

# Une initiative du Fonds de Dotation Ekip

*Le Fonds\* a été créé en 2014 à l'initiative des équipementiers du secteur de la Boulangerie et des Métiers de Bouche.*

*Ses missions sont les suivantes :*

- la promotion et la diffusion de la culture française dans les pays émergents,*
- la conduite d'actions solidaires et humanitaires,*
- l'accompagnement des entreprises du secteur dans la connaissance et la diffusion de l'innovation et du développement technologique.*

*C'est à ce titre qu'il a organisé le 28 novembre 2016 à Paris le colloque « Le pain au levain, entre tradition et modernité »*

*Compte tenu de la place centrale occupée par l'ouvrage « Handbook of Sourdough Biotechnology »\*\* co-édité par Michael Gänzle et Marco Gobetti, il a été décidé de procéder à la traduction partielle en français d'une sélection de 7 chapitres parmi les 12 que comporte l'ouvrage.*

*C'est cette traduction, reproduite en version limitée à 200 exemplaires avec l'autorisation de l'éditeur, qui est offerte aux participants du colloque et que vous avez pu télécharger.*

*Elle a été coordonnée par Bettina Balmer et validée sur un plan scientifique par Hubert Chiron (INRA) et Bernard Onno (ONIRIS).*

*Je souhaite qu'elle participe à une meilleure connaissance des fermentations à base de levain, méthode ancestrale dont on découvre l'intérêt un peu plus chaque jour, et qu'elle permette ainsi le développement de nouveaux produits ou équipements dans notre filière.*

*Le Président du Fonds de dotation Ekip  
Patrice Jacquelin*

\* Ekip, « les équipementiers du goût » Association professionnelle des fabricants équipementiers français pour les secteurs de la Boulangerie, Pâtisserie et Métiers de bouche

\*\* Ouvrage d'origine en langue anglaise :

Handbook of Sourdough Biotechnology

Edition : Springer 2013

305 pages

*Ce chapitre vient en substitution au 1<sup>er</sup> chapitre (non traduit) du livre de MM. Gobbetti et Gänzle relatif à l'histoire et aux aspects sociaux du levain. Il permettra de situer l'évolution des techniques de fermentation au levain dans le contexte français.*

## **Fermentation au levain et boulangerie française**

**Hubert Chiron - INRA Nantes**

Difficile d'affirmer avec précision la date et le lieu de découverte de la fermentation du pain au levain naturel. La thèse de l'oubli puis du réemploi d'un morceau de pâte aigri dans la pétrissée du lendemain est mentionnée par Malouin et Boland. Quoi qu'il en soit, au Proche Orient, les civilisations sumériennes et égyptiennes, grandes productrices d'orge et de blé, sont fréquemment mentionnées comme pionnières. Le levain, ce ferment puissant et robuste mais parfois capricieux interpellait au point d'être chargé de symboles religieux et laïcs. Associé à la cuisson dans un four, il ouvre l'ère de pains à section plus épaisse, se différenciant nettement des pains plats.

Considéré comme une nouveauté en Grèce au VI<sup>e</sup> siècle avant notre ère, le pain au levain a joui à ses débuts, d'un statut de mets de choix (car plus élaboré que les galettes azymes) et il était par conséquent réservé aux élites (Amouretti). Vers 1560 Bruyerin Champier indique que le levain est utilisé dans la plupart des pays du monde chrétien et qu'il y a un consensus chez les médecins sur le fait que le levain rend le pain salubre et convenable. Il signale également que le pain des flamands est plus léger que celui des français en évoquant l'utilisation de levure de bière.

Le pain au levain résulte donc d'une très longue filiation de pratiques tout d'abord ménagères, rurales puis boulangères. Utiliser le levain est une chose, savoir le conduire, le maîtriser nécessite beaucoup de pratique et d'expérience. Malouin et Parmentier les deux grands auteurs de manuels de boulangerie du XVIII<sup>e</sup> siècle sont unanimes : malgré les contraintes qu'il impose, « c'est au levain que l'on doit la perfection du pain » !

La farine contient intrinsèquement mais en faible quantité, des bactéries lactiques, des levures et beaucoup de nutriments. Après avoir été hydratée durant le pétrissage, différentes activités enzymatiques s'enclenchent et produisent des substrats pour les levures et les bactéries pré-existantes. Après plusieurs pétrissages espacés de quelques heures et un entreposage à température modérée, ces deux populations microbiennes évoluent en symbiose et se multiplient.

Il en résulte une production de dioxyde de carbone et une acidification plus ou moins marquée selon les paramètres du procédé de fabrication (pourcentage de levain, température de la pâte et de l'enceinte de fermentation, durée totale de la panification) ainsi qu'une maturation du réseau de gluten. Tant que les rafraîchis sont effectués régulièrement, avec une farine suffisamment riche en nutriments, le levain demeure actif et la souche est particulièrement stable dans le temps.

### **Pain domestique.**

Dans les ménages au fil des siècles, plusieurs aliments céréaliers ont coexisté : bouillies, flans, pâtes alimentaires et galettes (Maurisio). Mais comme le note Malouin, la fermentation ayant rendu le pain meilleur sans en augmenter le prix, celui-ci est devenu nourriture commune du peuple.

Même si les informations sur les pratiques ménagères de fabrication du pain au levain sont très fragmentaires, il n'existe pas d'alternative à son usage, excepté dans les régions brassicoles ; Rabelais l'illustre avec cette expression « Qui au soir ne laisse levain, jamais ne fera au matin lever pâte » Les farines utilisées (seigle, méteil, puis farine de blé bise) étaient assurément moins raffinées qu'en ville et les pâtes de consistance ferme étaient prisées car perçues comme donnant des pains plus satiétogènes.

Les conditions de fabrication ne pouvaient pas être aussi cadrées que celles des boulangers et l'hiver par exemple, les pâtons étaient parfois mis à fermenter sous la couette ! Sébillot relève le dicton populaire suivant : « Quand le levain est réussi, le pain est à moitié cuit ». Liébault conseille de renouveler le levain à heures régulières mais la dynamique du levain est mystérieuse et parfois imprévisible ; en Champagne, il arrive que la femme dessine une croix sur le levain (Safac). Dans leurs descriptions des pratiques parisiennes, Malouin et Parmentier portent quant à eux un regard sévère sur les fabrications de pain domestique (levain trop vieux, en trop faible quantité, nombre de rafraîchis insuffisant), compacité, aigreur.

Malgré tout, cette acidité inhérente au levain avait des vertus, elle évitait en effet l'apparition de moisissures sur les gros pains conservés plusieurs semaines, en outre elle palliait, associée aux arômes spécifiques de la souche du levain, l'absence de sel dans les pains de certaines provinces. A l'inverse Beaudeau déplore en 1768, que les pains plus blancs des boulangers aient moins de goût que ceux des particuliers. Pour lui bien que souvent leur pain soit noir et qu'il « aigrisse trop promptement », seul le pain de ménage (donc au levain) est propice à la nourriture du peuple !

Constat assez proche de Payen en 1865 : « Chez les habitants de la campagne il arrive souvent que les levains soient gardés sans que l'on s'en occupe, ils passent alors en fermentation acide, le gluten perd en partie son extensibilité ainsi que sa qualité élastique, la fermentation dégage très peu de gaz, la pâte et la levée fournissent un pain mat bis d'une saveur aigre ».

Tout au long du dix-neuvième siècle, l'arrivée de boulangers commerciaux dans les petites bourgades, et l'instauration de l'échange blé - pain mais aussi les livraisons dans les villages, sonnent le glas des fabrications domestiques de pain au levain.

### **Pain de boulanger**

Les gros pains des boulangers ont longtemps été ensemencés exclusivement au levain naturel et par conséquent la conduite des levains était centrale dans le métier. Parmentier indique que « c'est le levain qui demande le plus de soin et d'habileté, le volume, la blancheur, la légèreté et le bon goût en dépendent ». Malouin mentionne aussi ses effets positifs pour le travail du boulanger « le levain soutien la pâte », il donne de la force aux pâtes à pain. De plus, lors des années à blés humides voire germés, les boulangers augmentent les doses de levain. En 1668 le procès de l'emploi de la levure dans les petits pains haut de gamme dits petits pains à la reine opposera les grands médecins parisiens et finalement en 1670 l'emploi de la levure sera autorisée pour peu qu'elle soit fraîche, de proximité et en appoint du franc levain. (Michot Pétrinet). Ceci illustre aussi le fait que les goûts évoluent, les pains dits de fantaisie se multiplient dans la capitale au XVII<sup>e</sup> siècle ; Morel mentionne un texte de 1699 indiquant que la vente de pain aigre est interdite, en tout cas, à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle l'excès d'acidité dans le pain est unanimement considéré comme un défaut

La mise au point par les boulangers de la méthode à trois rafraîchis augmente les contraintes et le travail mais elle optimise le pouvoir de levée ; elle permet aussi de produire des pains moins acides. L'été, en l'absence de froid artificiel dans les fournils des XVIII<sup>e</sup> et XIX<sup>e</sup> siècles, c'était sans doute la seule option pour maîtriser la vitalité des levains et les garder « jeunes ». Les périodes très chaudes et orageuses étaient la hantise des mitrons qui craignaient de se faire prendre de vitesse par le levain et que celui-ci « gâte les levains », « graisse » la pâte et donne un « goût de sûr ».

Les deux manuels de boulangeries du XVIII<sup>e</sup> siècle, mentionnent une nouveauté : « le travail sur pâte » dans lequel le levain est prélevé sur la pétrissée en cours (peu après le frasage) pour ensemencer la fournée suivante. Pour une analyse très scrupuleuse des diagrammes de conduite des levains de cette période consulter les articles de Marc Dewalque postés sur le site [boulangerie.net](http://boulangerie.net). Dans plusieurs de ses ouvrages, Parmentier affectionne la maxime suivante « grands levains jeunes dans presque tous les temps jamais de vieux levains » et surtout il réfute l'ancienne croyance « plus les levains sont acides plus ils ont de force ».

## Une relation quasi affective

Les expressions utilisées pour définir les différents stades des levains traduisent une relation très personnelle entre le boulanger et son levain.

Les mots employés laissent presque supposer qu'il s'agit d'un être vivant ! Selon les circonstances le levain est qualifié de « jeune », « fort » mais aussi « franc ». Le boulanger le « veille », le « rajeunit » et le levain demande des « soins » pour atteindre « différents degrés de force et de bonté » parfois même il faut le « fatiguer, pour le décharger de sa force ». Mestre Boulanger à Cluis Indre et auteur en 1880 d'un petit traité pratique de boulangerie considère qu'un boulanger « doit avoir soin de son levain comme une nourrice de son nourrisson ».

En conditions normales, le savoir-faire des maîtres boulangers permet de gérer la majorité des aléas du levain comme le confirme Parmentier en 1789: « Il est également au pouvoir du boulanger intelligent de diriger les opérations du levain de brusquer la fermentation ou de la faire naître à volonté de l'animer lorsqu'elle languit ». La surveillance continue et la fréquence des rafraîchis (parfois toutes les quatre heures) constitue une véritable servitude à nouveau soulignée en 1860 par Boland. Ce maître boulanger parisien fait des suggestions pour réduire le nombre des rafraîchis, pestant en même temps contre l'esprit de routine de certains ouvriers.

Le dicton collecté par Sébillot « levain pousse et grossi, tu es la clé de la boulangerie » est bien illustré dans le manuel marseillais de boulangerie rédigé par Rigaud en 1881. En effet cet auteur provençal pour qui « ordinairement les pâtes ont les qualités et les défauts de leur levain » énumère pas moins de quatorze dérivées potentielles du levain, l'une des plus redoutées étant sa sensibilité aux brusques changements de temps.

Insidieusement l'emploi de levure de brasserie fait des émules en boulangerie parisienne. Malouin écrit dans son dictionnaire « le pain qui n'a levé que par le levain simple est sujet à n'être pas assez levé ». Des méthodes de fermentation mixtes : levain plus un complément de levure, font gagner du temps et se généralisent à Paris. Parmentier s'en offusque car selon lui cette levure de brasserie est très irrégulière en qualité, souvent trop rapide. Hors, selon lui, la fermentation panair ne doit en aucun cas être brusquée. Dans les fournils cependant l'usage de la levure progresse tout d'abord sur les fabrications de pain blanc car elle fait gagner du temps et elle est utile l'hiver. En 1834 Vaury relève qu'à Paris la grigne des pains fendus manque peu et il attribue ce résultat à l'emploi de levain jeune additionné d'un peu de levure.

## Le déclin

Lenteur du procédé, incertitude du résultat, difficulté de conduite, moindre adéquation avec les farines de plus en plus blanches font que la conduite de fermentation au levain décline tout d'abord dans les villes.

De nouvelles évolutions du goût des consommateurs urbains vont conduire dans les pays à dominante de consommation pain de blé, à préférer des notes de fermentations plus douces. Ce phénomène est particulièrement marqué en Angleterre (Edlin 1811) qui popularise des méthodes de production de ferments maison à partir de décoction farine de pommes de terre et houblon.

Les boulangers anglais semblent avoir une réelle aversion du pain acide et ils préfèrent cette option de levure maison à la régénération d'un levain traditionnel. Dès 1811 Edlin mentionne l'emploi de carbonate de soude pour faire remonter le pH des pâtes à pain trop acides. Il précise : « là où les habitants ne brassent pas de bière ils font leur levain par la fermentation acéteuse aussi leur pain est-il aigre ». Dessable mentionne l'intérêt des boulangers parisiens pour « le levain doux de bière ». De la même façon, les boulangers du Nord de la France utilisent plus volontiers la levure des brasseries de proximité. La mie de leur pain est d'ailleurs réputée plus régulière ce qui est apprécié pour le tartinage. L'opposition frontale levain équivaut à pain exagérément acide et levure égale pain doux ne date donc pas d'hier et fait l'impasse sur les techniques de conduites de levain qui modulent cette note acide.

Même chose en Autriche Hongrie, ou Franck auteur d'un manuel de boulangerie (1843) recommande un pétrin pour le pain blanc à la levure et un autre pour le pain au levain, il considère en outre que les connaissances d'un boulanger se jugent à sa capacité d'éviter la fermentation aigre et que le levain nuit à la blancheur du pain ! Le déclin du levain est plus lent en France et la production de pain au levain va régresser et se cantonner dans les régions où les consommateurs mangent des gros pains sur plusieurs jours, sans réticence vis-à-vis de la consommation de larges tartines plus fermes. Les boulangers français ne basculent pas pour autant vers des méthodes directes, ils revisitent la méthode dite sur deux rafraîchis ce qui permet un seul retour au fournil l'après-midi au lieu de deux. Différents systèmes d'appareils à levains voient le jour à partir de 1881 (Belloir et Berry) et à partir de 1909 lorsqu'il est question de fermeture hebdomadaire (Lanchon). Ces appareils évitent que les levains ne fermentent trop vite, assurant ainsi plus d'heures de repos consécutives à l'ouvrier boulanger.

### **L'influence viennoise**

Malgré tout, la proportion de levure dans les méthodes mixtes augmente tout d'abord pour les petits pains de luxe (Dessables 1824) puis pour les pains de fantaisie, la levure est appréciée pour la sécurisation de la levée, notamment l'hiver et pour le gain de temps qu'elles procurent.

Les grandes villes sont approvisionnées en levures de grains importées (Hollande et Flandres par exemple) ou du Nord de la France. Il est indéniable que le pouvoir fermentaire et les aptitudes de conservation s'améliorent grandement à partir de la diffusion des levures provenant de distilleries de grains et plus encore après l'adoption des levures issues du procédé viennois sur drêches de céréales (1846), technologie qui va connaître une large diffusion (1872 en France avec la société Springer suivie par d'autres entreprises). Dès lors la promotion de cette nouvelle levure et la logistique de distribution sur le territoire font de rapides progrès. Les boulangers utilisent avec parcimonie cet ingrédient considéré à l'époque comme coûteux et la méthode sur poolish fait des émules dans certains fournils des villes (Macadam, Hendoux). Toutefois les boulangers français resteront très attachés à la texture de mie irrégulière et non pas excessivement régulière ou mousseuse comme le remarque judicieusement Boland. La réticence aux fermentations ultra rapides est donc sur le long terme un élément structurant de la boulangerie française.

