermentation de 24 h. La seconde étape commence avec un premier rafraîchi, c'est-à-dire par un ajout de farine et d'eau dans la pâte fermentée permettant une introduction d'oxygène, un apport en nouveaux éléments nutritifs et une neutralisation du pH nécessaires à la croissance des micro-organismes présents. Cette pâte fermente rapidement et représente la base du nouveau rafraîchi. En appliquant la même procédure, un levain actif est obtenu en quelques jours (Figure 3). Ce levain, appelé levain chef, est alors rafraîchi à intervalles réguliers (7 – 8 h, voire 12 – 24 h) pour maintenir une activité optimale et un ratio stable entre les différentes communautés microbiennes. Après 2 ou 3 rafraîchis, ce levain est appelé « levain tout point » et peut alors être utilisé pour la fabrication du pain comme agent de fermentation. Ainsi, ce procédé d'entretien permet une fermentation semi-continue du levain qui peut alors être utilisé directement pour la panification. Ce levain dit « naturel » est le levain le plus utilisé par les artisans boulangers français.

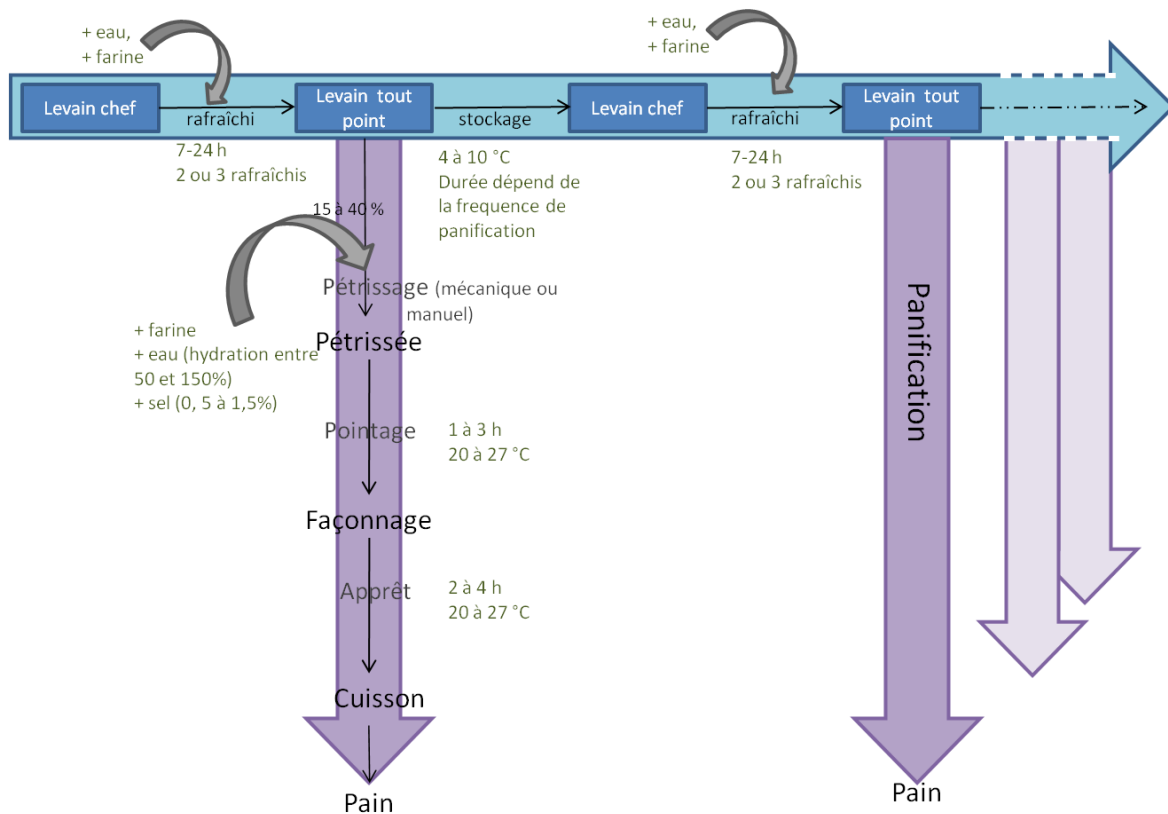


Figure 3 : Diagramme simplifié de l'entretien d'un levain et de la fabrication du pain issu de ce levain.

Le levain de type II, quant à lui, est obtenu par ajout de starter, après une seule fermentation de 15 à 25 h suivie par un stockage de plusieurs jours. Ces levains sont généralement liquides et sont produits à une échelle industrielle utilisant des bioréacteurs à des températures supérieures à 30 °C. Un tel protocole est mis en place pour obtenir un temps de fermentation court. Ces levains ne sont pas utilisés comme agent levant mais pour leur capacité à acidifier la pâte et aussi pour l'enrichir en composés aromatiques spécifiques aux produits au levain.

Enfin, le levain de type III est un levain liquide qui est séché après sa préparation. Il est, lui aussi, très utilisé à une échelle industrielle car sa qualité est plus constante que les levains de type I. De plus, il est plus simple à gérer et permet de réduire le temps de préparation. D'un point de vue microbiologique, les levains de type III sont inactifs et n'ont pas de potentiel fermentaire, contrairement aux levains de type I et II.

Tableau 3 : Les différents types de levain (selon Onno et al., 2009)

	Levain de type I	Levain de type II			Levain de type III
		Ferments commerciaux			
	Levain traditionnel	Préferments	Préparation microbienne sèche		Levain déshydraté
		Levain liquide	Bactéries lactiques	Starter mixtes	
Flore présente	Flore microbienne endogène naturelle, active	Souches de bactéries lactiques et levures sélectionnées	Une ou plusieurs espèces de bactéries lactiques	Une ou plusieurs espèces de bactéries lactiques et de levures	Obtenu après séchage d'un levain naturel ou élaboré par starter
Fonction	Agent naturel de fermentation	Agent de fermentation mixte, issu d'une sélection	Permet une préfermentation acide	Agent de fermentation mixte, issu d'une sélection	Ingrédient permettant d'enrichir l'aspect aromatique de la pâte
Contraintes	Variabilité dans l'activité Coût de main d'œuvre élevé	Achat, Conservation à basse température	Achat Ajout de levure dans la pâte	Achat Conduite d'une préfermentation en culture mixte	Pas d'activité fermentaire
Atouts	Typicité Diversité	Praticité d'emploi Actif	Préparation sèche, concentrée Choix de souches possible	Préparation sèche, concentrée Praticité	Utilisation simple
Statut (selon le décret)	Appellation levain	Appellation levain	Pas d'appellation levain	Appellation levain	Pas d'appellation levain

Pour le levain de type I, une fois le levain tout point obtenu, il est incorporé dans la pâte à pain à hauteur de 15 à 30 % par rapport à la masse totale de la pâte. Cependant, ce pourcentage peut varier selon les saisons et les habitudes de chacun des boulangers. La Figure 3 illustre les différentes étapes nécessaires à l'obtention d'un pain au levain. La pâte est composée de farine (pas forcément la même que celle utilisée pour faire le levain), d'eau, de sel et de levain. Ces différents ingrédients sont mélangés soit manuellement par le boulanger, ou plus usuellement par un pétrin. Cette première étape est appelée pétrissage, elle permet, par une application d'une force mécanique, le développement, le déroulement et l'orientation des protéines de gluten ainsi que l'incorporation d'air dans la pâte. De la structuration du réseau de gluten dépendra la structure alvéolaire de la mie du pain. Une fois pétrie, la pâte est soumise à un premier temps de repos, appelé pointage. Celui-ci permet une fermentation de la pâte en anaérobiose et le développement des arômes. Cette première étape dure deux à trois heures, selon les boulangers.

Ensuite, la pâte est divisée en pâtons, qui sont façonnés sous différentes formes : baguettes, boules, etc. Ces pâtons sont disposés sur une toile de lin et subissent alors un deuxième temps de fermentation appelé apprêt. Cette étape conditionne le volume futur du pain, elle dure deux à quatre heures, selon les boulangers. Avant l'enfournement, le boulanger scarifie les pains avec une lame pour faciliter leur développement et éviter qu'ils ne se déchirent sur les flancs. Les grignes (arrachement de la pâte) ainsi obtenues interviennent également sur l'esthétique du pain. Finalement, les pâtons sont enfournés à une température de 240 à 260 °C, en présence de vapeur d'eau. Lors de la cuisson, le gaz carbonique (CO₂) et la vapeur d'eau formée subissent une expansion entraînant un développement de la pâte. L'alcool produit lors de la fermentation est éliminé par évaporation. En surface, la pâte subit une caramélisation et une réaction de Maillard donnant à la croûte ses arômes caractéristiques (De Tonnac, 2010; Roussel and Chiron, 2005).

1.6 - Les qualités organoleptiques d'un pain au levain

Au cours du temps, et notamment au cours du XX^{ème} siècle, la préférence des consommateurs est allée vers un pain blanc, avec une mie aérée. A la fin des années 1960, la fabrication est modernisée, le rythme rapide de la mécanisation lors de la panification amène à un pétrissage intensif qui aboutit à une surenchère du volume du pain : l'aspect extérieur du produit devient plus important que son goût. A la fin des années 1980, de nombreux pains régionaux apparaissent, ou réapparaissent, pour satisfaire la demande des consommateurs pour des pains plus typés issus de filières courtes entre la production et la vente. C'est à ce moment que les pains au levain connaissent un regain d'intérêt.

Le pain doit sa qualité organoleptique à sa composition et à sa présentation. A la notion de « beau pain » (incluant les propriétés d'apparence et de texture), le consommateur a l'habitude d'associer celle de « bon pain » associé à son odeur, sa saveur et ses arômes. L'odeur et l'arôme du pain sont liés à la perception de composés volatils formés au cours des différentes étapes de la panification. Plus de 300 molécules volatiles participent à la flaveur du pain parmi lesquelles une centaine seraient présentes dans la mie et proviendraient essentiellement des voies de fermentation (Pozo-Bayón et al., 2006). Les autres molécules seraient issues de la croûte du pain et proviendrait de la réaction de Maillard et de la caramélisation se produisant pendant la cuisson (Galey et al., 1994). L'oxydation des lipides est une autre voie de génération de composés volatils odorants. Quantitativement, les composés majoritaires sont les alcools, les aldéhydes, les esters, les cétones, les acides, les pyrazines et les pyrrolines. Cependant, il faut noter que tous les composés volatils présents ne contribuent pas forcément à l'odeur et l'arôme global du produit. La contribution d'un

composé dépend de sa concentration et de son seuil de détection par le consommateur. Lors de la panification, ce sont donc trois voies de synthèse contribuent à la production de composés aromatiques. La première est l'oxydation des lipides : le mélange d'eau à la farine et l'incorporation d'oxygène dans la pâte lors de la fermentation déclenchent l'activation des lipoxygénases ; ces enzymes permettent la formation d'hydroperoxydes qui sont décomposés en composés volatils tels que des aldéhydes, sous l'action de la chaleur lors de la cuisson. La seconde voie de synthèse de composés volatils a lieu lors de la fermentation, à l'issue de la dégradation de l'amidon par les amylases en maltose, lui-même dégradé en glucose. Environ 95% du glucose est transformé *via* la voie d'Embden en acide pyruvique. Celui-ci est ensuite décarboxylé conduisant à la formation de l'acétaldéhyde, lui-même réduit en éthanol. Les 5% d'oses restant sont engagés dans des fermentations dites secondaires conduisant à la formation de divers composés d'arômes : alcools supérieurs, composés carbonylés, esters et acides organiques. Ces fermentations secondaires sont issues de l'activité des micro-organismes présents dans la pâte (Drapron and Richard-Molard, 1979). Enfin, les sucres et les acides aminés qui subsistent à la surface du pâton sont à l'origine de l'arôme et de la couleur caractéristique de la croûte, développés au cours des réactions de Maillard et de caramélisation. La caramélisation des sucres est à l'origine de produits de dégradation colorés qui ont un goût amer et acide ainsi que des composés carbonylés ayant différentes caractéristiques aromatiques (Drapron and Richard-Molard, 1979). La réaction de Maillard joue un rôle prépondérant dans le développement de la croûte et participe également à sa coloration. Elle conduit aussi à la formation d'arômes qui contribuent à la perception de diverses notes odorantes de type amande, grillé, fumé, malté, noisette, sucré, etc.

Finalement, des interactions peuvent avoir lieu entre les voies de formation des composés de Maillard et les autres voies de formation des composés d'arômes dans le pain (fermentation et oxydation lipidique). En effet, la réaction de Maillard implique des composés issus des micro-organismes (ornithine ou diacétyle) et aussi de l'oxydation lipidique (hexanal) (Pozo-Bayón et al., 2006).

En France, comme dans l'ensemble des pays industrialisés, les habitudes alimentaires ont beaucoup plus changé au cours de ces 50 dernières années qu'au cours des siècles précédents. Le secteur de la boulangerie doit faire face à de nouveaux modes de consommation, et surtout, à de nouvelles demandes des consommateurs. La multiplicité des types de pain, avec un retour à l'authenticité et au goût de pain a permis au pain au levain de connaître un regain de popularité,

renforcé par l'émergence du marché bio. Par ailleurs, face à l'expansion de la demande de produits sans gluten, le levain est l'un des meilleurs atouts pour améliorer les qualités du pain sans gluten.

2 - Le levain, un écosystème microbien complexe

D'un point de vue microbiologique, chaque levain peut être considéré comme un écosystème où les levures et les bactéries lactiques interagissent dans une dynamique équilibrée (Lönner et al., 1986) (Figure 4 et 5). De nombreux facteurs endogènes et exogènes interviennent dans l'élaboration et le maintien de cet écosystème. Du fait des conditions de son élaboration, le levain dit « naturel » constitue un véritable réservoir de diversité microbienne spécifique et intra-spécifique.

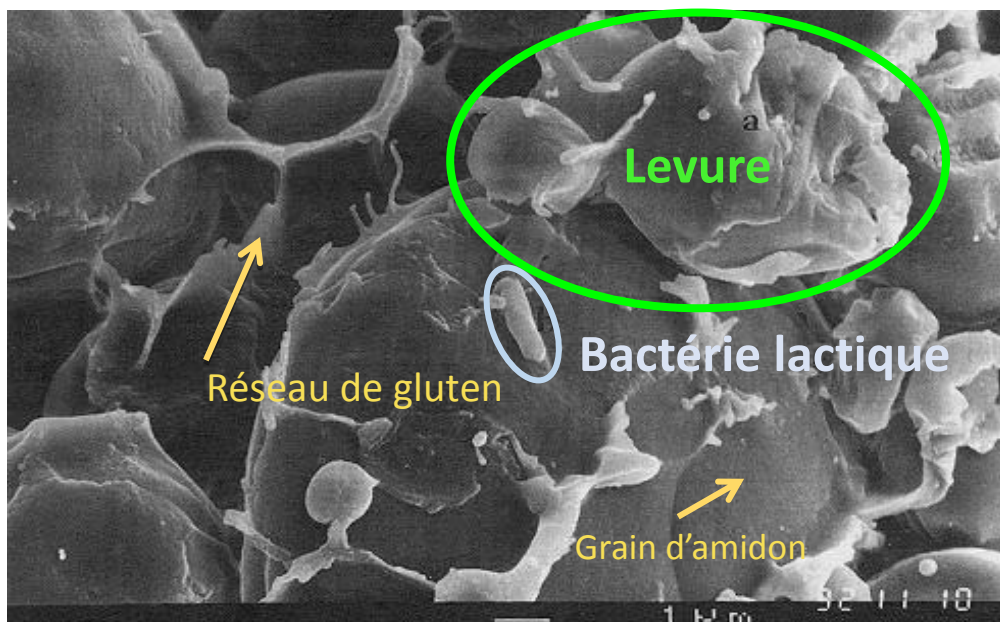


Figure 4 : Microphotographie d'un levain en microscopie électronique à balayage (Chiron and Onno, 2010b).