La boulangerie française va connaître quasi simultanément deux évolutions majeures dans les caractéristiques de ses matières premières : les farines très blanches issues de la mouture progressive par cylindres associée au tamisage par plansichter et les levures de plus en plus pures grâce aux découvertes de Pasteur et du danois Hansen relatives à la bactériologie, puis le concept de culture pure des souches de levures.

### **Les progrès de la bactériologie**

Dès lors la levure de boulangerie incarnera la modernité et ses cellules pures l'hygiène. Elle sera promue sur plusieurs décennies par les autorités scientifiques du domaine (Arpin, Lindet, Marchoux, mais aussi l'Académie de Médecine). En 1933 Les fabricants de levure promotionnent fort logiquement leur produit en précisant « on ne peut pas remplacer la levure, produit scientifiquement pur et hygiénique, par un « levain de pâte » toujours irrégulier et souvent impur ».

Les pains longs dits de fantaisie, à ne pas confondre avec les petits pains au lait ou de gruau eux aussi appelés viennois, seront tout d'abord fabriqués sur poolish (qualifié de levain en bouillie ou levain viennois par Hendoux). Les lois sociales portant sur l'amélioration des conditions de travail (fermeture hebdomadaire 1906, puis réduction de la durée de travail journalière) portent le coup de grâce à la fermentation au levain naturel. La méthode de fabrication de pain sur direct avec un faible ensemencement en levure et quatre heures minimum de pointage sera mise au point à Paris plus tardivement. Essais en 1905 puis optimisation en 1910 (Brosson) en anticipation d'une interdiction du travail de nuit (Arpin).

## **L'impossible retour**

Dès lors, le pain au levain naturel sans adjonction de levure entre durablement dans un « trou noir ». S'exprimant en 1933 sur les progrès enregistrés en boulangerie Française depuis dix années, Périer grand dirigeant de la Boulangerie française, liste les améliorations des conditions de travail, il n'occulte pas une différence de goût entre les deux types de conduite de fermentation mais verrouille le débat concluant à « l'impossible retour au levain ».

Pour autant la faute n'incombe pas exclusivement aux boulangers, si l'on en croit Dufour auteur en 1935 du livre intitulé *Traité de panification française et parisienne* : selon cet auteur, le consommateur ne veut plus du pain fermenté avec la méthode française surtout pour les pains longs dits de fantaisie ; il ajoute que l'engouement pour les pains ultra-frais voire chauds pénalise aussi la fermentation dite sur levain de pâte « à la française ». Le pain frais et croustillant acheté quotidiennement, éclipse les larges tartines de gros pains consommées rassies parfois dans la soupe. Dufour précise malgré tout que c'est avec le levain de pâte que l'on produit le meilleur pain en France, il est la base de la panification car notre boulangerie produit avant tout du pain français qui exige le travail sur levain de pâte.

Cette évolution majeure connaît quelques exceptions par exemple dans les régions où la consommation de pain de méteil et de pain seigle est ancrée dans les habitudes de consommation. En effet les bénéfices du levain y sont multiples : aptitude à contrer les méfaits d'un début de germination, gonflement des pentosanes, gain de machinabilité, moindre collant et meilleure structure de la mie, goût, conservation.

En France pays gros consommateur de pain, un changement aussi radical des méthodes de fabrication ne pouvait faire l'unanimité ! Certains reprochent l'accélération de la fermentation, d'autres confondent levure de boulangerie et poudres levantes chimiques. Les médecins du courant dits hygiénistes (de type naturopathes) critiquent le pain blanc et préconisent un pain « naturel » issu de farines bises ou complètes. En 1931, diverses fraudes alimentaires alimentent des mouvements de suspicion y compris vis-à-vis du pain et de nombreux ouvrages polémiques préconisent le retour au bon pain d'autrefois. En 1937 Hamp raille ce courant de pensée qualifiant ces prescripteurs « d'antiquaires du pain » Quoiqu'il en soit, la consommation du pain baisse régulièrement, l'image du pain se dégrade « il fait grossir » et tout cela inquiète meuniers et boulangers.

Analysant la situation, Arpin et Bastide signent un article en 1937 intitulé le problème du pain, ils dédouanent la farine de cylindres tout en pointant l'incidence de la conduite de fermentation « l'ancien mode de fabrication a été pour des raisons diverses complètement abandonné et que celui qui lui a été substitué n'est pas encore bien mis au point par les boulangers ». Ils préconisent une grande école de boulangerie faisant écho à la toute nouvelle école de meunerie parisienne.

### **Le levain occulté**

En 1937 le levain ne fait toujours pas recette auprès des scientifiques : Guillemet auteur d'un thèse remarquée sur la fermentation brocarde le levain l'assimilant à un bouillon de culture, parlant même de l'odeur douteuse du pain au levain ». La thématique scientifique du levain n'intéresse quasiment personne en France alors qu'en Allemagne et en ex URSS notamment, des laboratoires étudient attentivement depuis les années 1880 les bactéries lactiques destinées à la boulangerie et des sociétés privées commercialisent soit des poudres de levains depuis 1910 (Bocker, Ireks) soit des agents acidifiants et enfin et surtout des bactéries lactiques sélectionnées. En France en 1950 Bure et Bourdet évoquent l'acidification directe à l'acide lactique et même les starters à l'instar des pratiques utilisées en industrie laitière mais il ne semble pas qu'il y ait eu de notables applications. Les travaux du Cnerna publiés en 1960, mentionnent succinctement des cultures associées (levures et bactéries) mais globalement la commission fermentation fait l'impasse sur l'intérêt de la conduite fermentation au levain. J. Buré y publie toutefois un planning de gestion des levains sur 24 heures. Curieusement, les travaux finlandais établissant un bénéfice nutritionnel en cas d'emploi de farines riche en fibres ne sont pas mentionnés.

Suite au contexte de pénuries des années d'après guerre, R. Calvel développe en 1948 différentes méthodes de panifications au levain dans l'ouvrage Nuret-Calvel, les succédanés en panification. L'édition de 1952 de la boulangerie moderne de R. Calvel comporte également des explications très détaillées de différentes méthodes. Au début des années 1950 l'appellation levain est sujette à bien des interprétations et prête à confusion. Le non enseignement de la méthode dans les cours professionnels fait que certains boulangers confondent parfois pâte pré fermentée et levain.

## Nostalgie du pain d'autrefois

Le pain au levain redevient disponible en un petit nombre de points de vente notamment d'alimentation dite naturelle ou saine. Geoffroy, créateur de la marque La Vie Claire, commercialise dès le début des années 1950 des pains quasi complets fermentés avec du levain. Dans les médias, le pain est l'objet de virulentes attaques durant les années 1950, tant sur le registre de sa valeur nutritionnelle que de sa sécurité alimentaire (empoisonnements de Pont Saint Esprit - Kaplan). La confédération nationale de la Boulangerie considère que certaines de ces accusations sont tellement grossières, diffamantes, qu'elle attaque en justice différents auteurs. De même Nuret, rédacteur en chef du bulletin de l'Ecole de Meunerie, déplore en 1952 ce courant nostalgique qui vante la farine de meule et la fermentation au levain.

L'AFRAN association française de recherche pour une alimentation normale, préconise elle aussi le pain au levain et Pécot dans son livre « Vrai pain vraie santé » (1956), liste ses mérites, et complimente la fabrication de Pierre Poilâne rue du Cherche Midi à Paris. L'intérêt de la fermentation au levain sur la baisse de la teneur en acide phytique des pains complets sera relayé par l'AFRAN et la Vie Claire. La trilogie farine issue d'une mouture par meules de pierre, fermentation au levain et cuisson au feu de bois va durablement s'imposer comme la référence des partisans de la tradition.

Relativement imperceptible aux yeux du grand public, ce mouvement de renaissance de l'intérêt pour le pain au levain s'amplifie avec l'engagement de Raoul Lemaire. Producteur en 1932 d'un pain dit naturel, puis sélectionneur de blés de force, Lemaire promeut un pain revitalisé en 1957 et conçoit une méthode d'agro-biologie avec apport d'algues en 1959. C'est à la fois un des points de départ de l'agriculture biologique en France mais aussi de la farine biologique. Entre 1962 et 1964 le pain Lemaire au levain décolle et on assiste à la mise en place de marques pionnières en farines biologiques telles que Borsa (Couturier devenu Dupuy-Couturier, Decollogne-Lecoq, Lerat, Giraudineau, et Lima en Belgique. Ces pains authentiquement au levain, souvent complets et fréquemment fabriqués par des boulangers non conventionnels, irritent la boulangerie conventionnelle (Gringoire). A sa décharge, les facteurs d'encadrement du prix du pain jusqu'en 1984 et les salaires des ouvriers boulangers payés à la pièce expliquent également la recherche continue de productivité dans les fournils, formule incompatible avec le rythme tranquille de la fermentation au levain.

## **Les pains de campagne**

Les pains au levain ne séduisent qu'un étroit segment de consommateurs tant ils sont denses et typés ; toutefois cette clientèle spécifique est très attachée à ce type de pain. Ces boulangers souvent caricaturés, participent à la sauvegarde du savoir-faire de ce que Marc Dewalque appellera dans les années 1990, l'école française du levain, c'est-à-dire la maîtrise de souches de levain capables d'assurer la levée du pain et un début d'acidification sans aucun recours à la levure de boulangerie du commerce.

En boulangerie classique le levain fait un timide retour à la fin des années 1950 (Roussel-Chiron) avec le succès des pains dits de campagne dans lesquels l'emploi de levain de pâte est assez systématique. Certains arrivent de Bretagne et d'Auvergne sur les marchés de la capitale. A partir de cette période et en l'absence de définition, l'appellation pain au levain, pain sur levain donne fréquemment lieu à des interprétations fantaisistes.

Calvel dans un article célèbre de 1967 dénonce avec virulence les « travestis farinés ». L'année suivante les Grands Moulins de Paris innovent avec la farine prête à l'emploi pain de campagne Moulbie précisant qu'elle contient du levain en poudre qui permet de fabriquer un pain typé tout en produisant rapidement. C'est l'une des premières mentions en France d'une pratique nettement plus ancienne outre Rhin (Bocker, Ireks).

En règle générale, les pains standards des années 1960 et 1970 notamment dans les pays où le secteur industriel est puissant, résultent de l'optimisation de conduites de pétrissage à haute énergie et de fermentation simplifiées et parfois très accélérées. Confrontés au prix du pain courant fixé par les autorités, les artisans français s'engagent dans des gains de productivité. Quelques experts (notamment Calvel et Guinet) prennent la plume pour dénoncer la dérive de la texture traditionnelle du pain français et le déficit de saveur.

## **Pains biologiques**

Le courant écologique qui se développe à la fin des années 1960 génère également des initiatives d'associations très impliquées dans la valorisation de produits biologiques dans de nombreux pays (Allemagne, côte Ouest des Etats Unis). En France, l'association Nature et Progrès met en place à la fin des années 1970 un cahier des charges pain biologique avec une première mention pain au levain sans aucun ajout de levure et une seconde avec une tolérance d'un apport de 0.2% de levure ; (ces travaux mentionnent d'ailleurs des pH de 4.4 à 4.6 pour d'authentiques pains au levain).

C'est l'époque des pionniers de la cause du pain au levain spontané tels que Claude Aubert, Bosse Platière, H. L'helguach, P. Leport, D. Collin, M. Montagne. Difficile évidemment de tous les citer. Ces boulangers, parfois adeptes de courants de pensée telle la macrobiotique ou encore autodidactes, seront nombreux à en faire l'engagement professionnel d'une vie entière.

Ces démarches individuelles de choix de la fermentation au levain dans des pays à dominante pain de blé vont être confortées par des données scientifiques. La première salve de résultats émane de la côte Ouest des Etats Unis. En effet en 1971 Kline et Sugihira publie l'article suivant : Nature of the San Francisco Sour Dough french bread process. Cette étude sur le célèbre pain au levain de la baie de San Francisco (que l'on dit avoir été apporté par un boulanger français basque) ouvre une nouvelle ère de travaux de microbiologiste sur les pains au levain employant de la farine de blé. Cela débouchera en 1996 sur le premier symposium international du levain.

En France les mentalités vis-à-vis du levain évoluent. Le pain au levain Poilâne qui s'est taillé une solide réputation fait des envieux. Lionel Poilâne développe l'entreprise familiale au point que la boulangerie de la rue du Cherche Midi devient un site de visite incontournable pour des boulangers du monde entier.

Dans les années 1970 quelques artisans boulangers (une poignée par département), ou des personnes en reconversion, s'entichent du levain, tel Basile Kamir. Les ventes de pains biologiques au levain ou sur levain... sur les marchés ou en « coopératives bio » prennent de l'ampleur. Calvel publie en 1980 une série d'articles sur la fermentation au levain naturel relatant ses expérimentations. Plusieurs brevets de pains de campagne avec levain, bien que chèrement vendus, fleurissent.

### **Ecole française du levain**

D'autres tels Louis Réthoré et Marc Dewalque s'engagent avec conviction dans cette conduite de fermentation sans filet, le premier interpelle les microbiologistes de l'ENITIA désormais ONIRIS (B. Onno), le second entreprend de collecter, traduire les fameux travaux allemands de Spicher et de les diffuser (Miettes de la bio). Des sociétés telle Philibert voient le jour. L'industriel du pain de mie Jacquet initie un programme de recherche intitulé Ferments céréalières associés qu'il brevète en 1982, il espère pouvoir ainsi supprimer les conservateurs. En 1984, la société Catherine innove en lançant en boulangerie artisanale son « Cathy Levain » qui est présenté comme le premier sur le marché français comme le premier levain en poudre lyophilisé.

Ce nouveau discours favorable au levain comporte quelques contre exemples. Ainsi en 1983, la commission pain et gastronomie des Etats Généraux de la Boulangerie Française fait état d'un certain scepticisme vis à vis du levain. Elle précise qu'un diagramme de fermentation lent à la levure peut également produire un pain qui se conserve et conclut sur le sujet avec une phrase un peu alambiquée : « si le pain au levain a ses mérites, il ne constitue en aucun cas un modèle normatif hors duquel les éléments fondamentaux de la qualité du pain ne peuvent être résumés ».

Durant ces mêmes années 1980, de nombreux agriculteurs soucieux de mieux valoriser leur production de blé démarrent la production de pain souvent au levain et proposent parfois des stages d'initiation à la fabrication de pain à la ferme. Certains soucieux de maîtriser totalement la fabrication, s'équipent de petits moulins à meules autrichiens mais le modèle dit des frères Astrié (Pierre et André) s'impose au milieu des années 1980 par sa conception (meule de granit monobloc qui n'échauffe pas la farine) et sa fiabilité (N° spécial Ressources 1982). Le concept de « paysan – meunier – boulanger » voit le jour au début des années 1990 et plus encore 2000. Les volumes de pains produits sont modestes mais l'attachement à la fermentation au levain spontané sans ajout de levure commerciale et à la cuisson au feu de bois est très vivace.

### **La fabrication revisitée**

Les années 1990 concrétisent et formalisent un mouvement en pleine ascension et apportent de solutions innovantes. D'un point de vue technique, Marcel Montagne, l'expert levain de chez Decollogne-Lecoq diffuse une méthode de dosage et d'emplois de rafraîchis qui conduisent à l'utilisation d'un levain de tout point très « jeune ». Ses pains sont par conséquent peu acides. Le suivi de la fermentation du levain nécessite toujours beaucoup de soins et de motivations par contre il est désormais simplifié par l'utilisation judicieuse de la réfrigération du chef ou du levain de tout point ou la pousse lente.

Dominique Saibron lui aussi élève de Marcel Montagne, apporte sa touche personnelle dans le démarrage de souche de levain en y incorporant de subtiles associations d'épices et le résultat convainc les chefs des grandes tables parisiennes. L'un des dirigeants des boulangeries Carrefour, Gabriel Binetti ambitionne de produire une boule au levain de qualité dans tous ses points de vente. Il se donne les moyens, fait appel aux meilleurs consultants et la boule bio Carrefour à la farine de meule et au levain et à l'eau de source sort en 1992. Le succès est immédiat au point qu'il faut remettre en services des paires de meules qui sommeillaient !

Curieusement, le décret pain de 1993 comporte une définition du pain au levain

qui est beaucoup plus contraignante que celle du code des usages de 1977. En effet le pH minimum 4.3 et le seuil minimum d'acidité acétique sont très élevés compte tenu des pratiques boulangères françaises mais aussi du souhait des consommateurs d'un niveau d'acidité plus doux. Patrick Castagna et Eric Kayser tous deux formateurs à l'INBP conçoivent le Fermentolevain avec les ingénieurs de la marque Bertrand ; cet appareil doit faciliter la gestion du levain liquide. Cette machine présentée et primée au salon Européen 1994, popularisera l'emploi de ces levains pompables en France.

### **Levain liquide**

Outre Rhin, cette pratique était courante. La société allemande Isernhager, par exemple, commercialisait depuis une dizaine d'années un appareil similaire.

Patrick Castagna lors d'une conférence en 2014 a relaté pour les Ambassadeurs du pain, sa rencontre et sa connivence avec Monsieur Perrier qui affectionnait les conduites de levain à température élevée attribuant à cette méthode l'origine d'une note plus lactée dans ses pains au levain. Il est intéressant de noter que ce même boulanger de Mussidan, Monsieur Perrier, a également contribué à former l'émblématique boulanger américain Steve Sullivan créateur de la très réputée boulangerie de Berkeley : AcmeBread.

En 1993 les sociétés Lesaffre et Hansen proposent aux boulangers français des starters de levains revivifiables, ces produits qui simplifient et garantissent la typicité aromatique résultent des progrès réalisés en terme d'identification de micro-organisme à forte potentialité gustative mais aussi des progrès en terme d'ingénierie de séchage. Ces starters employés de longue date dans d'autres industries de fermentation constituent des solutions appréciées par les industriels de la panification.

### **Le renouveau**

Durant les années 2000 le pain au levain continue sa progression, il est désormais enseigné aux élèves et bien identifié par leurs enseignants, comme une composante essentielle dans la panoplie des pains français. Les pains régionaux bénéficient également de cette renaissance du levain ; le renouveau de la tourte de seigle auvergnate au levain, à l'aspect extérieur et au goût si caractéristiques, en témoigne.

Innovant initialement parce qu'il constituait la première solution pour en finir avec la compacité des aliments céréalier et la neutralité de goût des flans et autres bouillies, le levain, sous réserve d'une fabrication maîtrisée, est, quelles que soient les époques, unanimement salué pour ses qualités gustatives, de conservation et de salubrité (B. Champier, Lemery,). Le niveau d'acceptabilité de l'acidité du pain au levain a grandement varié suivant les époques et les classes sociales. L'âge d'or semble correspondre à la période où le pain dominant était issu d'une farine non excessivement raffinée, l'emploi de pâte ferme et le standard de gros pains consommés sur plusieurs jours dans les campagnes et les quartiers modestes des villes.

L'expertise de conduite du levain naturel avec une configuration farine pur froment souvent issue de mouture par meules de pierre s'est donc notablement structurée depuis les années 2000, en boulangerie conventionnelle mais aussi, pour partie, en dehors des circuits classiques. L'ITAB Institut de l'Agriculture Biologique a initié des recherches sur le circuit blé/farine/pain, et les groupements d'agriculteurs biologiques départementaux ont organisé de stages de formation de pain au levain. En outre des associations paysannes comme, Semences Paysannes, Tryptolème se sont impliquées dans des travaux de recherches et de formation sur la mouture et la panification au levain.

Une école privée dite internationale de boulangerie (axée pain au levain et pain biologique) a également vu le jour en 2005 (Teffri-Chambelland).

Le pain au levain bénéficie plus que jamais d'un statut de produit haut de gamme ; le décret pain de 1993 certes fige maladroitement sa définition mais le remet d'une certaine façon au-devant de la scène. L'emploi rationnel de la réfrigération et des étuves de fermentation, permet de s'affranchir des aléas climatiques et autorise désormais une conduite simplifiée. Les avancées en microbiologie ont permis la mise sur le marché de starter de levains revivifiables. Finalement, il est intéressant d'observer qu'aujourd'hui comme hier, malgré le fait que comparativement aux autres pains de la gamme, les productions de pain au levain soient modestes, une relation teintée d'affection et de fierté lie souvent le boulanger à son levain. De même les consommateurs réguliers de pain au levain sont intarissables sur ses mérites.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Amouretti M. C., 1986. Le pain et l'huile dans la Grèce Antique. De l'aire au moulin. Les Belles Lettres, Paris. 322p.
2. Arpin M., Bastide M., 1937. Le problème du pain. Bulletin Ecole Française de Meunerie, 55, 6-11.
3. Arpin M., 1948. Historique de la meunerie et de la boulangerie. Tome 1, 396p. Tome 2, 380p. Le Chancelier, Paris.
4. Benoit P., Ruasse L. J. P., 1957. Vrai pain, vraie santé. L'alimentation normale. 131p.
5. Bernard 1941. Pour la renaissance du bon pain. 12 bis, des éditions du Progrès Agricole. Amiens. 135p

6. Boland A., 1860. Traité pratique de boulangerie. E. Lacroix, Paris. 398p.
7. Bruyerin Champier J., 1560. L'alimentation de tous les peuples et de tous les temps jusqu'au 16ème siècle. Traduit du latin par S. Amundsen. 1999. ICC, L'Intermédiaire des Chercheurs et Curieux. Paris. Livres V et VI, 193-259.
8. CNERNA 1962. La qualité du pain, Novembre 1954 - avril 1960, tome 1et 2, CNRS, Paris. 927p.
9. Comité Central du Blé et du Pain 1933. Dix ans de travaux du Comité. Paris. H. Chasles Evolution de la meunerie, 33-39 ; A. Périer, la boulangerie de 1923 à 1933, 41-45.
10. Confédération Nationale de la Boulangerie Pâtisserie 1983. Actes des Etats Généraux de la boulangerie artisanale. Paris 5- 6 octobre 1983. Paris. 171p.
11. Dessables A. M., 1825. Manuel du boulanger et du meunier. Roret, Paris. 216p
12. Dufour E., 1935. Traité de panification française et parisienne. Imp. Nouvelle, Vesoul. 199p
13. Edlin 1811. L'art de faire le pain & observations théoriques et pratiques sur l'analyse et la synthèse du froment. Traduit par J. Peschier. J.J. Paschoud. Paris. 190p.
14. Estienne Ch., Liebault J., 1583 L'agriculture et la maison rustique. La boulangerie, chap. XX. In De la maison rustique. Paris. 531-545.
15. Guillemet R., 1936. Contribution à l'étude de la fermentation alcoolique, la fermentation panaire. Imprimerie M. Declume, Lons le Saunier.
16. Hendoux L., 1889. Traité pratique de meunerie et boulangerie, Garnier Paris. 784p.
17. Kaplan S. L 2008 Le pain maudit
18. Lemery 1705. Traité des aliments. Chapitre XLV : du pain 107-114.
19. Majac 1885. Manuel de fabrication du pain de luxe, ouvrage pratique orné dessins contenant la recette de tous les pains de luxe et la manière de les fabriquer. J. Echalié, Paris. 54p.
20. Malouin P. J. 1771 Arts du meunier, du boulanger, du vermicelier. Dictionnaire ou vocabulaire des arts du meunier, du vermicelier & du boulanger. In Description des arts et métiers faites ou approuvées par messieurs de l'Académie Royale des Sciences de Paris. Tome 1. Nouvelle édition par J. E. Bertrand. Neuchatel. 1- 448.
21. Marchoux E., 1937. La fermentation panaire. Bulletin Ecole Française de Meunerie, 55, 12-14.
22. Maurisio A., 1932. Histoire de l'alimentation végétale depuis la préhistoire jusqu'à nos jours. Traduit par le Dr. F. Gidon. Payot. Paris. 663p.
23. Mestre 1880. Traité pratique de boulangerie. Imp. Centrale. Chateauroux. 15p
24. Morel A. 1923. Histoire illustrée de la boulangerie en France. Syndicat patronal de la boulangerie de Paris et de la Seine. 511p.
25. Onno B., Ragot L., 1988. Elaboration d'un levain naturel : aspects microbiologiques. Industries des Céréales, 54, 17-21
26. Parmentier A. A., 1778. Le parfait boulanger ou traité complet sur la fabrication et le commerce du pain. Imprimerie Royale, Paris. 639p.
27. Payen A., 1878. Précis de chimie industrielle, tome 2. Hachette. Paris. 163-208
28. Pécot D., 1969. Le blé, la farine, le pain et la santé de l'homme. Editions Agriculture et Vie, Angers. 100p.
29. Pluchet R. 1982. Raoul Lemaire : le père du « pain bio » Des blés de force à la culture biologique, le « pain Lemaire » In Ressources, 2, 35-38.
30. Poilâne L., 1981. Guide de l'amateur de pain. Robert Laffont, Paris. 237p
31. Roussel P., Chiron H. 2002 Les pains français, évolution, qualité, production. 433p.
32. Scheibenbogen A., non daté. Cuisine et pâtisserie austro-hongroises, recettes balkaniques, orientales avec un aperçu de la boulangerie française et viennoise. A. Guériny. Paris. 133-160

Sous la direction de  
Marco Gobetti • Michael Gänzle

***Titre original :***  
***Handbook on Sourdough Biotechnology***

***Levain de Panification :***  
***Biologie et Technologie***

***[Traduction partielle de l'ouvrage]***

*Sous la direction de :*  
Marco Gobbetti  
Département des Sciences  
du sol, des plantes et  
des aliments  
Université de Bari Aldo Moro  
Bari, Italie

Michael Gänzle  
Département des Sciences de  
l'agriculture, de l'alimentation  
et de la nutrition  
Université de l'Alberta  
Edmonton, Canada

ISBN 978-1-4614-5424-3      ISBN 978-1-4614-5425-0 (eBook)  
DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0  
Springer New York Heidelberg Dordrecht Londres

Numéro de contrôle de la Bibliothèque du Congrès :  
2012951618

© Springer Science+Business Media New York 2013

Le présent ouvrage est soumis au droit d'auteur. Tous les droits sont réservés par l'Éditeur, qu'il s'agisse de l'intégralité ou d'extraits de l'ouvrage, en particulier les droits de traduction, réimpression, réutilisation des illustrations, exposé, diffusion, reproduction sur microfilms ou tout autre moyen et de transmission ou stockage ou extraction d'informations, adaptation électronique, logiciel informatique ou par une technologie similaire ou non, connue à ce jour ou développée ultérieurement. Sont exempts de cette réserve légale les courts extraits dans le cadre de comptes-rendus ou d'analyses scientifiques ou de documents fournis spécifiquement en vue d'être entrés et exécutés dans un système informatique pour l'utilisation exclusive de l'acquéreur. La duplication intégrale ou partielle de cette publication est soumise aux dispositions de la loi sur le droit d'auteur du lieu de publication conformément à sa version actuelle et requiert systématiquement l'autorisation de Springer. Les autorisations d'utilisation peuvent être obtenues auprès du service RightsLink du Copyright Clearance Center. Toute violation est sanctionnée par la loi sur le droit d'auteur applicable.

L'utilisation dans cette publication de dénominations descriptives générales, noms déposés, marques, marques de service etc. ne signifie pas, même en l'absence d'une mention spécifique, que ces termes soient exempts des lois et réglementations de protection applicables et donc qu'ils puissent être utilisés par chacun.

Quoique les conseils et les renseignements contenus dans le présent ouvrage semblent vrais et exacts au moment de leur publication, les auteurs, les directeurs et l'éditeur déclinent toute responsabilité quant aux éventuelles erreurs ou omissions dudit ouvrage. L'éditeur ne fournit aucune garantie, explicite ou implicite, quant aux documents contenus dans le présent ouvrage.

Imprimé sur du papier sans acide

Springer est membre du groupe Springer Science+Business Media  
(www.springer.com)

# Table des matières

Les chapitres en marron mentionnés ci-dessous  
n'ont pas été traduits et vous les retrouverez dans le  
document d'origine en langue anglaise

|           |                                                                                                               |            |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1</b>  | <b><i>History and social aspects of sourdough</i></b>                                                         |            |
|           | <i>Stefan Cappelle, Lacaze Guylaine, M. Gänzle et M. Gobbetti</i>                                             |            |
| <b>2</b>  | <b><i>Chemistry of cereal grains</i></b>                                                                      |            |
|           | <i>Peter Koehler et Herbert Wieser</i>                                                                        |            |
| <b>3</b>  | <b><i>Technology of baked goods</i></b>                                                                       |            |
|           | <i>Maria Ambrogina Pagani, Gabriella Bottega et Manuela Mariotti</i>                                          |            |
| <b>4</b>  | <b>Technologie de la fermentation au levain<br/>et applications du levain .....</b>                           | <b>20</b>  |
|           | Aldo Corsetti                                                                                                 |            |
| <b>5</b>  | <b>Taxonomie et biodiversité des levures et<br/>des bactéries lactiques du levain (<i>extraits</i>) .....</b> | <b>40</b>  |
|           | Geert Huys, Heide-Marie Daniel et Luc De Vuyst                                                                |            |
| <b>6</b>  | <b><i>Physiology and biochemistry of sourdough yeasts</i></b>                                                 |            |
|           | <i>M. Elisabetta Guerzoni, Diana I. Serrazanetti,<br/>Pamela Vernocchi et Andrea Gianotti</i>                 |            |
| <b>7</b>  | <b>Physiologie et biochimie des bactéries lactiques (<i>extraits</i>) .....</b>                               | <b>82</b>  |
|           | Michael Gänzle et Marco Gobbetti                                                                              |            |
| <b>8</b>  | <b>Le levain : un outil pour améliorer la structure du pain .....</b>                                         | <b>114</b> |
|           | Sandra Galle                                                                                                  |            |
| <b>9</b>  | <b>Aspects nutritionnels de la fermentation des céréales<br/>par bactéries lactiques et levures .....</b>     | <b>127</b> |
|           | Kati Katina et Kaisa Poutanen                                                                                 |            |
| <b>10</b> | <b>Levain et produits sans gluten.....</b>                                                                    | <b>144</b> |
|           | Elke K. Arendt et Alice V. Moroni                                                                             |            |
| <b>11</b> | <b><i>Sourdough and cereal beverages</i></b>                                                                  |            |
|           | <i>Jussi Loponen et Juhani Sibakov</i>                                                                        |            |
| <b>12</b> | <b>Perspectives.....</b>                                                                                      | <b>165</b> |
|           | Michael Gänzle et Marco Gobbetti                                                                              |            |

## Chapitre 4

# Technologie de la fermentation au levain et applications du levain

Aldo Corsetti

### 4.1 Définition du levain

La technologie du levain est largement utilisée en boulangerie et pâtisserie car c'est elle qui donne aux produits finis leurs caractéristiques distinctives, leurs propriétés sensorielles et leur durée de conservation (Tableau 1). Le levain est « un mélange de farine de blé et/ou de seigle et d'eau, additionné éventuellement de sel, fermenté par des bactéries lactiques et des levures spontanées (issues de la farine et de l'environnement) qui déterminent sa capacité acidifiante et fermentaire. Ces activités sont obtenues et optimisées par une suite de rafraîchis (aussi appelés renouvellements ou repiquages) » (3-5). Le terme de rafraîchi renvoie à la technique par laquelle une pâte faite de farine, d'eau et éventuellement d'autres ingrédients fermente spontanément pendant un certain temps (dans certains cas, à une température définie) avant d'être ajoutée comme inoculum à un nouveau mélange de farine et d'eau (et parfois d'autres ingrédients) pour en déclencher la fermentation.

Quand ce processus respecte une durée définie, il donne un levain qui a une action acidifiante et fermentaire constante et renouvelable due à la croissance des bactéries lactiques et des levures qui sont bien adaptées à leur environnement. Après la préparation du levain, la technique d'obtention de rafraîchis permet de maintenir en permanence l'activité métabolique des communautés microbiennes (6).

Quand le levain est ajouté à un mélange de farine et d'eau pour amorcer plusieurs fermentations (rafraîchis) destinées à obtenir la pâte finale ou levain tout point qui servira de ferment, il peut être qualifié de « levain-chef » (2, 4). Généralement, un levain contient un nombre variable de bactéries lactiques et de levures, allant respectivement de  $10^7$  à  $10^9$  cfu/g et  $10^5$  à  $10^7$  cfu/g, avec un rapport d'environ 100:1 (7).