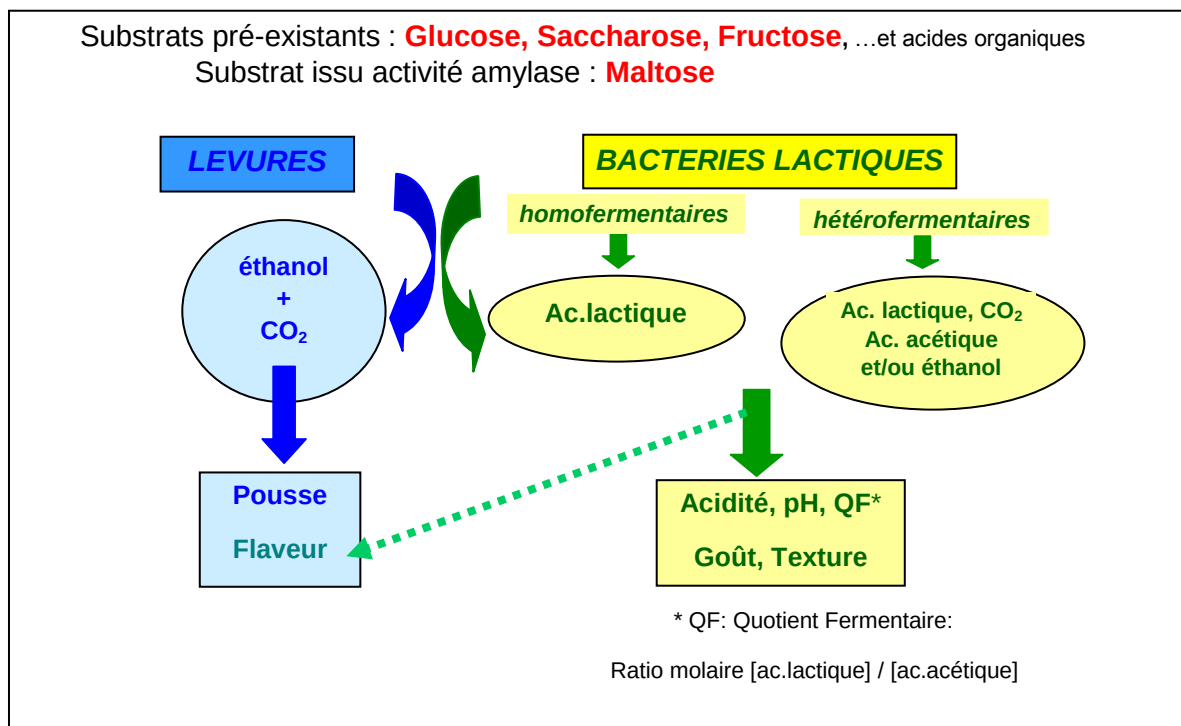


Figure n°5 : Schéma des voies et des bilans métaboliques d'une culture mixte levures – bactéries lactiques, et impact sur le produit fini (Onno et al., 2009)

2.1 - Taxonomie et physiologie des levures des levains de panification

Les levures sont des champignons dont le stade unicellulaire est prédominant dans le cycle de reproduction. Elles appartiennent au règne des *Fungi* et se regroupent majoritairement au sein de l'embranchement des *Ascomycota*. Les levures se multiplient majoritairement par bourgeonnement, c'est la reproduction asexuée. Lorsqu'elles se retrouvent dans des conditions très défavorables, les levures peuvent se multiplier par reproduction sexuée en produisant des spores dans des asques, chez les Ascomycètes.

En biotechnologie agro-alimentaire, les levures sont les cellules eucaryotes les plus utilisées dans les biotransformations des aliments. En effet, les levures sont les acteurs majeurs de nombreux processus de fermentations alimentaires telles que la vinification, la brasserie et la boulangerie (Sicard and Legras, 2011). Dans les levains, les levures sont généralement présentes à une concentration de l'ordre de 10^7 UFC/g. Les espèces de levures retrouvées dans les levains (Tableau 4) partagent une capacité d'adaptation à un pH faible, à une forte concentration de glucides et à une forte densité de bactéries lactiques. Ces adaptations sont principalement retrouvées chez les espèces appartenant à un des trois embranchements des *Fungi*, les *Ascomycètes*. La majorité des levures isolées du levain appartient à la famille des *Saccharomycetaceae*. Ces dernières années,

de nombreuses levures ont été reclassifiées. En effet, la classification basée sur le phénotype a peu à peu été remplacée par une classification basée sur le génotype. En ce qui concerne les levures présentes dans les levains, les changements de noms les plus remarquables se rapportent aux genres *Saccharomyces* et *Pichia*. Le genre *Saccharomyces* se limite désormais aux espèces dites *Saccharomyces sensu stricto*. Les autres espèces, appartenant au groupe des *Saccharomyces sensu lato*, ont été divisées en plusieurs genres : le genre *Kazachstania* regroupait *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces unisporus* et *Saccharomyces barnettii* désormais nommées *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora* et *Kazachstania barnettii*, respectivement. *Saccharomyces kluyveri* est désormais assignée au genre *Lachancea* devenant ainsi *Lachancea kluyveri* (Kurtzman, 2003). Le genre *Pichia*, quant à lui, a été restreint aux espèces proches de l'espèce *Pichia membranifaciens* et inclut également *Pichia fermentans*. Le genre *Issatchenkia* a été intégré au genre *Pichia*, les séquences des gènes utilisées pour redéfinir la classification de cette espèce étant très proches de celles de *P. membranifaciens*. L'espèce *Issatchenkia occidentalis* a été renommée *Pichia occidentalis* alors que *Issatchenkia orientalis* a été renommée *Pichia kudriavzevii*. Finalement, les espèces *Pichia anomala* et *Pichia subpelliculosa* ont été définies comme étant trop éloignées de *P. membranifaciens*. Ainsi, un nouveau genre a été créé, *Wickerhamomyces*, et ces espèces sont désormais nommées *Wickerhamomyces anomalus* et *Wickerhamomyces subpelluculosus*, respectivement (Kurtzman et al., 2008).

Ce changement de classification a remis en cause la fréquence de certaines espèces retrouvées dans les levains, selon le type de classification utilisé. Par exemple, en comparant 19 études mettant en œuvre des techniques phénotypiques pour l'identification des levures avec 27 autres études qui ont utilisé des techniques moléculaires, la fréquence de *Candida humilis* est beaucoup plus forte dans les études où les levures ont été identifiées par des techniques génotypiques alors que l'incidence de *K. exigua* diminue. Ces deux espèces très proches d'un point de vue phylogénétique peuvent être confondues lors de leur identification par méthodes phénotypiques (Huys et al., 2013) .

Les levures les plus fréquemment isolées des levains de panification sont *C. humilis* et *S. cerevisiae*. Cette dernière espèce comprend les souches de la levure de boulangerie. Ainsi, la présence de l'espèce *S. cerevisiae* dans les levains de panification peut être attribuée à l'utilisation de levure de boulangerie dans le fournil (Corsetti et al., 2001; Meroth et al., 2003a; Pulvirenti et al., 2004; Vernocchi et al., 2004) ou à la présence de souches endogènes à la farine (Vrancken et al., 2010). Lorsque les levains sont obtenus après une fermentation spontanée,

jusqu'à 65% des isolats obtenus appartiennent à *C. humilis* (Valmorri et al., 2010). Les autres espèces souvent retrouvées sont *P. kudriavzevii*, *K. exigua*, *Torulaspora delbruckii*, et *W. anomalus* (pour revue, Huys et al. (2013)). D'autres levures ont été moins couramment isolées des levains de panification telles que *Candida glabrata* (Meroth et al., 2003a; Vrancken et al., 2010), *P. membranifaciens* (Almeida and Pais, 1996; Foschino et al., 1999; Paramithiotis et al., 2000), *K. unispora* et *K. barnettii* (Vrancken et al., 2010). (Tableau 4)

Tableau 4 : Différentes espèces de levures isolées de levains provenant de différents pays et de différentes céréales (Selon Huys et al., 2013) (S. : *Saccharomyces*, P. : *Pichia*, C. : *Candida*, T. : *Torulaspora*)

Genre et espèce	Synonyme	Ana morphe (forme asexuée)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida humilis</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Kazachstania exigua</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida stellata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Kazachstania unispora</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>S. fructuum</i> <i>Candida milleri</i> <i>Issatchenkia orientalis</i> <i>S. exiguus</i> <i>P. anomala</i> , <i>Hansenula anomala</i> <i>T. stellata</i> <i>S. unisporus</i> , <i>T. unisporus</i> <i>P. guilliermondii</i>	<i>C. krusei</i> <i>C. (Torulopsis) holmii</i> <i>C. colliculosa</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. valida</i> <i>C. kefir</i> <i>C. guilliermondii</i>

Les levures sont des micro-organismes aérobies facultatifs, capables de fermenter, en absence d'oxygène, et de respirer, en présence d'oxygène. Le rôle principal des levures en panification est la production de gaz carbonique, par la transformation du glucose. Ce gaz, enfermé dans la pâte à pain, va produire des bulles qui vont la faire gonfler, avant de s'évaporer à la cuisson. Ainsi, les levures sont responsables de l'alvéolage de la mie du pain. La concentration et les espèces de levures présentes dans le levain sont les paramètres qui influencent le plus la concentration de CO₂ obtenue (Gobbetti, 1998). Dans le levain, le CO₂ est formé à la fois par les levures et plus faiblement par les bactéries lactiques présentes dans le levain. Il a été montré qu'en présence de bactéries lactiques, *S. cerevisiae* produit une quantité de gaz carbonique plus importante que lorsqu'elle est seule (Gobbetti, 1998).

Par ailleurs, les levures contribuent à l'arôme du pain, une des caractéristiques les plus importantes pour juger de sa qualité. En plus des pratiques boulangères et de la cuisson qui influencent fortement les arômes de la croûte, l'étape la plus importante pour le développement des arômes est la fermentation de la pâte. Une fois encore, l'association bactéries lactiques / levures va permettre d'améliorer les caractéristiques aromatiques du pain. Les pains au levain contiennent plus de composés volatils et sont mieux notés lors de tests sensoriels que les pains à la levure (Hansen and Schieberle, 2005). La plupart des composés volatils présents dans le levain sont également détectés dans le pain, montrant ainsi la grande influence du levain, bien que certains arômes s'évaporent lors de la cuisson de la pâte. Les bactéries lactiques, par leur métabolisme, vont libérer des précurseurs d'arômes, tels que les acides aminés libres, qui sont alors utilisés par les levures pour produire des composés aromatiques *via* la voie d'Ehrlich qui se déroule parallèlement à la voie alcoolique. Cette voie correspond à la désamination de l'acide aminé en acide α -cétonique suivie d'une décarboxylation. Ceci conduit alors à un aldéhyde qui contient un ou deux carbones de moins que l'acide aminé dont il est issu. Cet aldéhyde peut être oxydé en acide ou réduit et donner un alcool, comme le phényl-éthanol à partir de la phényl-alanine (Schieberle, 1996).

La variabilité du nombre et des espèces de levures retrouvées dans les levains peut être attribuée au degré d'hydratation du levain, au type de céréale utilisée et à la température des rafraîchis.

Dans des levains élaborés avec différentes céréales et pseudo-céréales (blé, seigle, avoine, orge, riz, maïs, millet, quinoa, cassava ou sarrasin), *S. cerevisiae* est majoritaire dans tous les levains, excepté pour le levain à base de quinoa où *I. orientalis* est retrouvée en quantité égale à celle de *S. cerevisiae*. Pour les levains à base de sarrasin et d'avoine, aucune levure n'a été détectée (Vogelmann et al., 2009). Le type même de blé utilisé peut influencer la densité de la communauté microbienne retrouvée dans les levains. Une étude a montré que, parmi 19 levains à base de blé étudiés, *S. cerevisiae* était prédominante dans 16 levains. Cependant, les levains à base de blé *T. durum* ont une plus faible densité en levures, comparativement à celle des levains à base de blé *T. aestivum* (Minervini et al., 2012a).

D'autres études ont montré que la température de fermentation influence la diversité de la communauté levurienne du levain. En effet, lors d'une étude où des levains de seigle ont été fermentés spontanément à 20 °C ou à 30 °C, *S. cerevisiae*, *C. humilis* et *C. glabrata* ont été retrouvées dans les levains fermentés à 30 °C alors que seule *K. unispora* est retrouvée dans les

levains fermentés à 20 °C (Bessmeltseva et al., 2014). De même, l'élaboration de levains à base de teff ou de sarrasin sous deux conditions différentes a été réalisée, l'une avec une pâte ferme rafraîchie à 25 °C toutes les 12 h, et l'autre avec une pâte liquide rafraîchie à 35 °C avec un rafraîchi toutes les 24 h. Dans ce cas, les auteurs de cette étude ont mis en évidence que *S. cerevisiae* et *C. glabrata* sont les espèces dominantes dans le levain de teff, quelles que soient les conditions de rafraîchis alors que seule *K. barnettii* est détectée dans le levain à base de sarrasin, et seulement sous la première condition de rafraîchi (Moroni et al., 2010). Lors de la fermentation d'un levain de blé à 37 °C, avec un rafraîchi toutes les 24 h, aucune levure n'est détectée mettant en évidence une limite de croissance des levures à haute température (Vrancken et al., 2011b). Cependant, entre 30 et 40 °C, en présence d'oxygène et dans les levains avec de longs rafraîchis, *L. orientalis* est compétitive mais ne l'est plus en conditions anaérobies avec des temps de rafraîchis inférieurs à 24 h (Vogelmann and Hertel, 2011). Finalement, la diversité des communautés microbiennes est également influencée par la tolérance aux acides organiques produits par les bactéries lactiques (Gobbetti et al., 1994).

De nombreuses levures ont été isolées du levain mais seule une partie d'entre elles jouent un rôle dans le procédé de fermentation. Par exemple, des levures non-fermentaires ont été isolées mais ne sont que des contaminants ubiquistes. Cependant, ces levures peuvent influencer la saveur du produit fini si elles sont présentes en forte quantité (Hammes et al., 2005).

En conclusion, *S. cerevisiae* et *C. humilis* sont les deux principales levures le plus fréquemment retrouvées bien que plus de 30 espèces différentes aient été isolées dans les levains de panification. Elles contribuent principalement à l'alvéolage de la mie du pain de par leur production de CO₂ et à sa saveur par leur synthèse d'arômes. Ces espèces sont particulièrement adaptées à l'environnement complexe que constitue le levain et vraisemblablement à la cohabitation avec les bactéries lactiques présentes dans le levain de panification.

2.2 Les bactéries lactiques des levains de panification : taxonomie, biodiversité et rôle

Les bactéries lactiques constituent un groupe de micro-organismes hétérogènes sur les plans physiologique et morphologique. Ce sont des cellules à Gram positif, en forme de coque, de bacille ou de coccobacille. Les cellules sont généralement immobiles, asporulées et aérotolérantes. Elles ne possèdent ni catalase, ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase. Ces bactéries présentent des exigences nutritionnelles complexes en acides aminés, peptides, vitamines, sels, acides gras et glucides fermentescibles. Leur métabolisme leur permet une croissance à des pH bas, compris

entre 4,0 et 4,5. Cependant certaines peuvent se multiplier à des températures extrêmes (entre 4 et 45 °C) et à des pH extrêmes (entre 3,2 et 9,6). Les bactéries lactiques sont retrouvées dans de nombreux habitats tels que les plantes, les aliments, les eaux usées ou encore les tractus génitaux et gastro-intestinaux des Hommes et des animaux.

La fermentation par les bactéries lactiques est un procédé très ancien et est utilisé depuis l'Antiquité pour préserver les aliments. Les bactéries lactiques sont très souvent utilisées dans de nombreuses fermentations alimentaires industrielles, soit par ajout de starters, soit par fermentation spontanée. Ces bactéries contribuent ainsi à la prévention de la croissance des micro-organismes pathogènes ou de contamination, et augmentent la durée de vie des produits fermentés tels que les produits laitiers (fromages, yaourts), la viande (saucisson), les végétaux (choucroute, olive), les boissons (vin, cidre) et les céréales (pain) (Hammes and Vogel, 1995; Pot, 2008; Ravyts et al., 2012).

Parmi les différents genres de bactéries lactiques, seuls *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Weissella* ont une grande importance en fermentation alimentaire et ont le statut « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (Wessels et al., 2004). Parmi tous ces genres, les *Lactobacillus* sont les plus souvent retrouvés dans les levains de panification ainsi que les genres *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus* (Tableau 5) (pour revue, Huys et al. (2013)).