---

A. Corsetti (\*)

Département des Sciences des aliments, Université de Teramo, Teramo, Italie  
e-mail : [acorsetti@unite.it](mailto:acorsetti@unite.it)

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Manuel sur la biotechnologie du levain*,

DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0\_4, © Springer Science+Business Media New York 2013

**Tableau 4.1** Comparaison des caractéristiques du pain au levain et du pain à base de levure de boulangerie (adapté de (1, 2))

| Caractéristiques      | Pain au levain                                                                                                                                                | Pain à la levure de boulangerie                                     |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pH                    | 3,8-4,6                                                                                                                                                       | 5,3-5,8                                                             |
| Acide Lactique        | 0,4-0,8%                                                                                                                                                      | 0,005-0,04%                                                         |
| Acide acétique        | 0,10-0,40%                                                                                                                                                    | 0,005-0,04%                                                         |
| Volume du pain        | 0,22-0,30                                                                                                                                                     | ≤ 0,20                                                              |
| Saveur                | Arômes et goût complexes                                                                                                                                      |                                                                     |
| Rassissement          | Lent                                                                                                                                                          | Rapide                                                              |
| Durée de conservation | Bonne protection contre les contaminations microbiennes                                                                                                       | Sensibilité élevée aux bactéries et formation de moisissures        |
| Aspects nutritionnels | Activité phytasique optimale et hydrolyse de l'acide phytique responsable de la liaison ionique (Ca <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> etc.) | Faible activité phytasique, effet décalcifiant                      |
|                       | Hausse de la concentration d'acides aminés libres                                                                                                             | Concentration d'acides aminés libres similaire à celle de la farine |
|                       | Baisse de l'indice glycémique                                                                                                                                 |                                                                     |

Les bactéries lactiques (majoritairement lactobacilles hétérofermentaires obligatoires et facultatifs) ont comme rôle principal l'acidification de la pâte, tandis que les levures servent essentiellement à la fermentation de la pâte par libération de CO<sub>2</sub> (4).

## 4.2 Préparation et stockage du levain

La préparation du levain (levain-chef) peut suivre de nombreux protocoles. L'objectif principal est d'obtenir un ferment qui contienne des micro-organismes résidents bien adaptés. Ces micro-organismes doivent produire suffisamment de CO<sub>2</sub> pour faire lever la pâte et des acides organiques et d'autres métabolites pour que le pain de blé ou de seigle ait une bonne texture, de bonnes propriétés sensorielles et une longue durée de conservation (3). Deux procédures classiques, à savoir les systèmes français et américain, sont présentées ci-après.

### 4.2.1 Le système français

La préparation du levain-chef pour obtenir le pain au levain français commence par une pâte assez ferme, à base de farine de blé (rendement en pâte de 150-152, voir § 4.6.2), additionnée de sel et de malt. Cette pâte subit une première fermentation d'environ vingt-quatre heures. Cette étape correspond à la première activité fermentaire des levures et des bactéries lactiques résidentes dans la farine, avec un taux de CO<sub>2</sub> bas et la production d'acide organique (2). La baisse du pH induit l'activité de protéases endogènes à la farine qui, en association avec les enzymes hydrolytiques bactériennes, agissent sur le gluten et assouplissent la pâte.

La seconde étape commence avec le premier rafraîchi destiné à introduire de l'oxygène et de nouveaux glucides fermentescibles dans la préparation pour stimuler la croissance et l'activité microbiennes. Le rafraîchi consiste à ajouter une quantité de farine correspondant au poids de la pâte précédemment fermentée et une quantité d'eau suffisante pour obtenir un rendement en pâte (par ex. 148) inférieur au précédent. Cette préparation fermente rapidement et constitue la pâte de base pour le rafraîchi suivant. Cette procédure permet d'obtenir un levain qui a une capacité fermentaire stable. Durant la dernière étape, chaque rafraîchi est effectué à intervalle régulier (par ex. toutes les sept à huit heures), afin de maintenir un équilibre de rapport entre les communautés microbiennes (2). D'après Calvel (2), quand le volume de pâte est multiplié par trois ou quatre par rapport au pâton initial, il convient de procéder au rafraîchi suivant. C'est à partir de ce levain-chef obtenu par la procédure qui vient d'être décrite qu'est préparé le levain tout-point nécessaire à la fermentation de la pâte à pain.

#### **4.2.2 Le système américain**

Pour la préparation du levain-chef, le système américain utilise un mélange d'eau et de farines de blé et/ou de seigle. Contrairement au système français, la valeur du rendement en pâte est comprise entre 225 (pâte liquide avec un rapport eau:farine de 1,25:1) et 250 (pâte liquide avec un rapport eau:farine de 1,5:1). Ces valeurs de rendement en pâte restent constantes au cours des différents rafraîchis (8). La durée et la température de la fermentation sont strictement contrôlées durant chaque phase. Durant la première phase, le mélange eau-farine fermente à 32-35°C pendant vingt-quatre heures afin d'acidifier la pâte. Le premier rafraîchi est ensuite effectué en ajoutant de la farine et de l'eau à cette pâte fermentée, sans que la valeur de rendement en pâte ne soit modifiée. Après huit heures de fermentation à 32-35°C, le deuxième rafraîchi a lieu et la pâte fermente cette fois pendant seize heures. Ensuite, des rafraîchis ont lieu toutes les huit à seize heures, entre lesquels la pâte fermente à 24-27°C. La quantité de farine et d'eau à ajouter lors de chaque rafraîchi est calculée à l'aide d'un coefficient multiplicateur de quatre. Le poids de la pâte fermentée est alors multiplié par quatre tous les deux rafraîchis. Cela permet de déterminer la quantité d'eau et de farine à ajouter pour le rafraîchi suivant ; le rapport entre les deux ingrédients est maintenu à 1,25:1. Grâce à ce système, la valeur du rendement en pâte reste constante jusqu'à l'obtention d'un levain au pH de 3,6-3,8 et à l'ATT (acidité titrable totale) de 16 à 20 ml NaOH/20 g de pâte (calculée selon le système américain). Une dernière fermentation de huit heures à 24-27°C est nécessaire pour donner au levain les propriétés sensorielles et fermentaires du levain-chef. Généralement, un levain qui présente les caractéristiques susmentionnées est obtenu en cinq jours environ ; il est ensuite maintenu dans un état actif grâce à un stockage à basse température (par ex. 4°C) et soumis à un rafraîchi au moins une fois par jour (8).

### 4.2.3 Stockage du levain

Le levain liquide (rendement en pâte de 225-250) fréquemment utilisé par les fabricants de pain aux États-Unis est stocké à 1-2°C, après une réfrigération rapide, ou à 4-5°C. Il sert de base à une nouvelle fermentation dans les deux à trois jours qui suivent, sans l'étape de rafraîchi. En cas de stockage prolongé (dix jours), un ou deux rafraîchis sont nécessaires pour activer le métabolisme des bactéries lactiques et des levures. Le stockage prolongé du levain pendant plusieurs mois à 4-5°C est possible quand la proportion eau-farine est réduite en ajoutant suffisamment de farine pour obtenir un rapport d'environ 0,43:1 (30 % eau:70 % farine). Le levain produit est alors ferme, avec un rendement en pâte de 143. Ce type de stockage nécessite une réactivation du levain (au moins deux rafraîchis) avant son utilisation (8). La préparation artisanale du pain comporte différentes techniques de stockage, souvent empiriques. Généralement, en raison des horaires de travail en boulangerie, une portion du levain est rafraîchie au moins une fois avant son utilisation. Néanmoins, si l'on suit un protocole de stockage distinct, une partie du levain-chef peut être stockée à basse température (4-6°C) pendant plusieurs semaines, après avoir été emballée dans un sac en toile ficelé (9). Des rafraîchis sont nécessaires avant sa réutilisation. Dans certains cas, le levain peut être surgelé et réutilisé après avoir été rafraîchi.

## 4.3 Classification des levains

Le pain au levain est un processus biotechnologique ancien qui repose sur différents protocoles en fonction des pays. En fonction de la technologie appliquée, les levains sont classés en trois catégories (10), auxquelles peut être ajouté un quatrième type de levain, le levain-levure.

### 4.3.1 Levains de type I

Il s'agit de levains traditionnels dont les micro-organismes sont maintenus actifs sur le plan métabolique par des rafraîchis quotidiens. Les levains de type I permettent généralement d'obtenir la fermentation de la pâte sans ajout de levure de boulangerie ; la fermentation de la pâte décrite ci-dessus pour les levains français et américains sont des exemples de levains de type I. Le protocole appliqué comprend généralement trois étapes, avec trois rafraîchis répartis sur vingt-quatre heures afin d'obtenir la pâte levée à enfourner. Chaque étape est caractérisée par une température, une durée de fermentation et un rendement en pâte précis. À l'issue de la dernière étape de fermentation, le levain sert de ferment. On peut donc le considérer comme une culture de départ naturelle qui contient de nombreuses souches microbiennes (11). Dans les levains de farine de blé et/ou de seigle, les souches dominantes appartiennent à l'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis*, qui peut coexister avec d'autres bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires comme *L. pontis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fructivorans* et avec les levures *Candida milleri*, *C. holmii*, *Saccharomyces cerevisiae* et *S. exiguus* (récemment renommée *Kazachstania exiguus*).

### 4.3.2 Levains de type II

Il s'agit des levains obtenus après une seule étape de fermentation de quinze à vingt heures, suivie d'un stockage de plusieurs jours. Les levains de type II ne permettent généralement pas la fermentation de la pâte mais sont utilisés pour l'acidification de la pâte et comme améliorants. En général, ces levains sont liquides (rendement en pâte d'environ 200) et produits à l'échelle industrielle à l'aide de bioréacteurs ou de cuves à une température contrôlée, supérieure à 30°C. Ce protocole permet d'accélérer le processus de fermentation (12). Durant le stockage, une portion du levain à point peut être utilisée comme inoculum afin d'acidifier la pâte et de l'enrichir en composés aromatiques caractéristiques des produits de boulangerie au levain. En raison de la fermentation prolongée, du rendement en pâte élevé et de la température de fermentation, ces levains sont dominés par des lactobacilles comme *L. panis*, *L. reuteri*, *L. johnsonii* et *L. pontis*, résistants à un pH bas (10, 13). Les levures spontanées de la farine étant inhibées, la fermentation de la pâte finale est obtenue à l'aide de levure de boulangerie commerciale.

À partir d'une approche qui associe des systèmes basés et non basés sur une culture, Meroth *et al.* (14, 15) ont utilisé un modèle expérimental fondé sur une fermentation réalisée en laboratoire pour montrer la différence de prévalence des bactéries lactiques et des levures dans les levains de seigle de type I et type II, obtenus par un mélange de levains naturels et de levure de boulangerie disponibles dans le commerce. *L. sanfranciscensis*, *L. mindensis* et *C. humilis* dominaient le levain de type I. *L. crispatus*, *L. pontis*, *L. fermentum* et *S. cerevisiae* dominaient le levain de type II fermenté à 30°C ; dans le même levain fermenté à 40°C, *L. crispatus*, *L. panis* et *L. frumenti* étaient dominantes et toutes les levures qui avaient été ajoutées au mélange de départ avaient disparu. Enfin, *L. johnsonii*, *L. reuteri* et *C. krusei* caractérisaient le levain de type II fermenté à haute température (40°C), mais à base de son de seigle et non de farine de seigle.

### 4.3.3 Levains de type III

Il s'agit de levains liquides de type II, déshydratés et stabilisés après leur préparation (12). Ils sont principalement utilisés à l'échelle industrielle car leur qualité est plus constante que celle des levains de type I et leur gestion est plus simple et plus rapide. En fonction de leur méthode de préparation, les levains de type III sont dominés par des bactéries lactiques résistantes à la déshydratation comme *Pediococcus pentosaceus*, *L. plantarum* et *L. brevis* (10). Le § 4.8 comporte une description détaillée de ce type de levain et son application industrielle

#### 4.3.4 Levain-levure

Le levain-levure vise à acclimater la levure de boulangerie (*S. cerevisiae*) et à améliorer l'hydratation des composants de la farine, le développement, le goût et l'arôme du pain et sa durée de conservation. Il s'agit d'un processus indirect qui pourrait être considéré, d'un point de vue technologique et microbiologique, comme une procédure intermédiaire entre la pâte directe (processus direct qui repose uniquement sur l'utilisation de levure de boulangerie pour amorcer la fermentation) et le levain naturel (processus indirect dans lequel la fermentation ne nécessite pas l'ajout de levure de boulangerie). Le levain-levure est obtenu en deux étapes : dans la première pâte (pâte pré-fermentée), la levure de boulangerie est mélangée à une partie de la farine et de l'eau de la recette, tandis que la seconde pâte est obtenue en ajoutant le reste de l'eau et de la farine et éventuellement les autres ingrédients à la pâte pré-fermentée. En fonction du type de pain, la pré-fermentation préalable peut durer de trois à vingt heures avec un pourcentage de farine et d'eau, un rendement en pâte et une température variables à cette étape (16, 17). Étant donné que, dans les fermentations prolongées, les bactéries lactiques présentes comme contaminants soit par la levure de boulangerie, soit par la farine, dépassent généralement  $10^8$  cfu/g et qu'ils contribuent à la qualité générale des produits de boulangerie (4), le levain-levure peut être inclus dans la catégorie des levains.

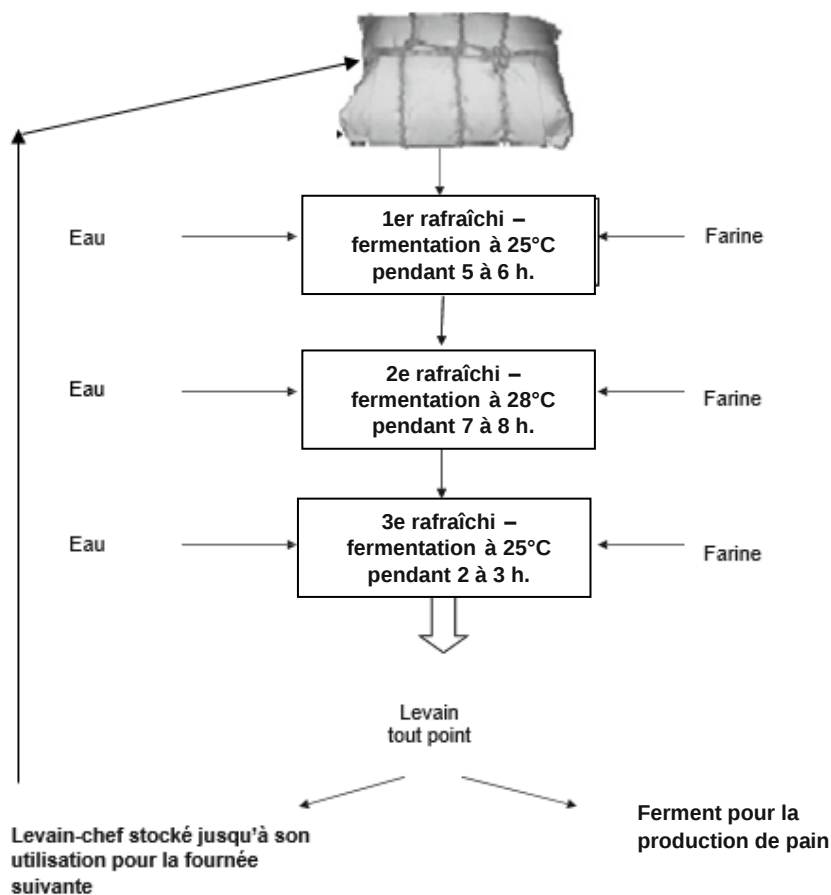
#### 4.4 Exemples d'applications au levain

Une fois produit, le levain est généralement soumis à plusieurs rafraîchis, soit pour activer le métabolisme microbien, soit pour augmenter le volume de pâte (III. 4.1).

Différents types de levain (par ex. type I, II ou III) sont utilisés en fonction des produits de boulangerie à pâte levée, que ce soit le traditionnel pain de blé français ou italien, le pain blanc moulu, le pain de seigle, le pain de San Francisco ou des gâteaux traditionnels connus dans le monde entier, comme le *panettone*. Quelques applications du levain ci-après.

##### 4.4.1 Pain au levain traditionnel d'Italie : le pain d'Altamura

Le pain d'Altamura est le premier pain européen à avoir reçu le statut d'AOC (Appellation d'origine contrôlée). Il est fabriqué dans la région des Pouilles (Italie) à partir de cultivars spécifiques de farine de blé dur (*Triticum durum*) et d'une technologie basée sur le levain de type I. Le levain tout point s'obtient en trois étapes afin d'augmenter progressivement la quantité de pâte fermentée. À chaque étape, l'eau et la farine de blé dur sont mélangées à une pâte préalablement fermentée, ajoutée à hauteur de 20% environ du poids de farine. En fonction de la proportion entre les ingrédients indiqués dans la recette originale (100 kg de farine de blé dur + 20 kg de levain + 2 kg NaCl + 60 l d'eau) et en se basant sur un levain tout point avec un rendement en pâte de 160 et 12,5 kg de farine, la pâte finale devrait avoir un rendement en pâte de 162.



**4.1** Production d'un *levain tout point* à partir d'un *levain-chef* en trois étapes. La durée de fermentation et la température indiquées dans l'exemple peuvent varier en fonction du protocole utilisé pour la fabrication du pain (adapté de (1))

Comme souvent dans la fabrication traditionnelle, la durée et la température de chaque étape ne sont pas définies avec précision mais dépendent de l'expérience des boulangers.

#### 4.4.2 Pain français (Pain au levain)

Bien que différents protocoles en une ou deux étapes soient utilisés pour obtenir la bonne quantité de levain tout point, le pain de blé traditionnel français est généralement préparé en trois étapes, c'est-à-dire la procédure correspondant au levain de type I. La première étape consiste à mélanger une partie du levain-chef à de la farine et de l'eau pour multiplier par quatre environ la masse initiale. Cette pâte (rendement en pâte de 160) fermente pendant environ une heure et demie à deux heures, à une température d'environ 25°C.

Ce levain de première sert à obtenir une pâte qui a un rendement en pâte d'environ 185 et fermente pendant sept à huit heures à une température légèrement supérieure à celle de l'étape précédente. Ces paramètres, y compris le long pétrissage destiné à oxygéner la pâte, stimulent la croissance des levures et la capacité fermentaire du levain de seconde. Ce dernier sert de base au troisième rafraîchi et la dernière pâte ou levain tout point est obtenue après une courte fermentation (environ deux heures), destinée à contrôler l'activité hydrolytique de la pâte et préserver la capacité de rétention gazeuse de la pâte et, en conséquence, sa valeur boulangère. Le levain tout point représente 25 % de la masse finale et le pâton est prêt à être enfourné après trente minutes de fermentation (2).

#### 4.4.3 Pain de seigle au levain

Comme pour le pain français, le pain au levain à base de seigle ou de seigle/blé est obtenu en une ou en plusieurs étapes, en fonction du type de pain et de produit. Le « processus de fabrication du levain en trois étapes avec levain de seconde qui s'étale sur une nuit », qui nécessite de quinze à vingt heures d'après Spicher et Pomeranz (17), constitue un bon modèle de référence pour l'application des levains de type I dans la production de pain à base de farine de seigle. La première étape consiste à obtenir le levain de première (*Anfrischsauer*) qui, à son tour, estensemencé par le levain-chef (*Anstellgut*), un starter commercial ou une portion (env. 10 à 15 % du poids total de pâte) d'un levain tout point (*Vollsauer*) d'une pétrissée précédente. Le levain de première (*Anfrischsauer*) a un rendement en pâte de 200-250 et fermente pendant environ six heures à 25-26°C. À l'issue de cette étape, il contient un nombre élevé de levures et sert de base à une nouvelle pâte constituée de farine de seigle et d'eau (rendement en pâte d'environ 160-180). Après cinq à huit heures de fermentation de nuit à 26-30°C, les bactéries lactiques se multiplient et le levain de seconde (*Grundsauer*) prend forme. Un nouveau rafraîchi (trois heures à 30-33°C) à partir du levain de seconde additionné de farine de seigle et d'eau (rendement en pâte de 180-200) permet d'obtenir le levain tout point (*Vollsauer*), dont le pH et l'ATT sont respectivement de 4,0 et 10,5 ml NaOH 0,1 N/10 g de pâte. Une portion (40 %) de ce levain constitue le starter naturel de la pâte finale (rendement en pâte de 170), qui contient de la farine de seigle et une quantité équivalente de farine de blé dans le cas d'un pain de farine de seigle/blé. Le pâton est enfourné après un repos de dix minutes à 28°C, suivi de la pousse.

#### 4.4.4 Pain blanc moulé

Le pain blanc moulé est l'un des pains les plus populaires aux États-Unis et constitue un bon exemple d'application du levain de type II. D'après Kulp (8), ce pain est fabriqué en une étape : un seul rafraîchi est nécessaire pour mélanger le levain tout point liquide aux autres ingrédients de la recette. La pâte assez souple (rendement en pâte de 175) fermente en deux étapes : à température ambiante (environ 25-26°C) pendant vingt-cinq à trente minutes, puis à 35°C pendant soixante-quinze à cent minutes. Avant sa cuisson, la pâte a un pH de 4,3-4,4 et une ATT de 9-11 ml NaOH 0,1 N/20 g de pâte.

Globalement, le starter liquide (levain tout point) représente 37 % de la pâte finale, mais ce pourcentage peut varier en fonction de la recette et de la méthode, industrielle ou artisanale. Dans ce dernier cas, la portion de starter est moindre, ce qui nécessite une fermentation plus longue et des horaires de travail différents. En raison de l'acidité élevée du starter, la phase de pétrissage doit être brève à cause de la plus grande solubilité des protéines du gluten, qui fait que le réseau de gluten a moins de temps pour se développer.

#### 4.4.5 Panettone

Le *panettone* est un gâteau italien traditionnel consommé durant les fêtes de Noël et apprécié dans le monde entier. Le *panettone* a une structure moelleuse, avec un alvéolage régulier et un goût caractéristique dus aux ingrédients de la pâte (eau, farine, beurre, sucre, œufs, sel et autres) et à sa fabrication. À l'échelle artisanale comme industrielle, la biotechnologie du levain est basée traditionnellement sur de nombreux rafraîchis (par ex. levain de type I) et une plus grande concentration de sucre est ajoutée au cours des dernières étapes (9, 12). Comme dans la plupart des levains de type I, les microbiotes du levain sont dominés par *L. sanfranciscensis*. Dans la fabrication traditionnelle, le levain utilisé a un faible quotient de fermentation (QF, voir chap. 4.6.3) et la durée et la température de fermentation sont strictement contrôlées. La température de la pâte ne doit pas dépasser 30°C et la température de l'eau et des autres ingrédients ne doit pas être inférieure à 20-22°C. Plusieurs études ont attribué le moelleux et la longue durée de conservation du *panettone* (fabriqué plusieurs mois avant sa consommation) à la présence de dextrane qui produit *Leuconostoc mesenteroides* dans le levain, utilisant le saccharose comme précurseur d'exopolysaccharides (EPS) (12). À partir de ces conclusions, un nouveau protocole associé au levain de type III a été récemment proposé comme alternative à la fabrication traditionnelle (voir chap. 4.8). Un levain contenant 25 % (sur matière sèche) de dextrane, stabilisé par réfrigération, pasteurisation ou séchage, a permis d'obtenir plus rapidement un produit ayant des caractéristiques similaires au *panettone* traditionnel (18).

#### 4.4.6 Pain de San Francisco

Le pain de San Francisco est traditionnellement fabriqué à partir du célèbre levain dit de San Francisco, qui présente une communauté microbienne typique, essentiellement composée de *L. sanfranciscensis* et *S. exiguus* (renommée *K. exigua*). La fabrication traditionnelle utilise un levain de type I. Plusieurs rafraîchis et de longues fermentations à basse température permettent d'augmenter la concentration d'acide acétique synthétisé par *L. sanfranciscensis*, hétérofermentaire obligatoire. Récemment, un levain liquide de San Francisco, stabilisé par pasteurisation, a été introduit sur le marché. Ainsi, le levain de type III est lui aussi utilisé comme agent acidifiant et aromatisant pour la fabrication du pain de San Francisco en trois heures environ (procédé rapide ou « *no-time dough* ») (voir chap. 4.7) (12).

### 4.5 Stabilité du microbiote du levain durant sa fermentation et son utilisation

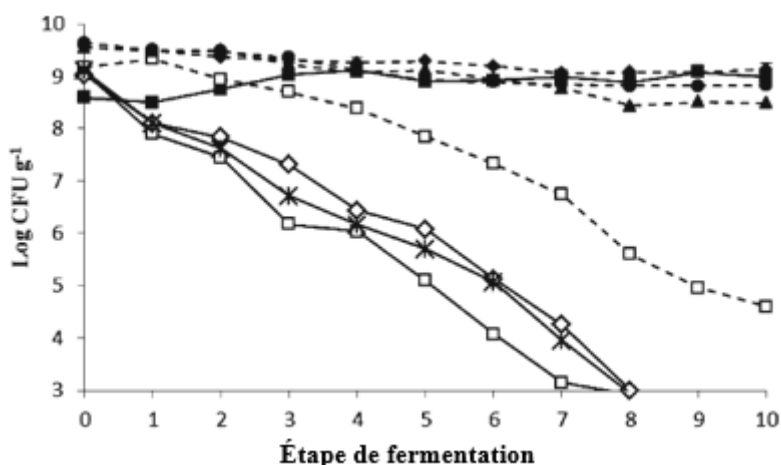
Afin de maintenir les micro-organismes en activité, les levains de type I sont généralement fermentés tous les jours. Cela entraîne des problèmes de stabilité du microbiote durant la fermentation et d'utilisation de ce type de « levain biologique ».

En général, on considère qu'un levain est prêt à l'emploi (par ex. levain-chef, voir chap. 4.2) pour la production de pain ou d'autres produits de boulangerie quand il présente les caractéristiques de base suivantes :

- prévalence d'une communauté microbienne différente de celle de la farine utilisée comme matière première (3, 19, 20) ;
- proportion stable de bactéries lactiques et de levures (100:1 ou plus) (7) ;
- prédominance de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et, surtout, obligatoires sur d'autres bactéries lactiques (3).

D'après Vrancken *et al.* (21), les levains de laboratoire à base de blé, de seigle ou d'épeautre rafraîchis chaque jour atteignent un équilibre grâce à un processus en trois étapes : (1) prévalence de bactéries lactiques atypiques du levain, (2) prévalence de bactéries lactiques typiques du levain, et (3) prévalence de bactéries lactiques typiques du levain et très bien adaptées (21). Dans une analyse comparative récente de sept levains à point de type I, rafraîchis pendant quatre-vingt jours à l'échelle artisanale et en laboratoire avec des paramètres technologiques constants, Minervini *et al.* (22) ont montré que, si la densité cellulaire des bactéries lactiques présumées et les caractéristiques biochimiques associées n'étaient pas affectées par l'environnement de fermentation, tous les levains hébergeaient un certain nombre d'espèces et de souches dominantes à chaque étape et qui, dans plusieurs cas, variaient en fonction de l'environnement de fermentation (21).

Par ailleurs, outre des espèces et des souches stables, d'autres bactéries lactiques contaminaient temporairement les levains, avec des différences entre la production artisanale et en laboratoire. Il est intéressant de constater que cette succession occasionnelle de souches et d'espèces n'affectait que peu la cinétique de l'acidification du levain ; néanmoins, elle a eu un impact sur les propriétés sensorielles du produit fini à pâte levée. Globalement, étant donné que le microbiote doit être stable durant la fermentation et l'utilisation du levain pour obtenir des produits finis normés et reproductibles, le problème de la stabilité microbienne en termes de composition des souches et des espèces dans le levain de type I propagé selon différents paramètres endogènes (par ex. type de farine, quantité d'eau) et exogènes (par ex. température/durée de fermentation) mérite une attention particulière, pour ce qui est de l'identification et de la classification des micro-organismes dominants et sous-dominants (voir chap. 4.6.1) et de la sélection de souches de starters robustes, bien adaptables et performantes (23).



**III. 4.2** Persistance de souches de *Lactobacillus plantarum* (DB200, --◆-- ; 12H1, --◡-- ; 2MF8, --◡-- ; G10C3, --◡--) et *Lactobacillus sanfranciscensis* (LS6, -◡- ; LS41, -n- ; LS48, —◡— ; LS3, —X—) après fermentation au levain à 30°C pendant six heures, durant dix jours consécutifs (adapté de (24) et de (23))

La robustesse des lactobacilles du levain varie en fonction des espèces et des souches. Tandis que la majorité des souches *L. sanfranciscensis* présentait une faible robustesse durant les rafraîchissements quotidiens effectués en laboratoire (24), des souches sélectionnées de *L. plantarum* semblaient partager plusieurs traits phénotypiques qui déterminaient la capacité à dominer le biote contaminant de bactéries lactiques (23) (Ill. 4.2).

## 4.6 Méthodes pour évaluer la performance du levain

La performance d'un levain est évaluée à l'aide de paramètres microbiologiques et physicochimiques. Le niveau de complexité varie et dépend de l'objectif des analyses. L'aspect microbiologique consiste essentiellement à évaluer la communauté de bactéries lactiques et de levures dans la mesure où ces micro-organismes sont dominants dans un levain de bonne qualité, avec, généralement, une proportion d'environ 100:1 (7). Néanmoins, de nombreuses méthodes phénotypiques et génotypiques sont nécessaires pour identifier la composition des espèces et des souches du microbiote dominant et sous-dominant du levain. Voici un aperçu de ces méthodes.

### 4.6.1 Dénombrement des bactéries lactiques et des levures

La numération microbienne standard sert à évaluer la densité cellulaire des bactéries lactiques et des levures. On distingue différents milieux de culture adaptés pour dénombrer les bactéries lactiques du levain : le milieu SDB (« *Sour Dough Bacteria* ») décrit par Kline et Sugihara (25) ou le milieu MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) (51), dont le pH et la composition nutritionnelle ont été modifiés (avec notamment du maltose et du fructose, respectivement sources de carbone et accepteurs d'électrons, et de la cystéine comme agent de réduction (26-28)) ; le milieu Homohiochii, préconisé surtout pour dénombrer les bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires (29) ; le milieu SFM (« *San Francisco medium* »), qui contient du son de blé ou de seigle, particulièrement utile pour les bactéries lactiques et les lactobacilles (30).

À ces milieux, le cycloheximide (100 ppm) peut être ajouté pour inhiber la croissance de la levure si nécessaire.

Les levures sont généralement dénombrées sur gélose nutritive WL (31), gélose YPDA (32, 33), gélose de Sabouraud au dextrose (34, 35), gélose YGC (14) et gélose à l'extrait de malt (36). Pour inhiber la croissance bactérienne, tous les milieux susmentionnés contiennent généralement 50 à 100 ppm de chloramphénicol.

### 4.6.2 Analyses phénotypiques et génétiques pour identifier et classer les bactéries lactiques et les levures

Les bactéries lactiques et les levures du levain sont généralement identifiées par méthode polyphasique, avec des tests phénotypiques et génotypiques.

Outre les tests morphologiques et physiologiques, des analyses biochimiques ciblées permettent d'identifier au niveau des espèces *Weissella* spp., *Pediococcus* spp. et *Enterococcus* spp., ainsi que les bactéries lactiques prédominantes du levain, souvent du genre *Lactobacillus* (19). Dans ce cas, un minitest commercial (par ex. API 50 CHL, bioMérieux, France) ou un test automatisé (par ex. système Biolog) est souvent utilisé après une évaluation préliminaire basée sur la morphologie cellulaire, la coloration de Gram, le test catalase, la croissance à 15°C et 45°C, la production de CO<sub>2</sub> à partir de glucose et la libération de NH<sub>3</sub> à partir

d'arginine (37). Néanmoins, la diversité biochimique élevée du genre susmentionné fait que le système d'identification doit comprendre une analyse chimiotaxonomique (par ex. SDS-PAGE, électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium appliquée aux protéines totales ou constitutives des parois cellulaires) (38, 39) ou, principalement, des tests génotypiques comme le séquençage du gène ARNr 16S (30). En outre, sur la base des amorces spécialement conçues pour cibler des séquences spécifiques aux espèces, de nombreux systèmes d'identification rapide ayant recours à la PCR (par ex. PCR multiplexe, PCR basée sur la région intergénique) ont été utilisés récemment pour identifier les bactéries lactiques du levain (27, 40, 41). Parmi les systèmes génotypiques, la PCR-RAPD (Amplification aléatoire d'ADN polymorphe), le RFLP (Polymorphisme de longueur des fragments de restriction) ou la PFGE (Électrophorèse sur gel en champ pulsé) ont permis d'évaluer les différences intraspécifiques (par ex. identification de la souche) (38, 42, 43).