Tableau 5 : Genres et espèces de Bactéries Lactiques généralement associées au levain (Selon Huys et al., 2013) (Lc. : *Lactococcus*, E. : *Enterococcus*, L. : *Lactobacillus*, Le : *Leuconostoc*, P. : *Pediococcus*, S. : *Streptococcus*, W : *Weissella*)

Hétérofermentaire Obligatoire	Hétérofermentaire Facultatif	Homofermentaire Obligatoire
<i>L. acidifarinae</i> <i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. cellobiosus</i> <i>L. crustorum</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. frumenti</i> <i>L. hammesii</i> <i>L. hilgardii</i> <i>L. homohiochii</i> <i>L. kefir</i> <i>L. kunkeei</i> <i>L. lindneri</i> <i>L. mucosae</i> <i>L. namurensis</i> <i>L. nantensis</i> <i>L. nodensis</i> <i>L. oris</i> <i>L. panis</i> <i>L. parabuchneri</i> <i>L. pontis</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rossiae</i> <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. secaliphilus</i> <i>L. siliginis</i> <i>L. spicheri</i> <i>L. vaginalis</i> <i>L. zymae</i> <i>Le. citreum</i> <i>Le. gelidum</i> <i>Le. mesenteroides subsp. cremoris</i> <i>Le. mesenteroides subsp. dextranicum</i> <i>Le. mesenteroides subsp. mesenteroides</i> <i>W. cibaria</i> <i>W. confusa</i> <i>W. hellenica</i> <i>W. kandleri</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>W. viridescens</i>	<i>L. alimentarius</i> <i>L. casei/paracasei</i> <i>L. coleohominis</i> <i>L. kimchi</i> <i>L. paralimentarius</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. perolens</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sakei</i> <i>P. acidilactici</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. pentosaceus</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. amylolyticus</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. collinoides</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. Fructivorans</i> <i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. mindensis</i> <i>L. nagelii</i> <i>L. salivarius</i> <i>Lc. lactis subsp. lactis</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. equinus</i> <i>S. suis</i>

2.21 - Le genre *Lactobacillus*

Les cellules des *Lactobacillus* sont en forme de bacilles ou de cocobacilles, et sont souvent organisées en chaînettes. Les Lactobacilles sont aéro-tolérants mais leur croissance est meilleure en condition anaérobie. Leur pH de croissance optimale est compris entre 5,5 et 6,5 (Pot, 2008). Parmi les bactéries lactiques, le genre *Lactobacillus* est le plus divers, regroupant plus de 190 espèces (Février 2015 ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>). Parmi celles-ci, plus de 50 ont été retrouvées dans des levains de panification. Les espèces de Lactobacilles les plus fréquemment retrouvées dans les levains sont *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus pontis* ou *Lactobacillus rossiae* (Huys et al., 2013). La généralisation de la biologie moléculaire, et surtout des méthodes culture-indépendantes utilisées en microbiologie alimentaire au début des années 2000, a permis la mise en évidence de nouvelles espèces isolées des levains de panification telles que *Lactobacillus mindensis* (Ehrmann et al., 2003), *Lactobacillus spicheri* (Meroth et al., 2004), *Lactobacillus hammesii* (Valcheva et al., 2005), *Lactobacillus acidifarinae* (Vancanneyt et al., 2005), *Lactobacillus nantensis* (Valcheva et al., 2006), *Lactobacillus crustorum* (Scheirlinck et al., 2007b), et *Lactobacillus namurensis* (Scheirlinck et al., 2007a) (Figure). L'étude des levains asiatiques a également permis de mettre en évidence d'autres espèces de *Lactobacillus* telles que *Lactobacillus siliginis* (Aslam et al., 2006) ou *Lactobacillus mudanjiangensis* (Gu et al., 2013). Deux études de Lhomme et al. (2015a et 2015b) ont montré la présence prépondérante de *L. sanfranciscensis* dans environ 30 levains français. Toutefois, la diversité observée au sein des espèces de bactéries lactiques dépend des méthodes mises en œuvre, culture-dépendantes ou -indépendante.

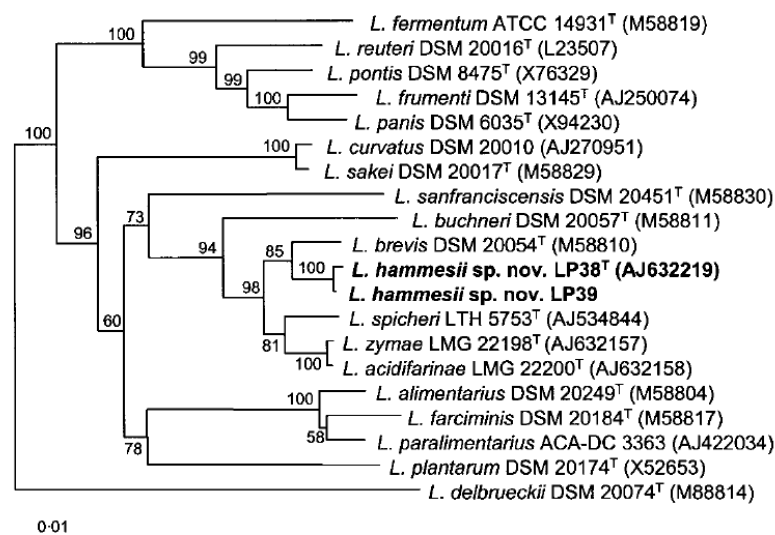


Figure 7 : Arbre phylogénétique basé sur la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S montrant les principales espèces du genre *Lactobacillus* isolées du levain (Valcheva et al., 2005).

2.22 - Les autres genres de bactéries lactiques retrouvées dans les levains de panification

Outre les *Lactobacillus*, d'autres genres de bactéries lactiques ont été identifiés dans les levains, il s'agit des genres *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* et *Lactococcus*.

Le genre *Leuconostoc* est morphologiquement différent des Lactobacilles, les cellules sont de forme lenticulaire ou sphérique, disposées par paires ou en chaînes. Leur température optimale de croissance est comprise entre 20 et 30 °C. Aucune croissance n'est observée au-delà de 40 °C. Leur pH optimum est compris entre 6 et 7. Certaines espèces de *Leuconostoc* ont une meilleure croissance en conditions aérobies (Björkroth et al., 2014b). Ce genre comprend 12 espèces parmi lesquelles deux ont été retrouvées dans les levains de panification, *Leuconostoc citreum* et *Leuconostoc mesenteroides* (Corsetti et al., 2001; Scheirlinck et al., 2007c). En 1993, certaines espèces de *Leuconostoc* ont été reclassifiées comme étant des *Weissella*, en se basant sur la similarité ADN : ADN (Collins et al., 1993). Ce genre comprend 14 espèces, (Björkroth et al., 2014a) parmi lesquelles *Weissella cibaria* et *Weissella confusa* qui sont fréquemment retrouvées dans des levains de panification (Robert et al., 2009; Scheirlinck et al., 2007c).

Les cellules du genre *Pediococcus* sont en forme de coques sphériques et se regroupent souvent en tétrade (Pot, 2008). Le genre *Pediococcus* comprend 12 espèces différentes dont *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus*, identifiées dans les levains de panification (Moroni et al., 2011; Moroni et al., 2010; Weckx et al., 2010). Finalement, le genre *Lactococcus* comprend 7

espèces différentes dont seule l'espèce *Lactococcus lactis* a été retrouvée dans les levains de panification (Robert et al., 2009).

2.23 - Métabolisme des bactéries lactiques issues des levains de panification

Métabolisme des glucides

Bien que le maltose soit produit régulièrement, et en grande quantité, par l'hydrolyse de l'amidon, des substrats glucidiques directement assimilables (maltose, glucose, saccharose, fructose) sont également présents dans la farine à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 % (Gänzle and Gobbetti, 2013; Gänzle et al., 2007; Gobbetti et al., 2005; Onno et al., 2009).

En se basant sur la fermentation des hexoses et des pentoses, les *Lactobacillus* peuvent être divisés en trois groupes distincts : les homofermentaires obligatoires qui fermentent les hexoses par la voie métabolique EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) et qui produisent exclusivement de l'acide lactique. Les pentoses ne sont pas fermentés par ce type de Lactobacilles. Parmi les homofermentaires obligatoires, on retrouve *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. amylovorus*, *L. mindensis* ou *Lactobacillus sakei* isolés du levain. Le second groupe rassemble les hétérofermentaires obligatoires qui fermentent les hexoses et les pentoses *via* la voie 6-PG/PK (6-phosphogluconate / phosphocétolase) et synthétisent les acides lactique et acétique ou de l'éthanol. A partir de la fermentation des hexoses, le CO₂ est produit. Dans ce groupe, on retrouve *L. sanfranciscensis*, *L. rossiae*, *L. brevis*, *L. pontis* et *L. fermentum*. Finalement, le troisième groupe est celui des organismes hétérofermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses *via* la voie EMP et les pentoses *via* la voie 6-PG/PK. Parmi ce groupe, *L. plantarum*, *L. (par)alimentarius* et *L. curvatus* ont été retrouvés dans les levains de panification. Toutes les espèces des genres *Weissella* et *Leuconostoc* sont hétérofermentaires obligatoires et l'espèce *Lactococcus lactis* est homofermentaire facultative. Contrairement aux autres produits fermentés où les bactéries lactiques homofermentaires jouent le plus grand rôle, ce sont les bactéries lactiques hétérofermentaires qui sont prédominantes dans les levains de panification (De Vuyst and Neysens, 2005). La compétitivité de certaines souches de bactéries lactiques hétérofermentaires est attribuée à la présence d'une maltose phosphorylase, leur permettant d'utiliser le maltose présent en grande quantité (Ehrmann and Vogel, 1998). Cette compétitivité peut également être expliquée par l'utilisation des hexoses et des pentoses *via* la voie 6-PG/PK ainsi que l'utilisation de fructose comme accepteur d'électron. Ainsi, *L. sanfranciscensis* utilise le maltose comme source d'énergie et le fructose comme accepteur d'électron secondaire (Vogel et al., 1999). La première étape d'utilisation du maltose est catabolisée par la maltose phosphorylase sans consommation

d'énergie et la deuxième par la phosphoglucomutase amenant à la production d'une molécule de glucose, et une molécule de glucose-1-phosphate, puis de glucose-6-phosphate qui sera alors ensuite utilisée pour produire de l'énergie (3 moles d'ATP / mole de glucose issu du maltose, soit une mole de plus qu'en absence de maltose phosphorylase). Différents co-substrats (fructose, acide citrique, acide malique, aldéhydes) sont impliqués dans la régénération des co-facteurs NADH et NADPH. En présence d'accepteurs d'électrons comme le fructose, la production d'acétate va être favorisée permettant ainsi une production d'ATP supplémentaire (Figure 8).

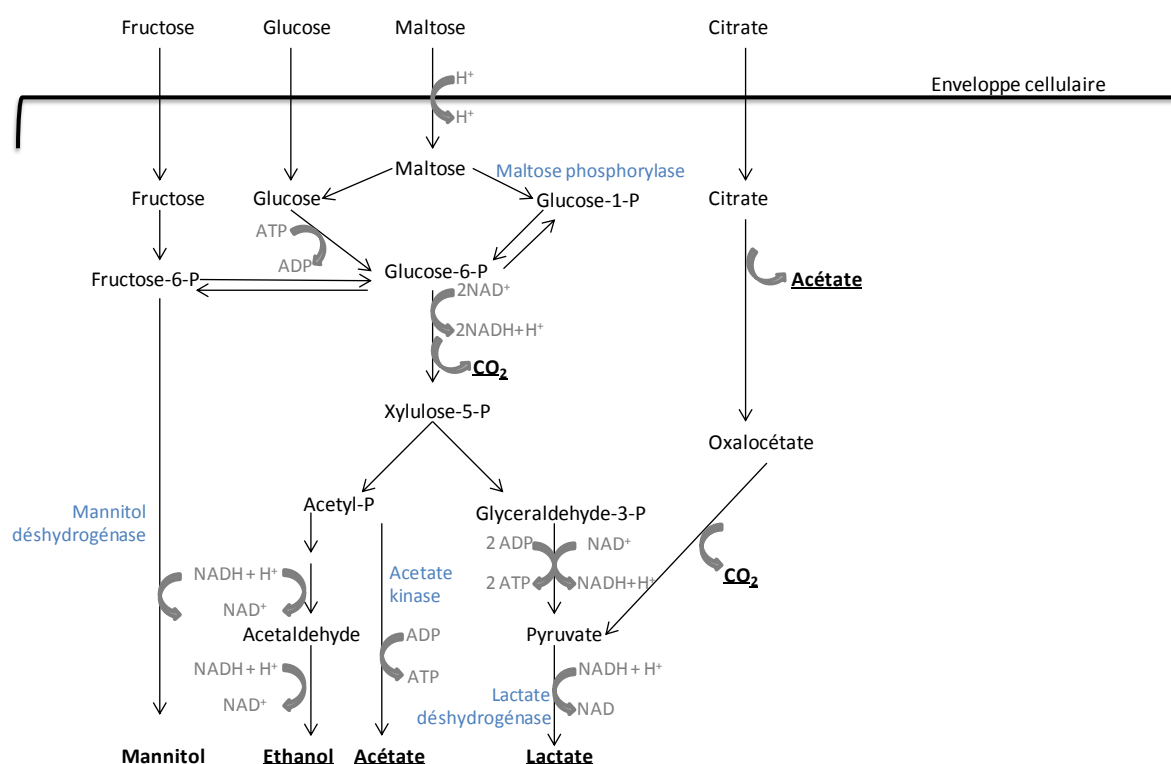


Figure 8 : Schéma simplifié du métabolisme carboné des bactéries lactiques hétérofermentaires (selon Gänzle et al., 2007). Les produits finaux du métabolisme sont en gras, les produits majeurs du métabolisme dans le levain sont soulignés.

Métabolisme azoté

Le gluten, constitué de gliadines et de gluténines, est le principal composé protéique de la pâte. Généralement, les bactéries lactiques sont auxotrophes vis-à-vis des acides aminés et dépendent donc fortement de leurs activités protéolytiques propres ou de celles de la farine pour satisfaire leurs besoins nutritionnels (Kunji et al., 1996). Les principaux éléments de ce système protéique sont, au niveau des bactéries, les sérine-protéinases associées à l'enveloppe cellulaire (CEP, *cell-envelope-associated serine proteinase*), des systèmes de transport des peptides et des acides aminés ainsi que des peptidases intracellulaires. La première étape est la dégradation des protéines par la CEP or, les *Lactobacillus* du levain ne possèdent pas cette enzyme extracellulaire

(Guédon et al., 2001; Pepe et al., 2003b; Vermeulen et al., 2005). Ces Lactobacilles, à l'image de *L. sanfranciscensis* ATCC 27651, transportent principalement des peptides qui sont ensuite dégradés en acides aminés par des peptidases intracellulaires (Thiele et al., 2003; Vermeulen et al., 2005). Ainsi, une première étape de protéolyse (protéolyse primaire) consistant à dégrader les protéines en peptides est largement attribuée aux protéinases endogènes de la farine (Loponen et al., 2004; Thiele et al., 2002; Vermeulen et al., 2005). L'activité optimale de ces enzymes est comprise entre pH 3,0 et pH 4,5. Ainsi l'acidification de la pâte par la production d'acides lactique et acétique par les bactéries lactiques du levain favorise l'activation des protéases de la farine et donc la dégradation des protéines présentes (Thiele et al., 2002). La protéolyse secondaire est uniquement réalisée par les bactéries lactiques, *via* leurs peptidases, qui transforment les peptides présents dans le milieu en très petits peptides, ou en acides aminés (Figure 9).

La sensibilité des gliadines à la protéolyse dépend de leur type : les α - et γ -gliadines sont plus sensibles à la protéolyse que les ω -gliadines qui sont plus riches en proline. L'hydrolyse partielle des gluténines résulte d'une dépolymérisation et d'une solubilisation des macropolymères de gluténines (GMP). Le degré de polymérisation des GMP est influencé par la présence d'agents réducteurs. Dans le levain, le glutathion réduit (GSH) est l'agent réducteur le plus abondant. En effet, les lactobacilles hétérofermentaires expriment la glutathion réductase durant leur croissance et réduisent le glutathion oxydé extracellulaire (GSSG) en GSH (Figure). Or ce dernier subit des réactions d'échange de thiol avec les protéines du gluten et diminue ainsi les liaisons disulfures intramoléculaires favorisant la dépolymérisation des GMP. La dégradation des GMP en peptides rompt le réseau de gluten et augmente leur solubilité. Cependant, l'hydrolyse complète de protéines de gluten est limitée par l'activité des enzymes et par la solubilité des protéines de gluten (Jänsch et al., 2007; Vermeulen et al., 2006b). L'activité protéolytique influence les propriétés viscoélastiques de la pâte. En effet, les principales protéines présentes dans le levain sont les gluténines et les gliadines qui ont un impact sur la viscosité, l'élasticité et la cohésion de la pâte (Gänzle et al., 2008). Ainsi, une hydrolyse trop importante de ces protéines conduit à une modification des propriétés rhéologiques de la pâte. Cependant, l'hydrolyse des protéines permet la libération d'acides aminés, précurseurs d'arômes (Guerzoni et al., 2007; Hansen and Schieberle, 2005).