À partir d'un système d'identification similaire à celui qui vient d'être décrit, il est possible d'identifier préalablement les levures du levain par une approche phénotypique avec morphologie des cellules et des colonies, présence et nombre de spores, tests sur la fermentation/l'assimilation des glucides, des acides organiques, des alcools et des nitrites à l'aide de kits commerciaux (par ex. ID32C, API 20C AUX, RapID Yeast Plus System, *Rapid Yeast Plus*), croissance à différentes températures et concentrations en sel (44).

Comme pour les bactéries lactiques, les techniques d'identification par analyse des acides gras, des protéines et des polysaccharides peuvent être appliquées aux levures. L'approche génotypique est souvent basée sur le séquençage de divers gènes ribosomiques (par ex. 18S, 5,8S, 26S, 5S et fragments) (45), ainsi que sur la PCR-RFLP d'ADNr 5,8S-ITS (Espaceurs internes transcrits) (34). Pour les bactéries lactiques, l'identification de la souche de levure se fait principalement par la technique PCR-RAPD.

Les bactéries lactiques et les levures peuvent être identifiées et suivies durant la fermentation au levain par des systèmes non basés sur une culture, comme la PCR-DGGE (Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant), généralement axée sur l'amplification de régions variables spécifiques des gènes ARNr 16S ou 26S, respectivement des bactéries lactiques et des levures. Meroth *et al.* (14, 15) ont adopté une approche similaire pour évaluer l'effet de la fermentation des levains de types I et II sur la dynamique de la population microbienne.

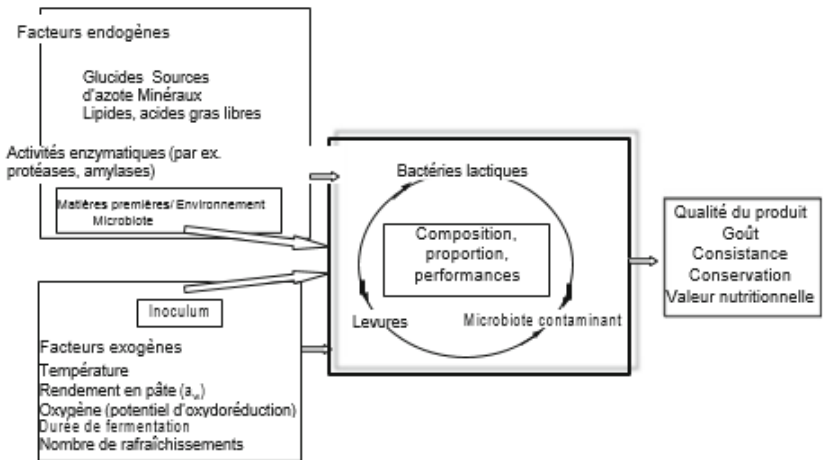
### 4.6.3 Détermination des paramètres physicochimiques

L'équilibre entre les communautés de bactéries lactiques et de levures et la composition des communautés microbiennes en termes d'espèces et de souches a un impact sensible sur les performances du levain et la qualité globale des produits de boulangerie à pâte levée. La communauté microbienne est influencée par certaines caractéristiques du levain et modifie elle-même la composition chimique et les paramètres physiques du levain, ce qui se reflète dans la qualité des produits (Ill. 4.3). L'ensemble des caractéristiques physicochimiques du levain, liées à sa performance est déterminé par l'évaluation des paramètres suivants :

- rendement en pâte (DY pour *Dough Yield*)
- acidité de la pâte (pH et acidité titrable totale, ATT)
- quotient de fermentation (QF).

**Rendement en pâte (DY).** Le rendement en pâte désigne la proportion d'eau et de farine dans la pâte et décrit la consistance de la pâte. Les farines n'ayant pas la même capacité d'absorption de l'eau, un même DY donne des pâtes de consistance différente. Le rendement en pâte est calculé de la façon suivante :  $DY = (\text{poids de farine} + \text{poids d'eau}) \times 100 / \text{poids de farine}$ . S'il y a d'autres ingrédients, la formule devient :  $DY = \text{poids de pâte} \times 100 / \text{poids de farine}$ .

Globalement, un levain pâteux à base de farine de blé a un rendement en pâte de 150-160. Un levain liquide a un rendement en pâte proche de 200. Des valeurs intermédiaires de DY désignent une pâte souple (12). Le rendement en pâte et la température de fermentation semblent avoir un impact sensible sur le goût du levain et surtout le rapport molaire entre les acides lactique et acétique (QF).



III. 4.3 Facteurs endogènes et exogènes ayant un impact sur les caractéristiques et les performances du levain ainsi que sur la qualité globale du produit final (adapté de (4))

De façon générale, un levain pâteux fermenté à 25-30°C contient plus d'acide acétique, tandis qu'une pâte liquide fermentée à 35-37°C contient plus d'acide lactique (12, 46). Naturellement, en fonction de l'adaptation microbienne aux divers facteurs environnementaux, la combinaison du rendement en pâte et de la température durant les rafraîchis a un impact sensible sur le microbiote du levain et sa qualité.

L'acide acétique joue un rôle important car il agit sur de nombreuses propriétés du pain (goût, pain filant, conservation) et sa teneur dans le levain peut être augmentée par l'addition de fructose ou par l'aération en présence de lactobacilles hétérofermentaires (47). Dans de nombreux cas, l'effet de la température sur le taux d'acide acétique dans les levains de type I (généralement fermentés à une température d'environ 25°C) peut dépendre directement de l'activité des levures : à basse température, les levures se développent et hydrolysent le kestose et d'autres fructo-oligosaccharides, le fructose servant d'accepteur d'électrons, ce qui stimule la production d'acide acétique par *L. sanfranciscensis* par voie de l'acétate kinase (47). À une température élevée (plus de 32°C), la croissance des levures est inhibée, les fructo-oligosaccharides ne sont pas hydrolysés et *L. sanfranciscensis* dispose de moins de fructose pour la production d'acétate (48).

*pH*. Un pH final compris entre 3,5 et 4,3 est généralement considéré comme un indice de bonne fermentation au levain (50). Le pH du levain influe sur les valeurs du pH de la pâte finale et du pain, en fonction de la quantité de levain tout point utilisé comme inoculum. Dans le cas d'un inoculum standard de 20 % (rapporté au poids de pâte), le pH de la pâte finale est généralement compris entre 4,7 et 5,4 (50).

*ATT (Acidité titrable totale)*. L'ATT mesure l'ensemble des acides organiques synthétisés durant la fermentation au levain. L'ATT est exprimée en ml de NaOH 0,1 N/10 g de pâte. L'ATT est comprise entre 30 et 150 ml NaOH 0,1 N/10 g pour les levains liquides et entre 40 et 220 NaOH 0,1 N/10 g pour les levains déshydratés. Néanmoins, la valeur optimale d'ATT pour le levain dépend du type de pain. Globalement, un levain qui a une ATT élevée convient mieux aux pains à base de farine de seigle (48).

*Quotient de fermentation (QF)*. Le QF indique le rapport molaire entre les acides lactique et acétique durant la fermentation au levain. Après la détermination de la concentration des acides lactique et acétique par méthode enzymatique ou chromatographique, le QF est calculé de la façon suivante :  $QF = (g \text{ d'acide lactique dans } 100 \text{ g de pâte/masse molaire de l'acide lactique}) : (g \text{ d'acide acétique dans } 100 \text{ g de pâte/masse molaire de l'acide acétique})$ . Ce paramètre est directement lié au type de bactéries lactiques qui dominent la fermentation et varie sensiblement en fonction de l'équilibre entre les lactobacilles homofermentaires et hétérofermentaires. Cet équilibre dépend lui-même des facteurs exogènes et endogènes présents durant la fermentation (par ex. concentration de sucre fermentescible et d'oxygène, rendement en pâte, durée et température, etc.).

## 4.7 Utilisation de levains stabilisés versus levains actifs

À partir des progrès réalisés dans le domaine de la recherche sur la biotechnologie en boulangerie, de nouveaux types de levain ont été récemment développés, dont l'objectif principal est d'améliorer le goût des produits de boulangerie à pâte levée, sans avoir recours aux protocoles traditionnels basés sur le levain actif. Actuellement, différentes préparations commerciales de levain stabilisé sont disponibles sur le marché. Elles servent à faire des pains traditionnels et sont basées sur un mélange de composés aromatiques adaptés aux différents besoins. Divers types de levains stabilisés sont obtenus à partir d'une sélection précise et d'un mélange de matières premières (par ex. farine de blé *T. aestivum* ou *T. durum*, de seigle ou d'autres céréales) et de souches bactériennes. Le levain déshydraté est un type de produit stabilisé utile à cette fin. Différents protocoles de séchage peuvent être appliqués, comme le séchage par congélation, la granulation par pulvérisation, le séchage par lit fluidisé, le séchage par atomisation et le séchage en tambours. Ces deux dernières techniques sont les plus fréquemment utilisées pour la production de levain de type III (12, 48). Dans les deux cas, plus le rendement en pâte du levain de type II est élevé, plus l'ATT du levain de type III qui en découle sera élevée, sachant qu'elle augmente également en raison de l'évaporation de l'eau. Dans le processus de séchage par atomisation, le levain liquide est déshydraté par un flux d'air chaud jusqu'à ce que l'humidité soit inférieure à 10 %. Dans le cas du séchage en tambours, la vapeur des tambours chauds extrait l'eau du levain liquide étalé en fine couche. Les différentes combinaisons de durée et de température et le degré d'intensité de la réaction de Maillard produisent différents levains de type III, avec divers degrés de caramélisation ou de dorure et, par conséquent, différents goûts. Étant donné que l'évaporation élimine de nombreux composés volatiles (en particulier l'acide acétique), bien qu'à des degrés variables en fonction de la technique de séchage, la pasteurisation, le refroidissement ou le salage permettent d'obtenir un levain liquide ou pâteux stabilisé (12, 48). À l'exception du refroidissement, tous les autres systèmes de stabilisation entraînent l'inactivation du microbiote et inhibent la production de gaz et/ou d'acide (48), ce qui donne un levain apparenté au type III.

Le levain liquide représente un avantage pour les applications industrielles car il peut être pompé et facilement dosé, tout en conservant une qualité constante (12). Généralement, l'utilisation d'un levain stabilisé est simple. Il peut être stocké à température ambiante pendant une longue durée (trente à soixante jours) et directement ajouté à la pâte finale à hauteur de 5 à 10 %. En raison de la faible densité cellulaire des bactéries lactiques et des levures, de la levure de boulangerie est généralement ajoutée pour fermenter la pâte destinée à la production de pain.

Aujourd'hui, le levain de type III trouve diverses applications en boulangerie : levain de seigle liquide stabilisé pour la production de pain de seigle, et levain contenant du dextrane (produit à partir de souches sélectionnées de *L. mesenteroides*) stabilisé par refroidissement, pasteurisation ou séchage pour la production du *panettone*, du pain de seigle et du pain de mie ou levain pasteurisé de San Francisco sous forme liquide pour la production du pain de San Francisco (12).

Actuellement, le principal problème auquel sont confrontés les fabricants de pain au levain est la sélection de souches microbiennes qui repose sur différentes caractéristiques métaboliques associées aux principaux composés aromatiques. Globalement, des souches isolées de matières premières ou de levains sont sélectionnées *in vitro* et *in situ* et évaluées principalement à partir de la cinétique de l'acidification, de l'activité protéolytique et du métabolisme de l'azote et de la synthèse des composés aromatiques. Récemment, des processus de fermentation basés sur des bactéries lactiques sélectionnées et des levains liquides ont été évalués en vue d'améliorer la biosynthèse de composés chimiques spécifiques (49).

## 4.8 Utilisation de starters versus levains stabilisés

Comme pour d'autres biotechnologies d'aliments fermentés (produits laitiers, vins, viandes), l'intérêt pour les starters commerciaux augmente rapidement chez les fabricants de pain au levain. Certaines recherches ont été consacrées à l'utilisation de préparations de bactéries lactiques séchées par congélation ou surgelées (4, 20). Toutefois, seules quelques applications de starters de bactéries lactiques sélectionnées sont actuellement étudiées au niveau artisanal et industriel. La difficulté réside principalement dans le fait d'obtenir des préparations à forte concentration de bactéries lactiques et des bactéries lactiques obtenues *in situ* qui soient performantes. Au niveau de l'application, les cultures des starters devraient être pré-cultivées dans un mélange de farine et d'eau afin d'obtenir des souches actives sur le plan métabolique avant d'être utilisées comme inoculum. Les chercheurs ont toutefois constaté que nombre de souches sélectionnées *in vitro* pour leurs caractéristiques intéressantes dominent difficilement l'écosystème du levain et les bactéries lactiques endogènes au cours des rafraîchis. Récemment, Siragusa *et al.* (24) ont montré qu'après dix rafraîchis consécutifs, seules trois souches de *L. sanfranciscensis* sur neuf, sélectionnées *in vitro* pour leur taux d'acidification optimal, leur activité protéolytique et leur apport de composés aromatiques, ont pu survivre à la fermentation au levain en raison de la prédominance de souches autochtones de *L. plantarum*. La capacité des souches à s'adapter à l'écosystème du levain semble donc être un critère essentiel pour leur sélection en vue d'obtenir un levain qui présente une composition microbienne et une performance constantes.

Actuellement, cela semble être la principale limite à l'utilisation de cultures pures comme starters et les applications les plus innovantes sont majoritairement associées à l'utilisation de levains stabilisés.

## Références

1. Corsetti A, Farris GA, Gobbetti M (2010) Uso del lievito naturale. In: Gobbetti M, Corsetti A (eds) *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, cap. 9
2. Onno B, Roussel P (1994) Technologie et microbiologie de la panification au levain. In: De Roissart H, Luquet FM (eds) *Bactéries lactiques*, vol 11. Lorica, Uriage, France, cap. V-5
3. Corsetti A, Settanni L (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation: a review. *Food Res Int* 40:539–558
4. Hammes WP, Gänzle MG (1998) Sourdough breads and related products. In: Woods BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*, vol 1. Blackie Academic and Professional, London, cap. 8
5. Wood BJB (2000) Sourdough bread. In: Robinson RK, Batt CA, Patel PD (eds) *Encyclopedia of food microbiology*, vol 1. Academic, London
6. De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 24:120–127
7. Gobbetti M (1998) The sourdough microflora, interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Tech* 9:267–274
8. Kulp K (2003) Baker's yeast and sourdough technologies in the production of U.S. bread products. In: Kulp K, Klaus L (eds) *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker, New York, cap. 5
9. Ottogalli G, Galli A, Foschino R (1996) Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Adv Food Sci* 18:131–144
10. Böcker G, Stolz P, Hammes WP (1995) Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des sauersteig-typischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Brot* 49:370–374
11. Hammes WP (1991) Fermentation of non-dairy food. *Food Biotech* 5:293–303
12. Decock P, Cappelle S (2005) Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Tech* 16:113–120
13. Wiese BG, Strohmair W, Rainey FA, Diekmann H (1996) *Lactobacillus panis* sp. Nov., from sourdough with a long fermentation period. *Int J Syst Bacteriol* 46:449–453
14. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475–482
15. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient Gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:7453–7461
16. Pagani MA, Lucisano M, Mariotti M (2007) Traditional Italian products from wheat and other starchy flours. In: Hui YH (ed) *Handbook of food products manufacturing*. Wiley Interscience New York, USA, pp 327–388
17. Spicher G, Pomeranz Y (1985) Bread and other baked products. In: Ullmann's *Encyclopedia of industrial chemistry*, vol A4, 5th edn. Verlag VCH, Weinheim
18. Vandamme EJ, Renard CEFG, Arnaut FRJ, Vekemans NMF, Tossut PPA (1997) Process for obtaining improved structure build-up of baked products. EP 0 790 003 B1
19. Corsetti A, Settanni L, Valmorri S, Mastrangelo M, Suzzi G (2007) Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiol* 24:592–600
20. De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Tech* 16:43–56
21. Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, Leroy F, De Vuyst L (2011) Influence of temperature and backslopping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 77:2716–2726
22. Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M (2012) Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic Acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl Environ Microbiol* 78:5328–5340
23. Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Pinto D, Siragusa S, Rizzello CG, Gobbetti M (2010) Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. *Food Microbiol* 27:897–908
24. 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. *Appl Environ Microbiol* 75:1099–1109
25. Kline L, Sugihara TF (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl Microbiol* 21:459–465
  26. 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. *Int J Food Microbiol* 64:95–104
  27. Corsetti A, Settanni L, Van Sinderen D, Felis GE, Dellaglio F, Gobbetti M (2005) *Lactobacillus rossii* sp. nov. isolated from wheat sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:35–40
  28. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2004) Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27:151–159
  29. Kleynmans U, Heinzl H, Hammes WP (1989) *Lactobacillus suebicus* sp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. *Syst Appl Microbiol* 11:267–271
  30. Vogel RF, Böcker G, Stolz P, Ehrmann M, Fanta D, Ludwig W, Pot B, Kersters K, Schleifer KH, Hammes WP (1994) Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 44:223–229
  31. Rossi J (1996) The yeasts in sourdough. *Adv Food Sci* 18:201–211
  32. Garofalo C, Silvestri G, Aquilanti L, Clementi F (2008) PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *J Appl Microbiol* 105:243–254
  33. Gatto V, Torriani S (2004) Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16 S and 26 S rRNA gene fragments. *Ann Microbiol* 54:31–42
  34. Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, De Vero L, Giudici P (2004) Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett Appl Microbiol* 38:113–117
  35. Vernocchi P, Valmorri S, Gatto V, Torriani S, Gianotti A, Suzzi G, Guerzoni ME, Gardini F (2004) A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Res Int* 37:469–476
  36. 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 Microbiol* 26:128–135
  37. Hammes WP, Vogel RF (1995) The genus *Lactobacillus*. In: Woods BJB, Holzapfel WH (eds) The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, pp 19–54
  38. Corsetti A, De Angelis M, Dellaglio F, Paparella A, Fox PF, Settanni L, Gobbetti M (2003) Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell wall protein analyses. *J Appl Microbiol* 94:641–654
  39. Ricciardi A, Parente E, Piratino P, Paraggio M, Romano P (2005) Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *Int J Food Microbiol* 98:63–72
  40. De Angelis M, Di Cagno R, Gallo G, Curci M, Siragusa S, Crecchio C, Parente E, Gobbetti M (2007) Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. *Int J Food Microbiol* 114:69–82
  41. Torriani S, Felis GE, Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* 67:3450–3454
  42. Gänzle MG, Vogel RF (2003) Contribution of reutericyclin to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol* 80:31–45
  43. Zapparoli G, Torriani S, Dellaglio F (1998) Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 166:324–332
  44. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2000) Yeast: characteristics and identification, 3rd