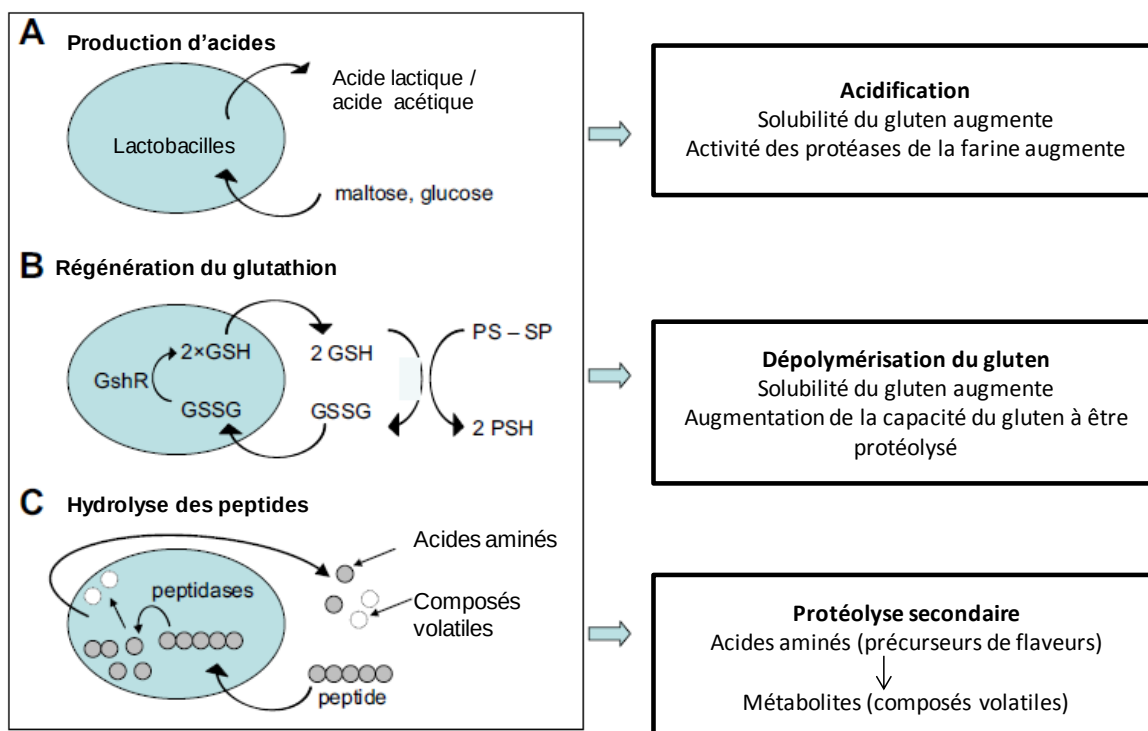


Figure 9 : Schéma des activités protéolytiques se déroulant dans le levain (D'après Gänzle et al., 2008).

3 - Fonctionnalités des bactéries lactiques dans le levain de panification

3.1 La protéolyse du gluten, un moyen de réduire la teneur en gluten des produits de panification

Bien qu'ayant potentiellement un effet négatif sur la rétention gazeuse, l'activité protéolytique associée au levain permettrait de réduire la teneur en gluten afin que les produits en résultant soient tolérés par les patients cœliaques. En allant plus loin dans le niveau de détoxification du gluten, on pourrait envisager de fabriquer des produits avec du gluten dont les fractions toxiques auraient été dégradées et ainsi tolérée par les patients. Lors de la protéolyse, les gliadines ne sont que partiellement clivées à cause de leur haut taux de proline. En effet, la proline est un acide aminé cyclique, ainsi les fractions peptidiques contenant de nombreux résidus proline ont des conformations spécifiques et sont plus difficiles à dégrader par les enzymes digestives. Au niveau intestinal, l'interaction entre les peptides de gliadines et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) favorisent l'activation des cellules intestinales CD4⁺ qui sécrètent des cytokines, responsables de l'inflammation. Cette réaction inflammatoire provoque la formation de

pores dans la muqueuse intestinale, responsable de la malabsorption dont souffrent les patients cœliaques (Woodward, 2007).

Ainsi, il est envisageable, en ayant recours à un levain constitué de souches préalablement sélectionnées, de s'assurer d'une détoxification complète du gluten dans des produits. et de la On parfaite innocuité des produits (De Angelis et al., 2007a).

Une étude a mis en évidence quatre souches, *L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A et *L. hilgardii* 51B qui, ensemble, dégradent les fractions toxiques des gliadines (Di Cagno et al., 2002). Ces souches ont été utilisées pour la fermentation d'un levain à base de blé et de farines sans gluten (ratio 3 : 7) utilisé lors d'une panification. Les résultats ont montré que 13 des 17 patients cœliaques qui ont ingéré ce pain n'ont présenté aucun changement dans leur état au niveau de la perméabilité intestinale (Di Cagno et al., 2004; Di Cagno et al., 2003). Une expérience similaire sur un levain de seigle a mis en évidence une hydrolyse quasi-totale des sècalines obtenue grâce à ces bactéries lactiques. Néanmoins, les auteurs précisent bien qu'il s'agit d'une réduction de la toxicité et non d'une absence de toxicité (De Angelis et al., 2006a).

Par ailleurs, on peut aussi noter qu'un mélange de souches dénommé VSL3 (VSL Pharmaceuticals) a été développé. C'est un mélange commercial de bactéries lactiques et de bifidobactéries : contenant des souches de *Streptococcus thermophilus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium infantis*. Actuellement, ce mélange est commercialisé pour être utilisé par voie orale chez le patient pour prévenir des conséquences liées à l'ingestion de gluten. Ce mélange a par ailleurs été introduit avec succès dans un levain de blé, avec une atténuation de la toxicité mesurée après une longue fermentation de 24 h à 37 °C (De Angelis et al., 2006b).

Ces différents résultats, bien que prometteurs, n'ont conduit qu'à une diminution significative des fractions de gliadines toxiques et ces travaux doivent être complétés pour réussir une détoxification complète du gluten. Pour cela, des pools plus complets de bactéries lactiques ont été étudiés, avec adjonction de protéases fongiques notamment (De Angelis et al., 2007a). Une combinaison entre des bactéries lactiques (*L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A et *L. hilgardii* 51B) et deux protéases fongiques a conduit à une hydrolyse des protéines durant une longue fermentation en milieu liquide et a permis de diminuer la concentration du gluten sous le seuil de 20 parties par million (ppm) nécessaire à une appellation « sans gluten ».

En 2011, Greco *et al.*, ont réussi à détoxifier complètement le gluten. Ils ont utilisés un pool de souches de *L. sanfranciscensis* sélectionnées pour leur système peptidasique, particulièrement

efficace contre les peptides riches en proline, et un pool de bactéries lactiques (*L. alimentarius* 15M, *L. brevis* 14G, *L. sanfranciscensis* 7A et *L. hilgardii* 51B) sélectionnées pour hydrolyser efficacement les gliadines, associées à deux protéases fongiques, provenant d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus oryzae*. Ils ont alors réussi à obtenir une farine contenant moins de 10 ppm de gluten. Puis, 200g de biscuits fabriqués à partir de cette farine ont été consommés par cinq patients coéliquas durant 60 jours. A la fin de l'étude, les analyses ont montré que cette farine de blé fermentée n'était pas toxique.

Cependant, même si les résultats sont encourageants, il reste de nombreuses études à mener pour vérifier l'innocuité de ce recours et il faudrait surtout convaincre les patients coéliquas d'accepter l'idée d'ingérer du blé (Arendt et al., 2007).

3.2 Impact des bactéries lactiques sur la flaveur du pain au levain

La contribution des bactéries lactiques à la flaveur du pain est principalement attribuée à leur production d'acides lactique et acétique. En effet, le pain au levain a un goût typique aigrelet apporté par l'acide lactique, et plus piquant imputé à l'acide acétique. La quantité de chaque acide varie selon les levains et est caractérisée par le quotient fermentaire (QF). Ce dernier est défini par le rapport molaire acide lactique / acide acétique (Spicher, 1983). Le QF dépend des espèces présentes dans le levain mais aussi de la température lors de la panification. En effet, il a été observé que la production d'acide lactique augmentait avec la température, alors que celle de l'acide acétique restait stable (Gobbetti et al., 1995). Par ailleurs, la conduite de la fermentation et la combinaison des paramètres technologiques (hydratation, température, durée, farine utilisée) influencent la balance entre ces deux acides. Par exemple, le pain allemand, plus riche en acide acétique a un goût acide plus prononcé que le pain français. Le pain au levain au seigle a un QF compris entre 2 et 2,7. Plus le QF est faible, plus la teneur en acide acétique est importante, et peut devenir désagréable au goût. A l'inverse, plus le QF est élevé, moins le pain est typé en raison d'une prédominance d'acide lactique. Pour le pain au levain de blé, caractéristique du pain français, il est préconisé d'avoir un QF compris entre 4 et 7, synonyme d'un bon équilibre entre les deux acides pour optimiser les arômes du pain (Onno et al., 2009). Lors d'une étude analysant 25 pains au levain, le QF variait entre 1,5 et 9. Ces variations sont fonction des caractéristiques des farines mises en œuvre, de l'activité du levain, des paramètres technologiques utilisés (température, temps, ...) et du pourcentage de levain ajouté dans la pâte (Chiron and Onno, 2010a).

Par ailleurs, le métabolisme des acides aminés conduit à la production de précurseurs d'arômes tels que les aldéhydes, *via* des réactions de transamination, de déamination et de décarboxylation. Bien que les levures soient responsables d'une production plus importante que les bactéries lactiques de la production de composés aromatiques, le catabolisme de l'arginine par certaines bactéries lactiques, par la voie de l'arginine déiminase (ADI), conduit à augmenter la quantité d'ornithine dans la pâte. Ce composé est précurseur du 2-acétyl pyrroline, caractéristique de la note aromatique grillée de la croûte. Cette activité ADI a été détectée et étudiée chez certaines souches de bactéries lactiques hétérofermentaires telles que *L. sanfranciscensis*, *L. brevis* et *L. fructivorans* (Gobbetti et al., 2005). Un autre exemple est la conversion de la glutamine en glutamate, un exhausteur de goût qui, après accumulation dans le milieu, apporte du goût au pain (Gänzle et al., 2007). Parallèlement à ce métabolisme des acides aminés, l'oxydation des lipides induit également la formation d'aldéhydes qui sont les composés intermédiaires clés de la synthèse de composés aromatiques des pains au levain à base de blé et de seigle. Cependant, il semble que la concentration de ces aldéhydes soit réduite par l'activité de l'alcool déshydrogénase des bactéries lactiques hétérofermentaires (Hansen and Schieberle, 2005; Vermeulen et al., 2007).

Ainsi, la fermentation au levain, par le métabolisme des levures, des bactéries lactiques et leurs interactions contribue fortement à la production de composés aromatiques dans le pain. Pour le cas particulier des pains sans gluten, leur qualité sensorielle peut ainsi être améliorée par la fermentation au levain produisant des composés aromatiques (Moroni et al., 2009). Plus généralement, la fermentation influence principalement la flaveur de la mie et vient s'ajouter aux deux autres voies de synthèse des composés volatils du pain que sont l'oxydation des lipides et la réaction de Maillard qui se produit principalement lors de la cuisson.

3.3 Impact des bactéries lactiques sur la texture du pain au levain

Les exopolysaccharides (EPS) se définissent comme des polymères d'oses reliés entre eux par des liaisons osidiques et sont sécrétés à l'extérieur de la cellule. Les EPS sont utilisés comme épaississants et peuvent être ajoutés dans de nombreux aliments pour améliorer la viscosité, l'émulsion, la gélatinisation ou la stabilisation d'un produit (Tieking and Gänzle, 2005). Les EPS peuvent être divisés en deux groupes : les hétéropolyssacharides et les homopolyssacharides (HoPS) qui correspondent principalement à des polymères de fructanes ou de glucanes. alors que

les hétéropolyssaccharides sont principalement utilisés pour les produits laitiers. Seuls les homopolysaccharides sont retrouvés dans les produits de panification. Ils sont synthétisés à partir du sucrose grâce à des glycosyltransférases ou des fructosyltransférases présentes chez de nombreuses bactéries lactiques associées aux produits céréaliers (Tieking and Gänzle, 2005). La structure et le poids moléculaire des HoPS dépendent des souches productrices, la concentration d'HoPS produite est fonction, quant à elle, de la concentration en glucides. Les glucanes et les fructanes synthétisés par les bactéries lactiques influencent fortement la qualité du pain en terme de volume et de moelleux de la mie (Di Cagno et al., 2006). Ainsi, la production d'EPS *in situ* a plus d'impact que l'ajout des mêmes polysaccharides dans la formulation du pain (Moroni et al., 2009). La production d'HoPS dans les levains de panification à base de farine de blé est principalement attribuée aux espèces *L. frumenti*, *L. reuteri*, *L. pontis* et *L. sanfranciscensis*. Ces espèces produisent aussi bien des fructanes (levane ou inuline) que des glucanes (dextrane, reuterane ou mutane). Des exopolysaccharides sont également produits par *W. cibaria*, *Ln. mesenteroides*, *L. plantarum* (Galle and Arendt, 2013). Une étude a montré que chacun des neuf levains étudiés contenait au moins une souche productrice d'EPS. En effet, sur 30 isolats, 23, contenant *Ln. citreum*, *Ln. mesenteroides*, *W. cibaria*, *W. confusa* et *L. sanfranciscensis*, produisaient des HoPS (Bounaix et al., 2009). Ainsi, il est établi que le levain est une source de bactéries lactiques productrices d'EPS.

Le fait que les EPS améliorent la structure du pain est très intéressant pour optimiser la texture de pain sans gluten. Néanmoins, peu d'informations ont été publiées sur la formation d'EPS et leur rôle dans les levains sans gluten, contrairement au levain de blé. La préoccupation première est de savoir si les bactéries lactiques sur un support sans gluten sont capables de produire des EPS en quantités suffisantes pour remplir leur fonction dans un tel pain. Par ailleurs, il manque dans la bibliographie des évaluations des performances rhéologiques de ces EPS par rapport aux hydrocolloïdes disponibles sur le marché (Moroni et al., 2009). En 2008, (Schwab et al., 2008) ont montré que *L. reuteri* LTH5448 et *W. cibaria* 10M produisaient autant d'EPS dans un levain de sorgho que dans un levain de blé ou de seigle. En revanche, les améliorations de la qualité organoleptique du pain sans gluten à base de sorgho ont été obtenues uniquement avec *W. cibaria* 10M. Cette souche synthétise une quantité importante de dextranes de grande variété structurale permettant ainsi d'améliorer le volume spécifique et de réduire la dureté de la mie. Les auteurs concluent que des travaux sont encore nécessaires afin de déterminer la performance des EPS dans le pain sans gluten. Ils préconisent également d'identifier les EPS les plus efficaces pour

remplacer les hydrocolloïdes, étant donné que le type et l'origine des EPS et les interactions avec la matrice influencent grandement leur comportement rhéologique. De plus, des travaux ont prouvé que des souches de *W. cibaria* MG1 et *Weissella kimchii* F28 synthétisaient respectivement 8 g/kg et 4g/kg d'EPS dans un levain de sorgho . Ces souches, fréquemment identifiées dans le levain de sorgho, peuvent ainsi représenter un intérêt car elles produisent des EPS en grande quantité, mais elles acidifient assez peu le milieu. Récemment, la texture de pains fabriqués avec des céréales sans gluten (sarrasin, quinoa, sorgho et teff) et un levain fermenté avec *W. cibaria* MG1, productrice d'EPS, a été étudiée. Comparés à la texture d' un pain à la farine de blé sans levain, les résultats montrent que la dureté de la mie a été significativement réduite, pour le pain de sarrasin (- 122 %), de teff (-29 %), de quinoa (- 21 %). Un pain au levain a été inoculé avec cette même souche et fabriqué avec une farine de blé a été utilisé comme référence. Une réduction de la dureté de la mie de – 122 % a alors été obtenue (Wolter et al., 2014). Ainsi, les bactéries lactiques productrices d'EPS présentes dans les levains de panification peuvent être une alternative à l'addition des hydrocolloïdes et utilisés pour améliorer la texture du pain.

3.4 Impact des bactéries lactiques sur la durée de vie du pain au levain

Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans l'inhibition des micro-organismes (*Bacillus*, Entérobactéries, flore fongique) dont certains altèrent la qualité du pain et sa conservation. Cette activité anti-microbienne est due à l'abaissement du pH, à la toxicité propre des acides lactique et acétique, mais aussi à la sécrétion de bactériocines et de substances à activité antifongique. Ces activités préservent la qualité du pain en lui assurant un temps de conservation plus long et peuvent remplacer plus ou moins certains additifs (Gobbetti et al., 2005). Ainsi, par l'activité inhibitrice des bactéries lactiques sur les souches d'altération, le levain est un acteur majeur de la biopréservation du pain.

L'inhibition de bactéries d'altération, telles que les *Bacillus*, est réalisée par l'acidification du milieu . L'acétate et le propionate sont plus efficaces que l'acide lactique (Rosenquist and Hansen, 1998). Les bactéries lactiques des levains inhibent également les germes indésirables par la production de bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides, synthétisées par voie ribosomique, présentant une activité bactéricide ou bactériostatique contre des bactéries phylogénétiquement proches (De Vuyst and Vandamme, 1994). Différentes bactériocines produites par des bactéries lactiques, isolées de levain, ont été caractérisées : la bavaricine A synthétisée par *L. sakei* (Larsen et al., 1993), la

plantaricine ST31 produite par *L. plantarum* ST31 (Todorov et al., 1999), BLIS C57 (*bacteriocin-like inhibitory substance*) produite par *L. sanfranciscensis* C57 (Corsetti et al., 1996) ou encore l'amylovorine L471 produite par *L. amylovorus* DCE 471 (De Vuyst et al., 1996). Par ailleurs, une souche isolée du levain, *L. reuteri* LTH2584 produit un antibiotique, la reutericycline (Gänzle et al., 2000). Ces activités antimicrobiennes constituent un facteur de sélection de certaines souches au sein du levain.

Une activité antifongique a également été mise en évidence lors de la fermentation du levain. En effet, les bactéries lactiques produisent des substances telles que le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, l'acétate, le propionate, le caproate, le phénylacétate, la reutérine et des peptides antifongiques (Schnürer and Magnusson, 2005). Par exemple, *L. plantarum* ITM21B produit du phényllactate et du 4-hydroxyphényllactate permettant de retarder de sept jours la croissance d'*Aspergillus niger* et *Penicillium roquefortii*, pendant le stockage du pain (Lavermicocca et al., 2000). De nombreuses études ont montré que l'effet antifongique ne peut être attribué à une seule molécule présente en trop faible quantité pour avoir un véritable effet inhibiteur, mais à une synergie de plusieurs molécules (Vermeulen et al., 2006a). A titre d'exemple, l'effet antifongique de *L. amylovorus* a été attribué à l'activité synergique de l'activité de plus de 10 composés, incluant le phényllactate, des acides phénoliques, des acides gras et des dipeptides cycliques (Ryan et al., 2011). L'augmentation de la durée de vie du pain par l'utilisation du levain a également été mise en évidence pour des pains sans gluten. Ainsi, dans une étude, deux levains (l'un ayant une activité anti-fongique grâce à la souche *L. plantarum* FST1.7, l'autre pas) ont été incorporés dans une formule sans gluten de farine de riz brun, d'amidon de maïs, de farine de sarrasin et de soja. Une comparaison a été faite avec une formule acidifiée chimiquement et une formule sans levain et sans acidification. Les pains acidifiés par le levain ont une mie plus moelleuse après cinq jours de stockage que le pain acidifié chimiquement. De plus, l'utilisation du levain possédant une activité antifongique a permis d'obtenir des pains présentant un retard de développement de certaines moisissures contaminantes de trois jours par rapport au pain contrôle (Moore et al., 2007). Cet effet antifongique des levains peut être mis à profit dans le cadre des démarches « *clean label* » actuellement recherchées.

3.5 Impact des bactéries lactiques sur les apports nutritionnels du pain au levain

Le levain a différents effets sur le pain influençant ses caractéristiques nutritionnelles du pain. On peut citer l'augmentation de la biodisponibilité en minéraux, la diminution de l'index glycémique, l'augmentation de composés bioactifs et aussi la production de prébiotiques.

3.51 Augmentation de la biodisponibilité en minéraux

Les céréales sont une source importante de minéraux tels que le potassium, le phosphore, le magnésium ou le zinc, mais malheureusement, l'absorption de ces minéraux est limitée par la présence de l'acide phytique. En effet, cet acide inhibe l'absorption de divers cations (Zn, Cu, Co, Mn, Ca, Fe) en formant des sels insolubles (phytates) (Reale et al., 2007).

Durant la fabrication du pain, l'acide phytique est dégradé par des phytases dont l'action dépend du pH, de la température et du temps de fermentation. C'est pourquoi la fermentation par le levain peut influencer la disponibilité en biominéraux. Les enzymes dégradant les phytates sont présentes dans les farines et aussi chez certaines levures et bactéries lactiques isolées de levain. La fermentation crée des conditions de pH optimum pour l'activation des phytases endogènes à la farine et l'augmentation de la solubilité des minéraux. De plus, il a été montré que certaines souches telles que celles de l'espèce *L. sanfranciscensis* CB1 ont une forte activité phytasique (De Angelis et al., 2003). Quand cette souche est utilisée comme starter dans une fermentation au levain dans une farine de blé, une diminution d'environ 50% du niveau de phytates est retrouvée, comparativement à un levain ne comportant pas cette souche. Pour les patients cœliaques qui souffrent déjà de malabsorption causée par la maladie, l'acide phytique, en diminuant la biodisponibilité des minéraux, accentue leurs déficiences nutritionnelles.

3.52 Diminution de l'index glycémique

Les produits céréaliers, et particulièrement le pain, constituent une source majeure de glucides digestibles et l'index glycémique (IG) de ces produits est élevé. Or, l'IG est un critère caractéristique de la digestibilité d'un aliment : plus l'IG est élevé, plus vite l'aliment sera digéré et les glucides simples en résultant, assimilés. Certaines études font état d'une diminution de l'IG lors de la consommation de pain au levain (De Angelis et al., 2009; De Angelis et al., 2007b; Lappi et al., 2010). En effet, l'acide lactique produit par les bactéries lactiques diminue le degré de gélatinisation de l'amidon, qui devient moins digestible et donc moins rapidement assimilable (Singh et al., 2010; Zhang and Hamaker, 2009).

3.53 Augmentation de la formation de composés bioactifs

Récemment, il a été mis en évidence que la fermentation au levain permettait de favoriser la formation de composés bioactifs. Ces derniers sont définis comme étant des composés (peptides, polyphénols, oligosaccharides, etc.) qui influencent positivement la santé humaine (Kitts and Weiler, 2003). Parmi ces composés bioactifs, plusieurs études ont montré que les bactéries lactiques du levain permettaient la production d'anti-oxydants à partir de la fermentation de diverses céréales (Coda et al., 2011; Rizzello et al., 2008; Rizzello et al., 2012a). Par ailleurs, la capacité des bactéries lactiques à produire la lunasine, une protéine impliquée dans le système anti-métastatique pendant la fermentation du levain a été exploitée (Rizzello et al., 2012b). Les résultats de cette étude mettent en évidence que, comparés à des pâtes témoins, la concentration en lunasine est de deux à quatre fois plus importante dans des pâtes fermentées par *L. curvatus* SAL33 et *L. brevis* AM7 (Rizzello et al., 2012b). Cette étude permet d'envisager de nouvelles possibilités pour synthétiser la lunasine et éventuellement, la formulation d'aliments fonctionnels.

Tables

3.54 Propriétés prébiotiques de certains exopolysaccharides

Parmi les EPS produits par les bactéries lactiques, certains possèdent des activités prébiotiques *in vivo* tels que le levane produit par *L. sanfranciscensis* LTH2590 (Korakli et al., 2002). La formation de polysaccharides avec un potentiel effet prébiotique a également été montré pour les souches *L. reuteri* LTH5448 et *W. cibaria* 10M dans des levains de sorgho (Schwab et al., 2008). En effet, ces EPS peuvent être métabolisés par les bactéries du microbiote intestinal leur permettant de synthétiser des composés impliqués dans la diminution du taux de cholestérol ou des triglycérides, par exemple (Poutanen et al., 2009). Cependant, bien que la production d'EPS dans les levains de panification soit une alternative intéressante pour rechercher des activités pré/probiotiques, les recherches dans ce champ d'application restent rares (Galle and Arendt, 2013).

En conclusion, la Figure 10 schématise le métabolisme des bactéries lactiques et son impact sur le pain et *in fine* sur le consommateur de pain au levain.

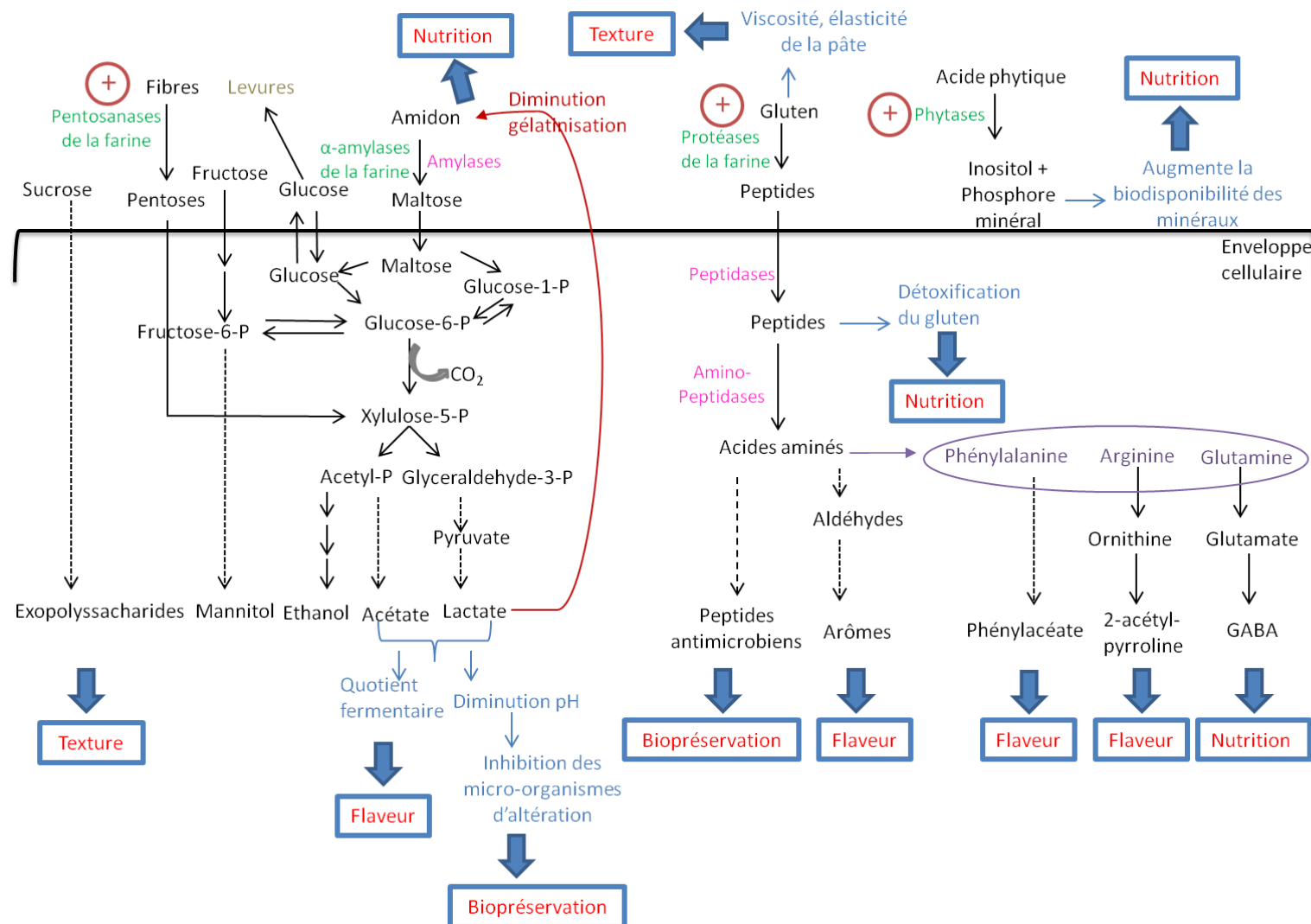


Figure 10 : Schématisation globale et simplifiée des voies métaboliques et des fonctionnalités associées chez les bactéries lactiques des levains de panification.

(+) : enzymes activées par la diminution du pH

4 - Elaboration du levain : mise en place de la flore bactérienne

4.1 - Dynamique microbienne : de la farine au levain mature

Au début de la première fermentation, la microflore du levain est à l'image de la microflore de la farine et contient environ 10^2 à 10^5 UFC/g (De Vuyst and Neysens, 2005; Ercolini, 2013; Van der Meulen et al., 2007; Weckx et al., 2010). Parmi les bactéries présentes, on retrouve des bactéries à Gram-négatif aérobies comme *Pseudomonas* ou aérobie-anaérobies facultatives (comme les entérobactéries). Elle contient aussi des bactéries lactiques sous forme de bacilles (*L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*), ou de coques homofermentaires (*Enterococcus faecalis*, *Lc. lactis*, *P. acidilactici*, *Pediococcus parvulus*, *P. pentosaceus*) ou de coques hétérofermentaires (*Leuconostoc* et *Weissella*). Une flore indésirable telle que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* peut également être présente (Alfonzo et al., 2013; Ercolini, 2013; Van der Meulen et al., 2007; Vrancken et al., 2011b; Weckx et al., 2010). Des levures telles que *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* et *Sporobolomyces* et des moisissures telles que *Alternaria*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium* ont également été identifiées sur les farines utilisées pour élaborer le levain (De Vuyst et al., 2014; Ercolini et al., 2013).

Une majorité de ces différents phyla (*Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*) représente une population non-active de la farine. Ces bactéries présentes sur les matières premières sont remplacées par des bactéries lactiques plus compétitives lors des fermentations spontanées. Ce phénomène se retrouve dans d'autres produits fermentés (Di Cagno et al., 2013; Humblot and Guyot, 2009; Jeong et al., 2012; Jung et al., 2011; Wouters et al., 2013).

Après un ou deux jours de rafraîchis, une grande partie de la flore bactérienne de la farine est inhibée par son manque d'adaptation à l'environnement levain (Ercolini et al., 2013; Van der Meulen et al., 2007; Weckx et al., 2010). En effet, cette flore n'est pratiquement jamais retrouvée dans le levain (De Vuyst and Neysens, 2005). Lors de cette première phase, le potentiel redox de la farine diminue (Hammes et al., 2005) favorisant la croissance des *Enterobacteriaceae*, des levures et des bactéries lactiques. Durant la seconde phase de la fermentation (du deuxième au cinquième jour, environ), les bactéries lactiques spécifiques

au levain (*Lactobacillus*, *Weissella* et *Pediococcus*) dominant. A ce stade, les bactéries lactiques utilisent le maltose présent en grande quantité dans la farine et produisent des acides lactique et acétique diminuant ainsi le pH du levain (Gänzle et al., 2007). Ces bactéries lactiques présentent une meilleure tolérance à l'acidité et possèdent un métabolisme particulièrement adapté à l'utilisation de mono- et di-saccharides. Cette diminution de pH inhibe la croissance des entérobactéries et favorise celle des levures. Finalement, pendant la troisième et dernière phase, au fur et à mesure que le nombre de rafraîchis augmente, les espèces très adaptées au levain, telles que *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* et les levures dominantes dans le levain mature atteignent un niveau de 10^6 à 10^9 UFC/g et 10^5 à 10^8 log UFC/g, respectivement.

Cet établissement d'un écosystème en trois phases a été observé durant les fermentations de céréales telles que le blé et l'épeautre (Ercolini et al., 2013; Van der Meulen et al., 2007), l'orge (Weckx et al., 2010) ou encore le cassava (Brauman et al., 1996). Les paramètres technologiques utilisés lors de l'élaboration du levain ont une grande importance sur la sélection des espèces de bactéries lactiques présentes dans le levain. Cependant, en considérant un paramètre à la fois, on ne donne pas une vue d'ensemble car la croissance microbienne est influencée par une combinaison d'effets des différents paramètres (Figure).