- edn. Cambridge University Press, Cambridge
45. Fernandez-Espinar MT, Martorell P, de Llanos R, Querol A (2006) Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: *Yeasts in food and beverages*. Springer, Berlino, pp 55–82
  46. Onno B (1994) Les levains. In: Guinet R, Godin B (eds) *La panification française*. Lavoisier, Paris, cap. 8
  47. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Tech* 16:57–69
  48. Brandt MJ (2007) Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol* 24:161–164
  49. Carnevali P, Ciatì R, Leporati A, Paese M (2007) Liquid sourdough fermentation: industrial application perspectives. *Food Microbiol* 24:150–154
  50. Collar C, Benedito de Barber C, Martínez-Anaya MA (1994) Microbial sourdoughs influence acidification properties and bread-making potential of wheat dough. *J Food Sci* 59:629–633
  51. De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130–135

## Chapitre 5 (extraits)

# Taxonomie et biodiversité des levures et des bactéries lactiques du levain

Geert Huys, Heide-Marie Daniel et Luc De Vuyst

## 5.1 Taxonomie des levures et des bactéries lactiques du levain

### 5.1.1 Taxonomie des levures du levain

Les levures sont des champignons microscopiques présentant une reproduction végétative par bourgeonnement ou scission conduisant à une structure unicellulaire et une reproduction sexuée, dans ou hors d'un appareil fructifère, qui mène à la formation de spores [1]. D'un point de vue agroalimentaire et scientifique, les levures majoritaires font partie des eucaryotes. Les levures présentes dans les communautés microbiennes du levain ont en commun une faculté d'adaptation à cet environnement spécifique et stressant, dû notamment à un pH faible, de fortes concentrations de glucides et des densités cellulaires élevées de bactéries lactiques. Cette faculté d'adaptation est présente chez les espèces appartenant principalement à un embranchement de l'arbre phylogénétique des champignons, qui comprend les levures ascomycètes. Dans cet embranchement, reconnu par la classification actuelle dans le phylum Ascomycètes, sous-phylum Saccharomycotina, classe Saccharomycetes, ordre Saccharomycetales [2], les levures du levain appartiennent à des genres différents.

---

G. Huys

BCCM/LMG Bacteria Collection and Laboratory for Microbiology,  
Département de biochimie et microbiologie, Faculté des Sciences, Université de Gand  
K.L. Ledeganckstraat 35, 9000 Gand, Belgique

H.-M. Daniel

Mycothèque de l'Université catholique de Louvain (MUCL),  
Earth and Life Institute, Microbiologie appliquée, Mycologie, Université catholique de  
Louvain, Croix du Sud 3 bte 6, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique

L. De Vuyst (\*)

Research Group of Industrial Microbiology et Food Biotechnology, Faculté des sciences  
et des sciences en bio-ingénierie, Vrije Universiteit van Brussel,  
Bd de la Plaine 2, 1050 Bruxelles, Belgique  
e-mail : ldvuyst@vub.ac.be

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*,  
DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0\_5, © Springer Science+Business Media New York 2013

Les principales levures du levain appartiennent à des genres actuellement classés dans la famille des Saccharomycetaceae, bien que, par manque de données, le classement par famille des genres de levure reste difficile. Les levures basidiomycètes et les ascomycètes dimorphiques, également adaptées à une croissance en milieu liquide grâce à leur forme de croissance unicellulaire, n'ont pas les capacités de fermentation présentes chez les Saccharomycetales, essentielles pour une croissance dans des environnements pauvres en oxygène. La taxonomie des Saccharomycetales, traditionnellement basée sur la morphologie et la physiologie, est en adaptation aux nouvelles connaissances basées sur les liens évolutifs établis à partir de séquences géniques ; en d'autres termes, un système phylogénétique de classification est cours d'élaboration [2]. Cela implique un certain nombre de changements de nom. Le nouveau nom des genres a l'avantage de refléter l'origine génétique commune des espèces de levure apparentées, ce qui offre une classification plus informative, contrairement à la précédente classification assez artificielle sous l'angle taxonomique.

Nous présentons ici un aperçu des récents changements de nom des espèces obtenues à partir de levain. Les changements de nom les plus pertinents pour les levures présentes dans le levain concernent les genres *Saccharomyces* Meyen ex Reess et *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. Le genre *Saccharomyces* a été limité au groupe d'espèces connues sous le nom de *Saccharomyces sensu stricto*, qui comprend l'espèce type du genre, *Saccharomyces cerevisiae*, sur la base de séquences géniques multiples [3]. Le groupe d'espèces anciennement appelé *Saccharomyces sensu lato* a été divisé en plusieurs genres. Le nouveau genre *Kazachstania* comprend les anciens *Saccharomyces exiguus*, *Saccharomyces unisporus* et *Saccharomyces barnettii*, devenus respectivement *Kazachstania exigua*, *Kazachstania unispora* et *Kazachstania barnettii*. *Saccharomyces kluyveri* a été attribué au nouveau genre *Lachancea*, sous le nom de *Lachancea kluyveri*. Le genre *Pichia* a été limité aux espèces étroitement apparentées à l'espèce type générique *Pichia membranifaciens*, dont *Pichia fermentans* [4]. L'ancien genre *Issatchenkia* a été intégré au nouveau genre *Pichia*, car ses espèces se trouvent sur le même embranchement que l'espèce type *P. membranifaciens* sur l'arbre phylogénétique, basé sur de séquences géniques multiples utilisées pour redéfinir les genres. Tandis que l'épithète de l'espèce *Issatchenkia occidentalis* a été préservée dans son nouveau nom *Pichia occidentalis*, le nom *Issatchenkia orientalis* a dû être entièrement modifié en *Pichia kudriavzevii*, car la combinaison genre -espèce *Pichia orientalis* était déjà assignée à une autre espèce. La parenté des anciennes espèces *Pichia anomala* et *Pichia subpelliculosa* à l'espèce type générique *P. membranifaciens* s'étant avérée lointaine seulement, ces deux espèces ont été assignées au nouveau genre *Wickerhamomyces*, sous le nom de *Wickerhamomyces anomalus* et *Wickerhamomyces subpelliculosus*. Kurtzman a présenté un compte-rendu des considérations taxonomiques, y compris l'ancien nom de genre *Hansenula* [5, 6]. D'autres espèces de l'ancien genre *Pichia*, occasionnellement isolées dans le levain, ont été réassignées à de nouveaux genres, même si l'épithète de l'espèce a été conservée : *Kodamaea ohmeri*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Millerozyma farinosa*, *Ogataea polymorpha*, *Saturnispora saitoi* et *Scheffersomyces stipitis*.

Pour déterminer les entités, ou taxons<sup>1</sup>, qui méritent notre attention dans le contexte du levain, environ quarante publications originales ont été passées en revue ; les espèces citées à plusieurs reprises sont listées dans le Tableau 5.1.

Ces publications couvrent une période allant du début des années 1970 à aujourd'hui ; il est évident qu'elles ne s'appuient pas toutes sur les techniques d'identification considérées actuellement comme les plus exactes. Cependant, la plupart des six espèces citées régulièrement (au moins dans sept articles), à savoir *S. cerevisiae* (syn.<sup>2</sup> *S. fructuum*), *Candida humilis* (syn. *Candida milleri*), *P. kudriavzevii* (syn. *I. orientalis*, anamorphe *Candida krusei*), *K. exigua* (syn. *S. exiguus*, anamorphe *Candida [Torulopsis] holmii*), *Torulasporea delbrueckii*, anamorphe *Candida colliculosa* et *W. anomalus* (syn. *P. anomala*, *Hansenula anomala*, anamorphe *Candida pelliculosa*), peuvent être assez bien distinguées par des méthodes classiques basées sur la morphologie et la physiologie, utilisées dans les publications en question et ce, jusqu'à la fin des années 1990. Toutefois, une comparaison entre les études qui ont recours à des techniques d'identification phénotypiques (n = 19) et celles qui reposent sur des techniques basées sur l'ADN (n = 23) montre que l'incidence de *C. humilis* a sensiblement augmenté dans le second cas, probablement aux dépens de *K. exigua*, moins fréquemment détectée. Ces deux espèces très proches sur le plan phylogénétique peuvent être confondues avec des méthodes d'identification phénotypiques. Par exemple, à l'origine, *S. exiguus* a été signalée dans le levain de San Francisco [7], alors que certaines souches de cette étude préservées dans des collections de culture ont servi plus tard à la description de *C. milleri*, actuellement synonyme de *C. humilis*. L'isolat du levain M14, décrit comme *S. exiguus* et déposé comme CBS 7901, a été présenté comme apparenté à *C. humilis* après des analyses basées sur l'ADN [29, 50]. La régularité de la présence de *S. cerevisiae*, *C. humilis*, *P. kudriavzevii*, *K. exigua*, *T. delbrueckii* et *W. anomalus* dans le levain traduit leur association commune avec ce substrat. Ce n'est pas nécessairement une association exclusive avec les levains et certaines espèces doivent être considérées comme ubiquistes, aptes à prospérer dans des conditions environnementales variables comme, par exemple, *W. anomalus* [51], alors qu'une niche écologique spécifique a été identifiée pour les espèces les plus fréquentes de *S. cerevisiae* [52]. D'autres espèces apparaissent moins souvent dans le levain : *Candida glabrata*, *P. membranifaciens* (anamorphe *Candida valida*), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida stellata* (syn. *Torulopsis stellata*), *K. unispora* (syn. *S. unisporus*, *Torulopsis unisporus*), *Kluyveromyces marxianus* (anamorphe *Candida kefir*), *M. guilliermondii* (syn. *Pichia guilliermondii*, anamorphe *Candida guilliermondii*) et *Saccharomyces pastorianus*. Enfin, quatorze espèces mentionnées une seule fois peuvent être considérées comme transitoires ou fortuites dans l'écosystème du levain (Tableau 5.2).

<sup>1</sup> Un taxon renvoie à un groupe d'individus considérés comme formant une unité. Un taxon peut ou non porter un nom ou un rang (espèce, genre, famille, etc.). Ce terme sert principalement à communiquer sur des unités taxonomiques sans la nécessité ou la possibilité d'être plus spécifique à leur sujet.

<sup>2</sup> Les synonymes et les noms des formes asporogènes (forme asexuelle ou anamorphe qui ne produit pas d'ascospores) sont mentionnés uniquement s'ils sont utilisés dans les publications sur le levain. Il est préférable d'utiliser le nom de la forme sporogène (forme sexuelle ou téléomorphe) quand il existe et si aucune raison valable ne justifie la mention explicite de la forme asporogène.

**Tableau 5.1** Présentation des études originales qui ont analysé la diversité des levures dans les levains. Seules les espèces présentes à plusieurs reprises sont listées. Le nombre dans la colonne des espèces correspond au nombre d'isolats obtenus. Il dépend de la méthode d'isolement (i.e. un ou de multiples représentants du même morphotype de colonie) et sert principalement à évaluer l'abondance d'une espèce dans une étude donnée. « x » correspond aux cas où le nombre de l'isolat n'était pas spécifié. Plusieurs « x » indiquent l'abondance relative d'une espèce détectée quand elle est mentionnée. Les études portant sur plusieurs levains peuvent inclure des levains dont la composition d'espèces de levures est différente. Toutefois, il n'a pas été possible de présenter une répartition plus détaillée des espèces de levures par levain, car les études n'ont pas toutes fourni les données nécessaires à cette fin. Les synonymes ou formes asporogènes (anamorphes) ne sont indiqués que s'ils sont utilisés dans les références citées ou s'ils résultent de changements récents de taxonomie.

| Référence | Blé (W), seigle (R), sorgo (S), orge (B), maïs (M), épeautre (Sp), sarrasin (Bw), teff (T) | Nombre de levains analysés | Identification phénotypique (P) ou moléculaire (M) | Pays      | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>syn. <i>S. fructuum</i> | <i>Candida humilis</i> | <i>Candida milleri</i><br>syn. of <i>C. humilis</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i><br>syn. <i>Issatchenkia orientalis</i><br>Anamorphe <i>C. krusei</i> | <i>Kazachstania exigua</i><br>syn. <i>S. exiguus</i><br>Anamorphe <i>C. (Torulopsis) holmii</i> | <i>Torulaspora delbrueckii</i><br>Anamorphe <i>C. colliculosa</i> | <i>Wickerhamomyces anomalus</i><br>syn. <i>P. anomala</i> , <i>Hansenula anomala</i><br>Anamorphe <i>C. pelliculosa</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Pichia membranifaciens</i><br>Anamorphe <i>C. valida</i> | <i>Candida parapsilosis</i> | <i>Candida stellata</i><br>syn. <i>T. stellata</i> | <i>Candida tropicalis</i> | <i>Kazachstania unispora</i><br>syn. <i>S. unisporus</i> , <i>T. unisporus</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i><br>Anamorphe <i>C. kefir</i> | <i>Meyerozyma guilliermondii</i><br>syn. <i>P. guilliermondii</i><br>Anamorphe <i>C. guilliermondii</i> |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [7]       | W                                                                                          | 5                          | P                                                  | Etats-    |                                                            | 148 <sup>a</sup>       |                                                     |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [8]       | W                                                                                          | 3                          | P                                                  | Italie    |                                                            |                        |                                                     |                                                                                                 | x                                                                                               |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [9]       | R                                                                                          | 2                          | P                                                  | Allemagne | 11                                                         |                        |                                                     | 27                                                                                              | 4                                                                                               |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [10]      | W                                                                                          | 3                          | P                                                  | Espagne   | X                                                          |                        |                                                     |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [11]      | R                                                                                          | 20                         | P                                                  | Finlande  | 11                                                         |                        |                                                     |                                                                                                 | 6                                                                                               | 2                                                                 |                                                                                                                         |                         |                                                             | 1                           |                                                    | 1                         |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [12]      | W                                                                                          | 2                          | P                                                  | Espagne   | 29                                                         |                        |                                                     |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                | 6                                                           |                                                                                                         |
| [13]      | W, R                                                                                       | 10                         | P                                                  | Italie    | X                                                          |                        | x                                                   |                                                                                                 | x                                                                                               |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             | x                           |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |
| [14]      | S                                                                                          | 2                          | P                                                  | Soudan    | <sup>d</sup>                                               |                        |                                                     | x                                                                                               |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                         |                                                             |                             |                                                    |                           |                                                                                |                                                             |                                                                                                         |