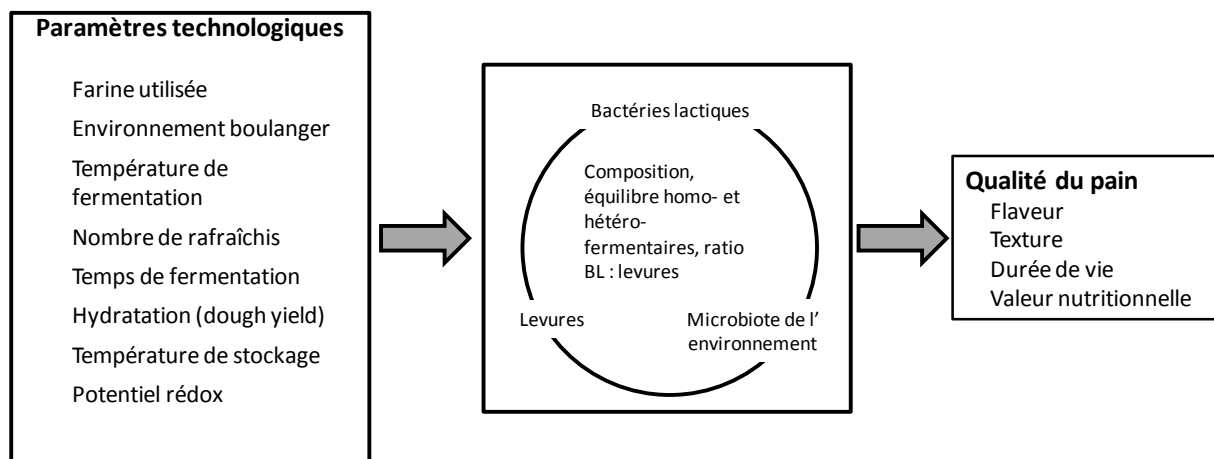


Figure 11 : Facteurs influençant les caractéristiques microbiennes du levain et son impact sur les qualités du produit final (adapté de Hammes and Gänzle (1997))

4.2 - Influence des paramètres technologiques sur la mise en place du microbiote du levain

4.2.1 Farine utilisée

La farine utilisée lors des rafraîchis conduisant à l'obtention d'un levain mature influence fortement la diversité microbienne de ce levain. En effet, cette farine n'étant pas stérile, elle véhicule des micro-organismes contaminants qui sont apportés dans le levain lors des rafraîchis et susceptibles de devenir dominants (De Vuyst et al., 2009). Selon la céréale utilisée, la farine a une composition en nutriments différente. Ainsi, cette différence de nutriments permet l'installation de niches écologiques différentes (Corsetti et al., 2001; Vogelmann et al., 2009). Une étude a montré que la composition nutritive de deux espèces de blé, *T. durum* et *T. aestivum*, utilisées lors des rafraîchis a un effet sur la composition bactérienne des levains (Minervini et al., 2012a). Neuf levains ont été rafraîchis avec *T. aestivum* et dix avec *T. durum*. Les résultats montrent que *T. durum* a une plus forte concentration en maltose, en glucose, en fructose et en acides aminés libres que *T. aestivum*. L'identification des bactéries lactiques présentes dans les levains rafraîchis par ces deux farines de blé met en évidence que le levain à base de farine *T. durum* est caractérisé par la présence majoritaire de bactéries lactiques hétérofermentaires principalement *L. sanfranciscensis*, *Leuconostoc* spp., *W. cibaria* et *L. brevis*, alors que peu de bactéries lactiques homofermentaires et de levures sont détectées. A l'inverse, pour les levains à base de farine de blé *T. aestivum*, une flore homofermentaire est majoritaire et seuls trois levains sur neuf sont dominés par une flore lactique hétérofermentaire. Or ces trois levains sont ceux qui ont la plus forte concentration en sucres fermentescibles et en acides aminés libres. C'est pourquoi il semblerait que les bactéries lactiques hétérofermentaires soient moins compétitives dans les levains où les farines contiennent moins de nutriments.

Cependant, le rôle de la céréale utilisée pour obtenir la farine est à relativiser quant à l'établissement du microbiote d'un levain stable. En effet, dans une étude sur la diversité bactérienne chez des boulangers, utilisant différentes farines, Scheirlinck et al. (2007c) montrent que l'environnement boulanger a plus d'influence que la farine utilisée pour rafraîchir le levain. De manière analogue, Ercolini et al. (2013) ont montré que le nombre d'espèces partagées par les levains à base de différentes farines (seigle, blé *T. durum* et *T. aestivum*) augmentait au fur et à mesure des rafraîchis. Cela signifie que les différences

initiales des communautés bactériennes parmi les levains rafraîchis par différentes farines tendent à diminuer au fur et à mesure que le nombre de rafraîchis augmente et que le levain devient mature et stable.

4.22 L'environnement boulanger

Les introductions successives de farine dans l'environnement boulanger créent ce qu'on appelle un environnement boulanger (*house microbiota*) qui sert d'inoculum aux fermentations suivantes (De Vuyst et al., 2009). Afin de mettre en évidence l'influence de l'environnement du rafraîchi sur la diversité microbienne du levain, sept levains traditionnels ont été rafraîchis soit dans un environnement boulanger, soit dans un laboratoire, c'est-à-dire dans un environnement contrôlé. Ces levains ont été rafraîchis pendant 80 jours, avec le même lot de farine et avec les mêmes paramètres technologiques (Minervini et al., 2012b). Par cette étude, les auteurs ont démontré que le nombre de bactéries lactiques et les caractéristiques physico-chimiques des levains ne sont pas affectés par l'environnement de rafraîchis des levains. Cependant, les populations peuvent être différentes pour un levain rafraîchi au laboratoire ou chez un boulanger. En effet, dans l'ensemble, *L. plantarum*, *L. sakei* et *W. cibaria* sont majoritaires dans les levains rafraîchis en boulangerie alors que *Ln. citreum* semble être plutôt dominant sous les conditions de laboratoire. D'autres bactéries lactiques sous-dominantes, telles que *L. curvatus*, *Lc. lactis* et *P. pentasocous*, sont différentes en fonction du lieu de rafraîchi. Ainsi, cinq levains sur sept ont une population bactérienne significativement différente selon qu'ils ont été rafraîchis en laboratoire ou en boulangerie. On peut donc conclure que l'utilisation de farine dans l'environnement boulanger ainsi que l'utilisation à long terme d'un même levain favorise l'établissement d'un environnement boulanger stable. Celui-ci peut agir comme un inoculum de souches compétitives durant les rafraichis quotidiens. Par conséquent, non seulement la farine mais aussi l'environnement (matériel, air, etc.) sont des sources de facteurs de sélection pour la microflore du levain.

4.23 Température et nombre de rafraîchis

Plusieurs études ont montré que la température et le nombre de rafraîchis jouent un rôle très important pour la sélection des espèces présentes dans le levain. En réalisant quatre fermentations spontanées où seuls la température et le temps entre deux rafraîchis varient, Vrancken et al., 2011b, ont mis en évidence un effet sur la composition bactérienne des

levains finaux. Ainsi, après 10 jours de rafraîchis, le levain rafraîchi à 23 °C tous les 24 h est dominé par *Ln. citreum* alors que les levains rafraîchis à plus hautes températures (30 et 37 °C) sont dominés par *L. fermentum*. Un temps de rafraîchi plus long (toutes les 48 h à 30 °C) met en évidence une co-dominance de *L. fermentum* et de *L. plantarum*. Dans d'autres travaux, des levains de seigle fermentés spontanément au laboratoire soit à 20 °C soit à 30 °C ont été étudiés (Bessmeltseva et al., 2014). Les résultats ont montré que dans les levains fermentés à 20 °C, on retrouvait des bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives ou obligatoires alors que dans les levains fermentés à 30 °C, seules les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives sont détectées. De plus, cette étude montre que le microbiote s'installe plus rapidement à 30 °C, avec la prédominance des bactéries lactiques après seulement un jour de rafraîchi alors qu'à des températures plus basses (23 °C), trois cycles de rafraîchis sont nécessaires à l'installation des bactéries lactiques. De la même manière, des travaux où les fermentations à base de farine de seigle, où des starters commerciaux ont été ajoutés, montrent le maintien de *L. mindensis* et *L. sanfranciscensis* lors des fermentations à 25 °C. A l'inverse, *L. crispatus* et *L. pontis* dominent lors de la fermentation à 30 °C. A 40 °C (levain de type II), *L. crispatus*, *L. frumenti* et *L. panis* sont les espèces dominantes de la microflore du levain (Carnevali et al., 2007). Une autre étude sur la fermentation des levains de seigle initiés avec des starters commerciaux montre le maintien de *L. sanfranciscensis* et *L. mindensis* à 25 °C mais une sélection d'autres espèces à 30 et 40 °C (Meroth et al., 2003b). De manière analogue, une fermentation à haute température permet la sélection de *L. helveticus* dans un levain à base de sorgho (Hamad et al., 1997) ou encore de *L. amylovorus* dans un levain à base de seigle (Müller et al., 2001).

Le même type d'expérience a été réalisé sur des levains de teff et d'amarante où *L. fermentum*, *L. frumenti* et *L. amylovorus* ont été ajoutés comme starters. Après 10 jours de fermentation, *L. frumenti*, *L. amylovorus* et *L. fermentum* sont présents dans les levains fermentés à hautes températures (35 °C) quelle que soit la céréale utilisée (teff ou amaranth) alors que ces deux espèces ne sont pas détectées dans les levains rafraîchis à 25 °C (Moroni et al., 2010).

La température a également un impact sur le quotient fermentaire. En effet, la production d'acide lactique est plus importante à hautes températures, favorisant l'acidification. Les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires facultatives sont souvent prédominantes dans les levains produits à haute température et avec un temps de

fermentation court. En conséquence, leur présence conduit à une acidification rapide du levain et une production élevée d'acide lactique. A l'inverse, les bactéries lactiques hétérofermentaires prévalent dans les levains produits à basse température et à des temps de fermentation longs. Ceux-ci produisent alors les acides lactique et acétique et/ou de l'éthanol lors de la fermentation.

En conclusion, ces travaux indiquent une corrélation positive entre des fermentations à températures basses ou modérées (< 30 °C) et la présence de *L. sanfranciscensis*. En revanche, une corrélation négative est établie entre ces températures de fermentation et la présence de *L. fermentum* et *L. plantarum* (Gänzle et al., 1998; Moroni et al., 2011; Vogelmann and Hertel, 2011).

4.24 Hydratation du levain (Dough Yield)

L'hydratation (ou Dough Yield, DY) est exprimée comme étant le ratio entre le poids de la pâte et le poids de la farine, multiplié par 100. Le poids de la pâte résulte de la somme du poids de la farine, de l'eau, du levain et des autres ingrédients (tel que le sel). Etant donné que l'eau est, avec la farine, le principal ingrédient de la pâte à pain, le DY est fortement lié à la quantité d'eau introduite dans la pâte : plus la quantité d'eau est élevée, plus le DY est élevé. Dans la plupart des cas, les levains français sont fermes, caractérisés par un DY de 150 à 160 (c'est-à-dire 50 g ou 60 g d'eau pour 100 g de farine, respectivement). Cependant, les levains produits selon le style américain (Kulp, 2003) peuvent atteindre des DY supérieurs à 225 correspondant à une activité de l'eau (a_w) de 0.98. Ces valeurs de DY ne sont pas limitatives pour la croissance des bactéries lactiques ou des levures, cependant, associées à une longue fermentation (24 à 48 heures), les bactéries lactiques ont une croissance favorisée par rapport à celle des levures. De plus des valeurs relativement hautes de DY combinées à de hautes températures de fermentation (35 à 37 °C) favorisent la croissance des bactéries lactiques homofermentaires (Decock and Cappelle, 2005). Les levains pâteux (DY = 160) sont facilement colonisés par les levures, dont l'activité de l'eau (a_w) minimale est de 0.88 mais les levains représentent un environnement plus sélectif pour les bactéries lactiques permettant une dominance des souches halotolérantes (Hammes et al., 2005). Parfois, lors des rafraîchis, du sel est ajouté à des quantités variables. L'utilisation du sel à une faible quantité (jusqu'à 0,7% du poids total de la pâte) favorise la croissance des bactéries lactiques alors qu'une forte quantité de sel (de 1,6 à 3,2% du poids total de la pâte)

diminue la croissance des bactéries lactiques et favorise celle des levures. En effet, une étude a montré que l'augmentation de la quantité de sel agissait sur le ratio bactéries lactiques / levures de 20 : 1 à 1 : 1 (Simonson et al., 2003).

Généralement, après 10 jours de rafraîchis, il est estimé qu'un levain est microbiologiquement stable. Le levain mature est un écosystème complexe, avec un faible pH, un faible taux d'oxygène et une présence de bactéries lactiques compétitives et adaptées à ce milieu.

4.3 - Facteurs influençant la stabilité d'un levain traditionnel

La communauté microbienne des levains naturels échantillonnés dans des conditions réelles (en boulangerie) resterait stable d'une année à l'autre (Scheirlinck et al., 2008). L'utilisation de paramètres technologiques constants (nombre et température de rafraîchis, farine utilisée, etc.) est un pré-requis nécessaire pour garantir la stabilité d'un levain (Vogelmann and Hertel, 2011). Cependant, des facteurs de variabilité intrinsèque au levain existent telles que les conditions stressantes inhérentes au levain (stockage à faible température), les interactions nutritionnelles et antagonistes entre les micro-organismes. Ce sont autant d'éléments pouvant influencer la stabilité du levain.

4.3.1 - Adaptation aux conditions de stress pendant le stockage du levain

Des modèles mathématiques ont été développés pour la croissance de *L. sanfranciscensis* (Gänzle et al., 1998), *L. amylovorus* (Messens et al., 2002), ou encore *L. plantarum* (Passos et al., 1994). D'une part, ces différents résultats montrent que la température optimale de croissance des bactéries dépend de l'espèce. Les fermentations traditionnelles au levain sont conduites à des températures comprises entre 25 et 35 °C permettant ainsi de sélectionner les bactéries lactiques mésophiles alors que les fermentations conduites dans les climats tropicaux à plus hautes températures sont dominées par des bactéries lactiques thermophiles, ayant une température optimale de croissance comprise entre 40 et 45 °C (Vogel et al., 1999). D'autre part, le pH de croissance optimal des bactéries lactiques du levain est compris entre 5,0 et 6,0 (Gänzle and Gobbetti, 2013; Gänzle et al., 1998; Messens et al., 2002). Le pH optimum de croissance de *L. sanfranciscensis* est de 6,7, son pH minimum de croissance a été défini à 3,9 ; celui de *L. pontis* est de 3,5. La croissance de *L. plantarum* a été observée jusqu'à des pH atteignant 3,1. Pendant les rafraîchis, et plus

encore lors des périodes de stockage, le microbiote du levain est soumis à des conditions stressantes. En effet, lorsque le levain est stocké, il n'y a plus d'apport en nutriments créant ainsi un déficit nutritionnel. De plus, le stockage du levain provoque une diminution de sa température et de son pH exposant les bactéries lactiques à des pH et des températures qui ne leur sont plus optimales. La réponse à ce stress peut être spécifique. Pour contrer les effets induits par la diminution de la température, les bactéries ont développé une réponse adaptative transitoire. Les bactéries lactiques continuent leur croissance à des températures inférieures à 20 °C à leur température optimale de croissance (De Angelis and Gobbetti, 2004). La croissance de *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. alimentarius* et *L. fructivorans* a été observée dans un hydrolysate de farine de blé, à 15°C. Leur temps de latence a augmenté de 2 à 5 heures et leur temps de génération de 10 à 18 heures. Une série de 14 à 18 protéines (CSP, *cold-shock proteins*) ont été synthétisées par ces bactéries pour s'adapter aux basses températures. Ces protéines sont exprimées afin de maintenir la fluidité de la membrane (en augmentant la proportion d'acides gras courts et / ou insaturés), de maintenir le super enroulement de l'ADN et de maintenir la transcription et la traduction nécessaire à l'adaptation cellulaire aux basses températures (Van de Guchte et al., 2002).

De manière analogue, les bactéries lactiques ont mis en place des mécanismes de réponse au stress acide. Des travaux ont montré qu'après une croissance à un pH de 6,4, le taux de survie des cellules de *L. sanfranciscensis* CB1 diminuait considérablement à pH 3,2 ou 3,4. Une meilleure survie est observée quand la diminution du pH passe par une phase d'adaptation à pH 5,0 pendant une heure avant que les cellules soient exposées à un pH plus faible. Pendant la phase d'adaptation à pH 5,0, il a été observé que 15 protéines (ASP, *acid-shock proteins*) avaient été sur-exprimées par la bactérie (De Angelis et al., 2001). De plus, des voies métaboliques spécifiques d'utilisation de la glutamine et de l'arginine sont mises en place afin que les bactéries lactiques puissent répondre au stress acide. En effet, une étude a montré que des souches de *L. sanfranciscensis* et *L. reuteri* sont capables de convertir la glutamine en glutamate, à l'aide de la glutaminase, générant ainsi la production d'ammoniac qui limite la diminution du pH intracellulaire (Vermeulen et al., 2007). D'autres bactéries lactiques possèdent toutes les enzymes nécessaires à cette voie métabolique où l'arginine est convertie en ornithine et ammoniac, avec la consommation de deux protons ce qui permet à la cellule d'économiser l'ATP nécessaire à la libération d'un proton. (De Angelis et al., 2002; Rollan et al., 2003; Vrancken et al., 2009).

Alors que l'adaptation au stress acide et à la diminution de la température a été largement étudiée, la limitation en nutriments par les micro-organismes a donné lieu à très peu de travaux. Le maltose est la principale source de carbone présente dans le levain. Il est utilisé par certaines bactéries lactiques, telle que *L. sanfranciscensis*, et est converti en glucose qui sera, à son tour, utilisé par d'autres micro-organismes telles que les levures, ou d'autres bactéries lactiques. Lorsque tout le glucose est consommé, les micro-organismes présents dans le levain utilisent alors d'autres sources d'énergie telles que les acides aminés, le ribose et le désoxyribose (Gänzle and Gobbetti, 2013).

4.32 - Interactions nutritionnelles entre les micro-organismes

Globalement, la microflore du levain reste stable au cours du temps en raison, sans doute, de l'absence de compétitions nutritionnelles entre les flores et de l'existence d'interactions positives (proto-coopération) au sein de l'écosystème microbien. L'exemple le plus connu est celui de *L. sanfranciscensis* et de *C. humilis*. En effet, le maltose est le sucre utilisé par *L. sanfranciscensis* comme source de carbone alors que les levures comme *C. humilis* sont dites maltose-négatives, c'est-à-dire que leur métabolisme n'est pas adapté pour utiliser ce sucre. Grâce à sa maltose phosphorylase, *L. sanfranciscensis* hydrolyse le maltose en glucose-phosphate, puis en en glucose excrété dans le milieu. Ce glucose est alors utilisé par *C. humilis* (Stolz et al., 1996). D'autres exemples d'associations stables et positives ont été montrées entre *L. sanfranciscensis* et *K. exigua* ou *K. barnetti* qui sont également des levures maltose-négatives (Corsetti and Settanni, 2007; Iacumin et al., 2009; Vrancken et al., 2010). Il existe également des associations stables entre les bactéries incluant *L. sanfranciscensis* avec *L. plantarum*, *L. (par)alimentarius* ou *L. brevis* (Corsetti et al., 2001; Paramithiotis et al., 2006; Siragusa et al., 2009). De plus, des travaux ont démontré que la croissance des bactéries lactiques est positivement influencée par l'excrétion d'acides aminés ou de petits peptides par les levures (Gobbetti and Corsetti, 1997) ou l'autolyse des cellules levuriennes (Zambonelli et al., 2000).

Ainsi les interactions positives entre les bactéries lactiques et les levures présentes dans le levain sont la clé de sa stabilité au cours du temps.

4.33 - Stabilité intrinsèque des micro-organismes du levain et diversité intraspécifique

La microflore des levains apparaît stable au cours du processus de panification lui-même, du levain chef à la pâte (Lhomme et Urien et al., 2016a). Différents travaux montrent également une certaine stabilité dans le temps de la microflore des levains au niveau espèce (Huys et al., 2013). La prédominance de *L. sanfranciscensis* dans les levains de panification, considérée comme la bactérie-clé de cet écosystème (Gobbetti and Corsetti, 1997), met en évidence la pression de sélection due aux conditions environnementales (température relativement stable, rafraîchis continus) appliquées lors de l'entretien du levain (Corsetti et al., 2001; Kline and Sugihara, 1971). Il faut noter une diversité intraspécifique au sein de l'espèce *L. sanfranciscensis* sur des levains provenant de différents boulangers et au sein d'un même levain (Lhomme et al., 2016b). Récemment, le génome de *L. sanfranciscensis* TMW 1.1304, isolé d'un levain industriel, a été séquencé (Vogel et al., 2011). Ces travaux montrent que, bien que le génome de *L. sanfranciscensis* (1,3 Mb) soit un des plus petits parmi les espèces du genre *Lactobacillus*, avec sept copies du gène codant pour l'ADNr 16S, il possède un nombre élevé d'opérons de l'ARN ribosomal. Ce résultat est corrélé par les auteurs au fait que cette bactérie ait une croissance rapide et une mise en place rapide du métabolisme fermentaire. De plus, l'étude complète de son génome contribue à mettre en évidence une grande capacité de cette bactérie à être plus compétitive que les autres bactéries avec, par exemple, une capacité à synthétiser des acides aminés peu abondants dans les céréales et donc le levain. Cependant, la capacité de *L. sanfranciscensis* à perdurer dans le levain semble être dépendante de la souche. En effet, la structure et la stabilité de la microflore d'un levain ont été étudiées pendant 10 jours où le levain a été rafraîchi quotidiennement. Dans cette étude, neuf levains ont été inoculés chacun par une souche différente de *L. sanfranciscensis*. Dans trois des levains, *L. sanfranciscensis* s'est implantée et est dominante. Dans les six autres, les souches de *L. sanfranciscensis* inoculées n'ont pas réussi à s'implanter face à la flore endogène qui est restée majoritaire (Siragusa et al., 2009). Une étude similaire a montré que cinq souches de *L. plantarum* sur sept ont persisté après 10 jours de rafraîchi (Minervini et al., 2010). D'autres travaux ont permis d'observer la capacité de certaines souches de bactéries lactiques, utilisées comme starters, à s'adapter et à persister au cours de l'entretien d'un levain (Vogelmann et al., 2009).

4.34 - Interactions antagonistes entre les micro-organismes du levain

La persistance de souches telles que celles de l'espèce *L. plantarum* dans les levains peut être attribuée à plusieurs facteurs. Elle peut s'expliquer, tout d'abord, par la capacité de ces souches à utiliser aussi bien le maltose, la principale source de carbone dans les levains, que d'autres sources de carbone, présentes en plus faible quantité telle que le pentose ou encore d'autres sources d'énergie comme les acides aminés.

De plus, ces souches de *L. plantarum* sont capables de produire des composés antimicrobiens tels que le diacetyl et le peroxyde d'hydrogène mais aussi des bactériocines (Gobbetti et al., 2005). Les plantaricines sont actives durant toute la fermentation et peuvent agir contre d'autres souches de *L. plantarum* (Todorov et al., 1999). Certaines souches produisent la plantaricine A (plnA) qui inhibe certaines souches de *L. sanfranciscensis* (Di Cagno et al., 2010a).

Certaines bactériocines, telle que la lacticine-3147 produite par *Lc. lactis* M30 a montré une activité inhibitrice aux faibles pH auxquels le levain est soumis. Par ailleurs, il a été observé que cette souche persistait dans le levain après 20 jours de rafraîchi, sans pour autant affecter la croissance de *L. sanfranciscensis* CB1 qui confère de bonnes caractéristiques à la pâte (Settanni et al., 2005). De même, la souche de *L. amylovorus* DCE 471, par sa production de bactériocine, est compétitive dans le levain de type II, produit à l'échelle du laboratoire (10 L) ou industrielle (100 L) (Leroy et al., 2007). Finalement, *L. reuteri* LTH2584, isolée d'un levain industriel en 1988, a montré que, grâce à la production de reutéricycline, *L. reuteri* a persisté dans un levain après 10 ans d'entretien, inhibant même des souches de *L. sanfranciscensis* (Gänzle and Vogel, 2003). En somme, les bactéries lactiques du levain peuvent inhiber la croissance d'autres micro-organismes par la production de bactériocines ou d'autres composés anti-microbiens qui peuvent ainsi réguler les interactions microbiennes dans l'écosystème. Les bactériocines ne contribuent pas à une augmentation de la durée de vie du pain mais uniquement à la stabilité de la microflore du levain

4.35 - Stabilité de l'environnement boulanger

L'environnement du levain est une source importante de contamination. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, malgré l'utilisation des mêmes farines et paramètres technologiques, la flore d'un levain dépend de son lieu de rafraîchi (environnement du laboratoire ou environnement boulanger) (Minervini et al., 2012b). Cela a surtout été mis en

évidence pour la contamination d'un levain traditionnel par la levure de boulanger *S. cerevisiae*. En effet, de nombreuses études ont montré que, si le levain a été rafraîchi dans un environnement où la levure de boulanger était utilisée, *S. cerevisiae* devenait présente dans ce levain (Minervini et al., 2012b; Vrancken et al., 2010).

Afin de vérifier si l'environnement boulanger joue également un rôle sur la stabilité de la microflore bactérienne du levain, les farines, les levains et leur environnement boulanger ont été analysés chez deux boulangers belges (D01 et D10) (Scheirlinck et al., 2009). Dans le levain D10, *L. sanfranciscensis* était prédominante, or cette bactérie a également été détectée dans l'air du fournil, sur le plan de travail et le pétrin, démontrant ainsi que cette bactérie était présente partout dans l'environnement boulanger. A l'inverse, les levains échantillonnés dans la boulangerie D01 présentaient une grande diversité avec la présence de *L. paralimentarius*, *L. plantarum* et *L. spicheri*. Ces deux dernières ont été détectées sur les mains du boulanger mais seule *L. plantarum* a été détecté dans l'air. Ces résultats indiquent l'importance de l'air comme élément contaminant du levain. Finalement, l'étude génotypique des isolats de *L. plantarum*, *L. spicheri* et *L. sanfranciscensis* a montré que, pour chacune des espèces identifiées, les isolats appartiennent à la même souche. Ainsi la même souche d'une espèce prédominerait dans un levain et son environnement de rafraîchi. Malgré l'utilisation de différents lots de farine, ces souches ont mis en évidence leur persistance pendant les trois années d'échantillonnage. Les auteurs concluent que cette stabilité est le fruit de l'utilisation des mêmes paramètres de rafraîchis tout au long de ces années mais aussi, et surtout, d'un rôle significatif de l'environnement d'entretien des levains sur la microflore du levain (Scheirlinck et al., 2009).

Globalement ces travaux prouvent que le fournil, avec sa quantité élevée de micro-organismes, peut être une source de levures et de bactéries lactiques qui, selon leur capacité d'adaptation et de compétitivité, peuvent devenir prédominantes dans le levain traditionnel.

En définitive, sur le plan microbiologique, le levain est constitué de levures et de bactéries lactiques, ces dernières appartiennent principalement au genre *Lactobacillus*. Un levain représente un écosystème microbien complexe, siège d'interactions entre les micro-organismes présents au sein d'une matrice elle-même complexe. Ainsi, le levain pourrait être défini comme un bioréacteur où se déroulent de nombreux phénomènes biologiques conduisant à modifier la structure, la texture, la flaveur de la pâte et du produit fini, le pain.

Ces réactions biologiques dépendent des espèces en présence. Ces dernières sont influencées par la diversité de la microflore initiale et des paramètres technologiques utilisés lors de l'élaboration du levain.

Cette thèse a donné lieu à 4 publications :

[Genotypic diversity of Lactobacillus sanfranciscensis strains isolated from French organic sourdough.](#) Emilie Lhomme, Bernard Onno, Victoria Chuat, Karine Durand, Servane Orain, Florence Valence, Xavier Dousset, Marie-Agnès Jacques. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 226, 2 June 2016, Pages 13-19

[Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs.](#) Emilie Lhomme, Anna Lattanzi, Xavier Dousset, Fabio Minervini, Maria De Angelis, Guylaine Lacaze, Bernard Onno, Marco Gobbetti. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 215, 23 December 2015, Pages 161-170

[The predominance of Lactobacillus sanfranciscensis in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics.](#) Emilie Lhomme, Servane Orain, Philippe Courcoux, Bernard Onno, Xavier Dousset. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 213, 20 November 2015, Pages 40-48

[Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes.](#) Emilie Lhomme, Charlotte Urien, Judith Legrand, Xavier Dousset, Bernard Onno, Delphine Sicard. *Food Microbiology*, Volume 53, Part A, February 2016, Pages 41-50 "

Références bibliographiques

- Alfonzo, A., Ventimiglia, G., Corona, O., Di Gerlando, R., Gaglio, R., Francesca, N., Moschetti, G., Settanni, L., 2013. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. *Food Microbiology* 36, 343-354.
- Almeida, M.J., Pais, C.S., 1996. Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Letters in Applied Microbiology* 23, 154-158.
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., Dal Bello, F., 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24, 165-174.
- Aslam, Z., Im, W.-T., Ten, L.N., Lee, M.-j., Kim, K.-H., Lee, S.-T., 2006. *Lactobacillus siliginis* sp. nov., isolated from wheat sourdough in South Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2209-2213.
- Bakers federation of UK, 2013. European bread market (On line).
- 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* 9, e95449.
- Björkroth, J., Dicks, L.M., Endo, A., 2014a. The genus *Weissella*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 417-428.
- Björkroth, J., Dicks, L.M., Endo, A., Holzapfel, W.H., 2014b. The genus *Leuconostoc*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 391-404.
- Bounaix, M.-S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Siméon, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 10889-10897.

-
- Brauman, A., Keleke, S., Malonga, M., Miambi, E., Ampe, F., 1996. Microbiological and biochemical characterization of cassava retting, a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (cassava flour) production. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2854-2858.
- Calvel, R., 1964. Le pain et la panification. Que sais-je? Presses universitaires de France, Paris.
- Calvel, R., 1980. Fermentation et panification au levain naturel. *Industrie des céréales* 7, 27-35.
- Cappelle, S., Guylaine, L., Gänzle, M., Gobbetti, M., 2013. History and social aspects of sourdough, *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, pp. 1-10.
- Carnevali, P., Ciati, R., Leporati, A., Paese, M., 2007. Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology* 24, 150-154.
- Catassi, C., Fasano, A., Elke, K.A., Fabio Dal, B., 2008. 1 - Celiac disease, *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. Academic Press, San Diego, pp. 1-1.
- Chavan, R.S., Chavan, S.R., 2011. Sourdough technology—A traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10, 169-182.
- Chiron, H., Onno, B., 2010a. Etude de la variabilité physico-chimique de pains au levain. *Industrie des céréales* 169, 24-27.
- Chiron, H., Onno, B., 2010b. Radioscopie d'un pain au levain. *Industrie des céréales* 169, 24-27.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M., 2010. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of γ -aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology* 137, 236-245.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Pinto, D., Gobbetti, M., 2011. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Collins, M., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S., 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 595-603.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Smacchi, E., 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology* 13, 447-456.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M., 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 64, 95-104.
- Corsetti, A., Settanni, L., 2007. *Lactobacilli* in sourdough fermentation. *Food Research International* 40, 539-558.
- De Angelis, M., Bini, L., Pallini, V., Cocconcelli, P.S., Gobbetti, M., 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147, 1863-1873.
- De Angelis, M., Damiano, N., Rizzello, C.G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2009. Sourdough fermentation as a tool for the manufacture of low-glycemic index white wheat bread enriched in dietary fibre. *European Food Research and Technology* 229, 593-601.
- De Angelis, M., Di Cagno, R., Gallo, G., Curci, M., Siragusa, S., Crecchio, C., Parente, E., Gobbetti, M., 2007a. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology* 114, 69-82.
- De Angelis, M., Gallo, G., Corbo, M.R., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Giovine, M., Gobbetti, M., 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *International Journal of Food Microbiology* 87, 259-270.
- De Angelis, M., Gobbetti, M., 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4, 106-122.
- De Angelis, M., Mariotti, L., Rossi, J., Servili, M., Fox, P.F., Rollán, G., Gobbetti, M., 2002. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 6193-6201.
- De Angelis, M., Rizzello, C.G., Alfonsi, G., Arnault, P., Cappelle, S., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2007b. Use of sourdough lactobacilli and oat fibre to decrease the glycaemic index of white wheat bread. *British Journal of Nutrition* 98, 1196-1205.
- De Angelis M., Carlo G. Rizzello, Alessio Fasano, Maria G. Clemente, Claudio De Simone, Marco Silano, Massimo De Vincenzi, Ilario Losito, Marco Gobbetti, 2006 b. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue probiotics and gluten intolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1762, Issue 1, January, 80-93
- De Angelis M., Rossana Coda, Marco Silano, Fabio Minervini, Carlo G. Rizzello, Raffaella Di Cagno, Olimpia Vicentini, Massimo De Vincenzi, Marco Gobbetti, 2006b. Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *Journal of Cereal Science*, Volume 43, Issue 3, 301-314

-
- De Tonnac, J.-P., 2010. Dictionnaire universel du pain. Robert Laffont.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., Pot, B., 1996. Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin Amylovorin L471. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 9-20.
- De Vuyst, L., Neysens, P., 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology* 16, 43-56.
- 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 Microbiology* 37, 11-29.
- De Vuyst, L., Vancanneyt, M., 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 120-127.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J., 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, Bacteriocins of lactic acid bacteria. Springer, pp. 91-142.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S., 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26, 666-675.
- Decock, P., Cappelle, S., 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology* 16, 113-120.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 33, 1-10.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Calasso, M., Vincentini, O., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., De Vincenzi, M., Dessì, M.R., Guerzoni, M.E., Gobbetti, M., 2010a. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics* 10, 2175-2190.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Corsetti, A., Lavermicocca, P., Arnault, P., Tossut, P., Gallo, G., Gobbetti, M., 2003. Interactions between sourdough lactic acid bacteria and exogenous enzymes: effects on the microbial kinetics of acidification and dough textural properties. *Food Microbiology* 20, 67-75.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Lavermicocca, P., De Vincenzi, M., Giovannini, C., Faccia, M., Gobbetti, M., 2002. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 623-633.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciatì, R., Gobbetti, M., 2006. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 9873-9881.
- Drapron, R., Richard-Molard, D., 1979. Influence de divers procédés technologiques sur la formation de l'arôme du pain. Répercussions sur sa qualité. *Le pain*, 143-161.
- Ehrmann, M.A., Müller, M.R.A., Vogel, R.F., 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 7-13.
- Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 1998. Maltose metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis*: cloning and heterologous expression of the key enzymes, maltose phosphorylase and phosphoglucosyltransferase. *FEMS Microbiology Letters* 169, 81-86.
- Ercolini, D., 2013. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 3148-3155.
- Food and Agriculture Organization (FAO) 2010 . FAO database (on line)
- Foschino, R., Terraneo, R., Mora, D., Galli, A., 1999. Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Italian Journal of Food Science* 11, 19-28.
- Galey, C., Potus, J., Drapron, R., Poiffait, A., Bar, C., Fischer, J., 1994. Les composés volatils de la mie du pain: étude de quelques facteurs de variation et conséquences sur l'arôme. *Industries des Céréales*.
- Gallagher, E., Gormley, T.R., Arendt, E.K., 2003. Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *Journal of Food Engineering* 56, 153-161.
- Galle, S., Arendt, E.K., 2013. Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, 891-901.
- Gänzle, M., Gobbetti, M., 2013. Physiology and biochemistry of lactic acid bacteria, *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, pp. 183-216.
- Gänzle, M.G., Ehmann, M., Hammes, W.P., 1998. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2616-2623.
- Gänzle, M.G., Hölzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W.P., 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4325-4333.

-
- Gänzle, M.G., Loponen, J., Gobbetti, M., 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends in Food Science & Technology* 19, 513-521.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F., 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24, 128-138.
- Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2003. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 80, 31-45.
- Gobbetti, M., 1998. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology* 9, 267-274.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., 1997. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. *Food Microbiology* 14, 175-188.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R., 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 16, 57-69.
- Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Corsetti, A., Santinelli, F., Rossi, J., Damiani, P., 1995. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiology* 12, 497-507.
- Gobbetti, M., Simonetti, M.S., Rossi, J., Cossignani, L., Corsetti, A., Damiani, P., 1994. Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. *Journal of Food Science* 59, 881-884.
- Greco L., Marco Gobbetti, Renata Auricchio, Raffaella Di Mase, Francesca Landolfo, Francesco Paparo, Raffaella Di Cagno, Maria De Angelis, Carlo Giuseppe Rizzello, Angela Cassone, Gaetano Terrone, Laura Timpone, Martina D'Aniello, Maria Maglio, Riccardo Troncone, Salvatore Auricchio, 2011. Safety for Patients With Celiac Disease of Baked Goods Made of Wheat Flour Hydrolyzed During Food Processing. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Volume 9, Issue 1, 24-29
- Gu, C.T., Li, C.Y., Yang, L.J., Huo, G.C., 2013. *Lactobacillus mudanjiangensis* sp. nov., *Lactobacillus songhuajiangensis* sp. nov. and *Lactobacillus nenjiangensis* sp. nov., isolated from Chinese traditional pickle and sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, S.D., Delorme, C., 2001. Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology* 183, 3614-3622.
- Guerzoni, M.E., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Gianotti, A., Lanciotti, R., 2007. Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli-yeasts interactions. *Food Microbiology* 24, 139-148.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83, 764-770.
- Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F.H., Vogelmann, S.A., 2005. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* 16, 4-11.
- Hammes, W.P., Gänzle, M.G., 1997. Sourdough breads and related products, in: Wood, B.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Springer US, pp. 199-216.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*, The genera of lactic acid bacteria. Springer, pp. 19-54.
- Hansen, A., Schieberle, P., 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology* 16, 85-94.
- Holzapfel, W.H., Haberger, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365s-373s.
- Humblot, C., Guyot, J.-P., 2009. Pyrosequencing of Tagged 16S rRNA Gene Amplicons for Rapid Deciphering of the Microbiomes of Fermented Foods Such as Pearl Millet Slurries. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 4354-4361.
- Huys, G., Daniel, H.-M., De Vuyst, L., 2013. Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria, *Handbook on Sourdough Biotechnology*. Springer, pp. 105-154.
- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S., Comi, G., 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 26, 128-135.
- Jänsch, A., Korakli, M., Vogel, R.F., Gänzle, M.G., 2007. Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451^T: contribution to oxygen tolerance and thiol exchange reactions in wheat sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4469-4476.

-
- Jeong, S.H., Lee, H.J., Jung, J.Y., Lee, S.H., Seo, H.-Y., Park, W.-S., Jeon, C.O., 2012. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 160, 252-259.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.-W., Hahn, Y., Madsen, E.L., Jeon, C.O., 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2264-2274.
- Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K.H., Autio, K., Flander, L., Poutanen, K., 2005. Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology* 16, 104-112.
- Kitts, D.D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1309-1323.
- Kline, L., Sugihara, T.F., 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. *Applied Microbiology* 21, 459-465.
- Klingler, J.M., Stowe, R.P., Obenhuber, D.C., Groves, T.O., Mishra, S.K., Pierson, D.L., 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2089-2092.
- Korakli, M., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2002. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Journal of Applied Microbiology* 92, 958-965.
- Kulp, K., 2003. Baker's yeast and sourdough technologies in the production of US bread products. *Food science and technology-New York-Marcel Dekker*, 97-144.
- Kunji, E.R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., Konings, W.N., 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 187-221.
- Kurtzman, C.P., 2003. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Research* 4, 233-245.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 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 Research* 8, 939-954.
- Lappi, J., Selinheimo, E., Schwab, U., Katina, K., Lehtinen, P., Mykkänen, H., Kolehmainen, M., Poutanen, K., 2010. Sourdough fermentation of wholemeal wheat bread increases solubility of arabinoxylan and protein and decreases postprandial glucose and insulin responses. *Journal of Cereal Science* 51, 152-158.
- Larsen, A.G., Vogensen, F.K., Josephsen, J., 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 113-122.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4084-4090.
- Leroy, F., De Winter, T., Remedios, M., Moreno, F., De Vuyst, L., 2007. The bacteriocin producer *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is a competitive starter culture for type II sourdough fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87, 1726-1736.
- Lhomme E., Anna Lattanzi, Xavier Dousset, Fabio Minervini, Maria De Angelis, Guylaine Lacaze, Bernard Onno, Marco Gobbetti, 2015a. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 215, 23 December 2015, 161-170
- Lhomme E., Servane Orain, Philippe Courcoux, Bernard Onno, Xavier Dousset, 2015b. The predominance of *Lactobacillus sanfranciscensis* in French organic sourdoughs and its impact on related bread characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 213, 20 November 2015, 40-48
- Lhomme, E., Urien, C., Legrand, J., Dousset, X., Onno, B., Sicard, D., 2016a. Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes. *Food Microbiology*., 19th Meeting of the Club des Bactéries Lactiques 53, Part A, 41-50.
- Lhomme E., Bernard Onno, Victoria Chuat, Karine Durand, Servane Orain, Florence Valence, Xavier Dousset, Marie-Agnès Jacques, 2016b. Genotypic diversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from French organic sourdoughs. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 226, Pages 13-19
- Lönner, C., Welander, T., Molin, N., Dostalek, M., Blickstad, E., 1986. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiology* 3, 3-12.
- Loponen, J., Mikola, M., Katina, K., Sontag-Strohm, T., Salovaara, H., 2004. Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. *Cereal Chemistry Journal* 81, 87-93.

-
- Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2003a. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7453-7461.
- Meroth, C.B., Hammes, W.P., Hertel, C., 2004. Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 151-159.
- Meroth, C.B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M.J., Hammes, W.P., 2003b. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 475-482.
- Messens, W., Neysens, P., Vansieleghem, W., Vanderhoeven, J., De Vuyst, L., 2002. Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1431-1435.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Pinto, D., Siragusa, S., Rizzello, C.G., Gobbetti, M., 2010. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiology* 27, 897-908.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M., 2012a. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1251-1264.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2012b. Influence of artisan bakery- or laboratory- propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5328-5340.
- Moore, M.M., Juga, B., Schober, T.J., Arendt, E.K., 2007. Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread, *Cereal Chemistry Journal*. Scientific Societies, pp. 357-364.
- Moore, M.M., Schober, T.J., Dockery, P., Arendt, E.K., 2004. Textural Comparisons of Gluten-Free and Wheat-Based Doughs, Batters, and Breads, *Cereal Chemistry Journal*. Scientific Societies, pp. 567-575.
- Moroni, A.V., Arendt, E.K., Bello, F.D., 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology* 28, 497-502.
- Moroni, A.V., Arendt, E.K., Morrissey, J.P., Bello, F.D., 2010. Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *International Journal of Food Microbiology* 142, 142-148.
- Moroni, A.V., Dal Bello, F., Arendt, E.K., 2009. Sourdough in gluten-free bread-making: An ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology* 26, 676-684.
- Müller, M.R.A., Wolfrum, G., Stolz, P., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2001. Monitoring the growth of *Lactobacillus* species during a rye flour fermentation. *Food Microbiology* 18, 217-227.
- Observatoire du Pain. 2011. (on line)
- Onno, B., Roussel, P., 1994. Technologie et microbiologie de la panification au levain.
- Onno, B., Valcheva, R., Dousset, X., 2009. Les levains de panification : un écosystème microbien céréalier complexe et des fonctionnalités spécifiques, *Bactéries lactiques. Physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles*. Economica, pp. 381-401.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G., 2006. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry* 41, 2429-2433.
- Paramithiotis, S., Müller, M.R.A., Ehrmann, M.A., Tsakalidou, E., Seiler, H., Vogel, R., Kalantzopoulos, G., 2000. Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 156-164.
- Pepe, O., Villani, F., Oliviero, D., Greco, T., Coppola, S., 2003b. Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. *International Journal of Food Microbiology* 84, 319-326.
- Pot, B., 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria, *De la génétique aux ferments*. Paris: Lavoisier, pp. 1-109.
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K., 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology* 26, 693-699.
- Pozo-Bayón, M., Guichard, E., Cayot, N., 2006. Flavor control in baked cereal products. *Food Reviews International* 22, 335-379.
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., Giudici, P., 2004. Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology* 38, 113-117.
- Rapport Agence Bio , 2010. Baromètre de consommation et de perception des produits biologiques. (on line)
- Ravyts, F., Vuyst, L.D., Leroy, F., 2012. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences* 12, 356-367.

-
- Reale, A., Konietzny, U., Coppola, R., Sorrentino, E., Greiner, R., 2007. The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2993-2997.
- Rizzello, C.G., Cassone, A., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2008. Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6936-6943.
- Rizzello, C.G., Coda, R., Mazzacane, F., Minervini, D., Gobbetti, M., 2012a. Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Research International* 46, 304-313.
- Rizzello, C.G., Nionelli, L., Coda, R., Gobbetti, M., 2012b. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutrition and Cancer* 64, 111-120.
- Robert, H., Gabriel, V., Fontagné-Faucher, C., 2009. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology* 135, 53-59.
- Rollan, G., Lorca, G.L., Font de Valdez, G., 2003. Arginine catabolism and acid tolerance response in *Lactobacillus reuteri* isolated from sourdough. *Food Microbiology* 20, 313-319.
- Roussel, P., Chiron, H., 2005. Les pains français: évolution, qualité, production, Sciences et Technologie des Métiers de Bouche. Maé-Erti, Vesoul.
- Ryan, L.A.M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., Arendt, E.K., 2011. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology* 146, 276-283.
- Schaack, D., Lernoud, J., Schlatter, B., Willer, H., 2014. The organic market in Europe 2012. *The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends*, 200-206.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2009. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1081-1092.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Cleenwerck, I., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L., Vancanneyt, M., 2007a. *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 223-227.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L., Vancanneyt, M., 2007b. *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1461-1467.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2007c. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6262-6269.
- Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Taxonomic structure and stability of the bacterial community in Belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2414-2423.
- Schieberle, P., 1996. Intense aroma compounds: Useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma. *Advances in Food Sciences* 18, 237-244.
- Schnürer, J., Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16, 70-78.
- Schwab, C., Mastrangelo, M., Corsetti, A., Gänzle, M., 2008. Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. *Cereal Chemistry Journal* 85, 679-684.
- Settanni, L., Massitti, O., Van Sinderen, D., Corsetti, A., 2005. *In situ* activity of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain. Influence on the interactions between lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 99, 670-681.
- Sicard, D., Legras, J.-L., 2011. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies* 334, 229-236.
- Simonson, L., Salovaara, H., Korhola, M., 2003. Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. *Food Microbiology* 20, 193-199.
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L., 2010. Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology* 21, 168-180.
- Siragusa, S., Di Cagno, R., Ercolini, D., Minervini, F., Gobbetti, M., De Angelis, M., 2009. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I

propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. Applied and Environmental Microbiology 75, 1099-1109.

-Stolz, P., Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1996. Maltose-phosphorylase and hexokinase activity in *lactobacilli* from traditionally prepared sourdoughs. Parlar Scientific Publications, Freising, Allemagne.

-Surget, A., Barron, C., 2005. Histologie d'un grain de blé. Industrie des céréales 145, 3-7.

Tanigawa, K., Watanabe, K., 2011. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. Microbiology 157, 727-738.

-Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. Cereal Chemistry Journal 79, 45-51.

-Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2003. Fluorescence Labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerization during dough processing and sourdough fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 2745-2752.

-Tieking, M., Gänzle, M.G., 2005. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. Trends in Food Science & Technology 16, 79-84.

-Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I., Dousset, X., 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. International Journal of Food Microbiology 48, 167-177.

-Valcheva, R., Ferchichi, M.F., Korakli, M., Ivanova, I., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., Prévost, H., Onno, B., Dousset, X., 2006. *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 587-591.

-Valcheva, R., Korakli, M., Onno, B., Prévost, H., Ivanova, I., Ehrmann, M.A., Dousset, X., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2005. *Lactobacillus hammesii* sp. nov., isolated from French sourdough. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 763-767.

-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). Antonie van Leeuwenhoek 97, 119-129.

-Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., Maguin, E., 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 82, 187-216.

-Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2007. Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. Applied and Environmental Microbiology 73, 4741-4750.

-Vancanneyt, M., Neysens, P., De Wachter, M., Engelbeen, K., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Van der Meulen, R., Hoste, B., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., Swings, J., 2005. *Lactobacillus acidifarinae* sp. nov. and *Lactobacillus zymae* sp. nov., from wheat sourdoughs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55, 615-620.

-Vermeulen, N., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2006a. Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 3832-3839.

-Vermeulen, N., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2007. Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology 103, 1197-1205.

-Vermeulen, N., Kretzer, J., Machalitza, H., Vogel, R.F., Gänzle, M.G., 2006b. Influence of redox-reactions catalysed by homo- and hetero-fermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. Journal of Cereal Science 43, 137-143.

-Vermeulen, N., Pavlovic, M., Ehrmann, M.A., Gänzle, M.G., Vogel, R.F., 2005. Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM 20451T during growth in sourdough. Applied and Environmental Microbiology 71, 6260-6266.

-Vernocchi, P., Valmorri, S., Gatto, V., Torriani, S., Gianotti, A., Suzzi, G., Guerzoni, M.E., Gardini, F., 2004. A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. Food Research International 37, 469-476.

-Vogel, R., Pavlovic, M., Ehrmann, M., Wiezer, A., Liesegang, H., Offschanka, S., Voget, S., Angelov, A., Bocker, G., Liebl, W., 2011. Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. Microbial Cell Factories 10, S6.

-Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R.A., Steudel, U., Gänzle, M.G., Ehrmann, M.A., 1999. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. Antonie van Leeuwenhoek 76, 403-411.

-Vogelmann, S.A., Hertel, C., 2011. Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. Food Microbiology 28, 583-589.

-
- Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J., Hertel, C., 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology* 130, 205-212.
- 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 Research* 10, 471-481.
- Vrancken, G., Rimaux, T., Weckx, S., Leroy, F., De Vuyst, L., 2011b. Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2716-2726.
- Vrancken, G., Rimaux, T., Wouters, D., Leroy, F., De Vuyst, L., 2009. The arginine deiminase pathway of *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 responds to growth under stress conditions of both temperature and salt. *Food Microbiology* 26, 720-727.
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L., 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology* 27, 1000-1008.
- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., L  hteenm  ki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., von Wright, A., 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology* 15, 498-505.
- Willer, H., Kilcher, L., 2013. The world of organic agriculture 2013. Frick and Bonn, IFOAM&FiBL.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
- Wolter, A., Hager, A.-S., Zannini, E., Czerny, M., Arendt, E.K., 2014. Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking properties and sensory profile of gluten-free and wheat breads. *International Journal of Food Microbiology* 172, 83-91.
- Woodward, J., 2007. Coeliac disease. *Medicine* 35, 226-230.
- Wouters, D., Grosu-Tudor, S., Zamfir, M., De Vuyst, L., 2013. Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations. *J Sci Food Agric* 93, 749-760.
- Zambonelli, C., Rainieri, S., Chiavari, C., Montanari, G., Benevelli, M., Grazia, L., 2000. Autolysis of yeasts and bacteria in fermented foods. *Italian Journal of Food Science* 12, 9-21.
- Zhang, G., Hamaker, B.R., 2009. Slowly digestible starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 852-867.