(suite)

Tableau 5.1

| Référence | Blé (W), seigle (R), sorgo (S), orge (B), maïs (M), épeautre (Sp), sarrasin (Bw), teff (T) | Nombre de levains analysés | Identification phénotypique (P) ou moléculaire (M) | Pays     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>syn. <i>S. fructuum</i> | <i>Candida humilis</i><br><i>Candida milleri</i><br>syn. of <i>C. humilis</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i><br>syn. <i>Issatchenkia orientalis</i><br>Anamorphe <i>C. krusei</i> | <i>Kazachstania exigua</i><br>syn. <i>S. exiguus</i><br>Anamorphe <i>C. (Torulopsis) holmii</i> | <i>Torulaspora delbrueckii</i><br>Anamorphe <i>C. colliculosa</i> | <i>Wickerhamomyces anomalus</i><br>syn. <i>P. anomala</i> , <i>Hansenula anomala</i><br>Anamorphe <i>C. pelliculosa</i> | <i>Candida glabrata</i><br><i>Pichia membranifaciens</i><br>Anamorphe <i>C. valida</i> | <i>Candida parapsilosis</i><br><i>Candida stellata</i><br>syn. <i>T. stellata</i> | <i>Candida tropicalis</i><br><i>Kazachstania unispora</i><br>syn. <i>S. unisporus</i> , <i>T. unisporus</i><br><i>Kluyveromyces marxianus</i><br>Anamorphe <i>C. kefyi</i><br><i>Meyerozyma guilliermondii</i><br>syn. <i>P. guilliermondii</i><br>Anamorphe <i>C. guilliermondii</i><br><i>Saccharomyces pastorianus</i> |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| [42]      | W                                                                                          | 4                          | P, M                                               | Thailand | 4 <sup>d</sup>                                             |                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                                        |                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| [43]      | W                                                                                          | 9                          | P, M                                               | e Italie | 33                                                         | 3                                                                             | 1                                                                                               |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         | 1                                                                                      |                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| [44]      | W                                                                                          | 15                         | P                                                  | Pakistan | x                                                          |                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                                        |                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| [45]      | W                                                                                          | 10                         | P, M                                               | Grèce    | 4 <sup>d</sup>                                             |                                                                               |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                                        |                                                                                   | 163                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| [46]      | W                                                                                          | 20                         | P, M                                               | Italie   | 49 <sup>d</sup>                                            | 10                                                                            | 1                                                                                               | 2                                                                                               | 5                                                                 |                                                                                                                         |                                                                                        |                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

Levain de panification : biologie et technologie / sous la direction de Marco Gobbetti & Michael Gänzle

|          |       |   |   |         |                |    |    |    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------|-------|---|---|---------|----------------|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| [47]     | Bw, T | 2 | M | Irlande | x <sup>d</sup> |    |    |    |   |   | x |   |   |   |   |   |   |   |
| [48]     | W     | 7 | M | Chine   | 43             | 22 | 2  | 2  | 6 | 3 |   | 2 |   |   |   |   | 1 |   |
| Occurren |       |   |   |         | 38             | 19 | 14 | 12 | 8 | 7 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |

<sup>a</sup> Désignée à l’origine comme *S. exiguus*, mais des souches représentatives déposées dans des collections de culture ont été réassignées à *C. humilis*. L’une d’entre elles a servi de souche type pour la description de la population qui n’est pas assignée actuellement à *C. milleri* (NRRL Y-7244, NRRL Y-7245, NRRL Y-7246, NRRL Y-7248 ; [49]). Les isolats de *C. humilis* et *C. milleri* sont listés ici dans des colonnes partiellement séparées car certaines études les distinguent malgré leur synonymie taxonomique.

<sup>b</sup> Désignée comme *C. milleri* par les auteurs, la séquence ITS d’une souche déposée comme CBS 7541 présente un degré de similitude intermédiaire à *C. humilis* et *C. milleri*, tandis que son type ITS RFLP HaeIII est similaire à *C. humilis*.

<sup>c</sup> Identification rétrospective basée sur la présence de souches types et de référence [22].

<sup>d</sup> Sans levure de boulangerie ajoutée, d’après la mention explicite des auteurs.

n.s. : non spécifié par les auteurs.

**Tableau 5.2** Espèces de levure isolées de levains et mentionnées dans différentes références. Aucun de ces références ne présente ces espèces comme les levures uniques ou dominantes des levains. Les espèces considérées comme contaminants rares (par ex. *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula glutinis*, *R. mucilaginosa*, *Endomycopsis fibulinger*) ou non identifiées ne sont pas incluses.

| Espèce                                 | Synonymes <sup>a</sup>                                        | Référence |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>Candida boidinii</i>                |                                                               | [12]      |
| <i>Candida parapsilosis</i>            |                                                               | [42]      |
| <i>Hanseniaspora uvarum</i>            |                                                               | [38]      |
| <i>Kodamaea ohmeri</i>                 | <i>Pichia ohmeri</i>                                          | [23]      |
| <i>Lachancea kluyveri</i>              | <i>Saccharomyces kluyveri</i>                                 | [20]      |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i>       | <i>P. guilliermondii</i> , anamorphe <i>C. guilliermondii</i> | [12]      |
| <i>Ogataea polymorpha</i>              | <i>P. polymorpha</i>                                          | [10]      |
| <i>Pichia fermentans</i>               | Anamorphe <i>C. lambica</i>                                   | [31]      |
| <i>Pichia occidentalis</i>             | <i>Issatchenkia occidentalis</i>                              | [20]      |
| <i>Saccharomyces bayanus</i>           | <i>Saccharomyces inusitatus</i>                               | [7]       |
| <i>Saturnispora saitoi</i>             | <i>P saitoi</i>                                               | [9]       |
| <i>Scheffersomyces stipitis</i>        | <i>P. stipitis</i>                                            | [42]      |
| <i>Wickerhamomyces subpelliculosus</i> | <i>P. subpelliculosa</i> , <i>Hansenula subpelliculosa</i>    | [10]      |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>             |                                                               | [24]      |

<sup>a</sup> Les synonymes ou formes asporogènes (anamorphes) ne sont indiqués que s'ils sont utilisés dans les références citées ou s'ils résultent de changements récents de taxonomie.

Les 2 espèces *C. humilis*/*C. milleri* fréquemment détectées dans le levain mérite une explication détaillée. En termes de classification, il a été assigné au genre artificiel *Candida*, car aucune reproduction sexuée n'a pu être observée. Sur le plan phylogénétique, *C. humilis*/*C. milleri* appartient au même groupe que le genre *Kazachstania* [3]. Toutefois, sur le plan taxonomique, il n'a pas été placé dans ce genre car la reclassification phylogénétique donne priorité aux taxons qui ont une reproduction sexuée. L'espèce *C. humilis* a été décrite à partir d'une souche de levure associée à la bière bantoue d'Afrique du Sud, fabriquée à partir de kaffir (*Sorghum caffrorum*) ou d'éleusine (*Eleusine coracana*) [53]. L'espèce *C. milleri*, censée héberger des souches de levure isolées de fermentations au levain de San Francisco, a été initialement assignée à *S. exiguus* [7, 49]. Ce changement était justifié par les taux bien plus élevés de guanine-cytosine dans les souches sélectionnées de levain de San Francisco que dans les souches types et d'autres souches de référence de *S. exiguus* et la stimulation de croissance de *C. milleri* par le pantothénate de calcium. *C. humilis* et *C. milleri* ont été présentées comme appartenant à la même espèce en raison de l'identité de séquences des régions D1/D2 de la sous-unité (LSU) de l'ADN ribosomique (ADNr), locus qui, dans de rares cas, peut ne pas suffire à distinguer des espèces étroitement apparentées [54, 55]. La réassociation ADN-ADN d'au moins 90 % entre la souche type CBS 6897 de *C. milleri* et la souche CBS 2664, souche type de *T. holmii* var. *acidilactici*, synonyme de *C. milleri*, est intéressante dans ce cas et confirme l'appartenance à la même espèce de ces souches [54, 56]. La souche CBS 2664 présente dix substitutions dans les régions ITS (Espace intercalaire Transcrit) de l'ADNr, comparée à la souche type de *C. milleri*, ce qui indique le degré de divergence des ITS au sein de cette espèce.

Dans le contexte du levain, *C. humilis* est souvent distinguée de son synonyme *C. milleri* à l'aide de la région ITS d'ADNr [27]. Cette distinction est établie par les polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP) de l'ITS générés par l'enzyme de restriction *HaeIII* qui reconnaît et coupe la séquence nucléotidique GGCC. Ce site est rendu non identifiable par le changement d'un seul nucléotide, C devenant T (soit GGCT) dans une population représentée par la souche type *C. milleri*. Suite à cette substitution d'un seul nucléotide, l'analyse RFLP présente deux fragments, contre trois fragments présentés par les souches dont le site de reconnaissance est intact. Une comparaison des séquences ITS pertinentes publiées (CBS 5658 : AY046174, CBS 6897 : AY188851, SY13 : DQ104399 ; CBS 2664 et CBS 7541 : base de données des levures sur [www.cbs.knaw.nl/](http://www.cbs.knaw.nl/)) met en évidence la position transitoire de certaines souches entre les séquences de souche type de *C. humilis* et *C. milleri*, en particulier CBS 7541, signe d'un continuum des variantes de séquence ITS entre les deux souches types. Il est donc peut-être plus approprié de considérer ces deux taxons comme des populations d'une seule et même espèce. Une éventuelle hétérogénéité de l'espèce *C. humilis*, présentant un intérêt pour des applications, devrait être documentée et accompagnée du dépôt des isolats dans des collections de culture publiques afin d'être étudiée plus en détail.

### 5.1.2 Taxonomie des bactéries lactiques du levain

Les bactéries lactiques comprennent un groupe hétérogène de bactéries à Gram positif, non sporulantes, strictement fermentaires et produisant de l'acide lactique qui jouent un rôle important dans les aspects organoleptiques, technologiques, liés à la santé et à la sécurité de différents produits alimentaires fermentés. Suite à une contamination naturelle par la farine ou l'environnement ou par leur introduction délibérée par le biais d'ingrédients de la pâte, une grande variété taxonomique de bactéries lactiques a également été observée dans les levains. Dans l'écosystème levain, les bactéries lactiques vivent en association avec les levures et on considère généralement qu'elles contribuent à la majeure partie du processus d'acidification de la pâte, tandis que les levures sont principalement responsables de la pousse. Bien que des bactéries lactiques homofermentaires obligatoires aient aussi été isolées de levains, les bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires ou facultatives sont les plus aptes et compétitives pour survivre et proliférer dans cet environnement alimentaire particulier [57, 58].

Initialement, la classification des bactéries lactiques reposait sur des caractéristiques morphologiques, écologiques et physiologiques [59]. Plus tard, elle a aussi intégré des propriétés chimiotaxonomiques, comme la nature des acides gras constituant la cellule et la composition de la paroi cellulaire. Dans les bactéries lactiques, tout comme dans de nombreux autres groupes bactériens, l'utilité taxonomique des caractères phénotypiques est souvent limitée quand il s'agit de distinguer des espèces étroitement apparentées ; ils présentent par ailleurs une faible reproductibilité interlaboratoire. La différenciation des bactéries lactiques basée uniquement sur des traits phénotypiques est donc généralement considérée comme fiable uniquement au niveau du genre. L'introduction de techniques basées sur l'ADN, comme le taux de GC, l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de

gènes codant pour l'ARN ribosomique (ARNr), a sensiblement modifié la taxonomie des bactéries lactiques [60-62]. Le recours aux séquences de gènes codant pour l'ARNr, en particulier, comme méthode d'étude d'évolution des espèces, a permis d'élucider les liens phylogénétiques entre les espèces de bactéries lactiques. Ainsi, la comparaison des séquences codant pour l'ARNr 16S avec des séquences accessibles sur des bases de données publiques en ligne est devenue une approche standard pour identifier les isolats inconnus de bactéries lactiques. Toutefois, la faible vitesse d'évolution des gènes ribosomiques peut compromettre la différenciation entre des espèces de bactéries lactiques qui présentent des séquences codant pour l'ARNr 16S identiques ou presque [63-66]. Pour y remédier, l'utilisation de séquences de gènes de ménage multiples codant pour des fonctions cellulaires essentielles a été proposée pour l'identification des bactéries lactiques. Par exemple, la classification des espèces du genre *Lactobacillus* basée sur l'analyse des séquences des gènes de ménages *pheS* et *rpoA* s'est avérée fortement congruente avec l'approche phylogénétique basée sur le gène codant pour l'ARNr 16S [67].

La diversité des bactéries lactiques associées aux levains a été étudiée par plusieurs chercheurs au cours des dernières années [57, 58, 68-70]. À partir de ces études, un aperçu actualisé des bactéries lactiques les plus fréquentes dans le levain est présenté dans le Tableau 5.3. Comme c'est le cas pour de nombreux écosystèmes alimentaires, cet aperçu montre que, ici également, les lactobacilles sont de loin les bactéries lactiques les plus fréquentes dans l'écosystème levain. La taxonomie du genre *Lactobacillus* est extrêmement complexe : d'après l'actualisation réalisée en avril 2011, au moins 171 noms d'espèces ont été proposés à ce jour pour ce genre ([www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html](http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html)). Toutefois, étant donné que certains noms des espèces proposées ont été entre-temps synonymisés, le nombre réel d'espèces uniques sur le plan phylogénétique est inférieur. Dans les levains, plus de 55 espèces de *Lactobacillus* ont été identifiées et principalement des hétérofermentaires obligatoires (Tableau 5.3). Étant donné la complexité taxonomique de ce genre, l'identification précise d'isolats non identifiés de *Lactobacillus* nécessite une expertise spécifique, avec par exemple l'utilisation de méthodes qui permettent une résolution taxonomique suffisante et l'interprétation correcte des résultats de l'identification par comparaison avec des bases de données complètes et mises à jour. Dans la plupart des études passées, en revanche, l'identification des lactobacilles reposait principalement, voire exclusivement, sur une approche phénotypique et la résolution taxonomique au niveau des espèces était limitée. On peut donc supposer que certaines espèces *Lactobacillus* précédemment isolées à partir de levains ont peut-être été identifiées à tort au niveau de l'espèce, voire du genre. La situation taxonomique du groupe *Lactobacillus plantarum* en est un exemple typique : la discrimination entre la bactérie ubiquitaire du levain *Lb. plantarum* et les bactéries *Lactobacillus paraplantarum* et *Lactobacillus pentosus*, très proches sur le plan phylogénétique, peut être problématique quand les méthodes d'identification utilisées ne permettent pas une résolution taxonomique suffisante. À cet égard, Torriani et ses collègues [71] ont été les premiers à suggérer l'utilisation de séquences de gènes de ménage comme *recA* au lieu de séquences codant pour l'ARNr 16S pour distinguer les membres d'un groupe d'espèces très proches sur le plan phylogénétique.

De même, plusieurs isolats du levain initialement assignés à *Lactobacillus alimentarius* pourraient en fait appartenir au groupe *Lactobacillus paralimentarius*, décrit plus tard et apparenté, en raison d'une erreur d'identification phénotypique [72]. Dans ce même cas, il a été prouvé que des méthodes basées sur les profils moléculaires ou le séquençage sont nécessaires pour distinguer les deux espèces [67, 73]. Pour *Lactobacillus rossiae*, on peut remarquer une hétérogénéité intra-spécifique menant à l'identification de plusieurs groupes au sein de l'espèce si l'on se base sur le séquençage du gène *pheS*, ce qui pourrait rendre incertain l'identification de souches de *Lb. rossiae* [77]. Enfin, des problèmes de nomenclature peuvent aussi contribuer à la confusion taxonomique. La correction d'épithètes mal orthographiées à l'origine, comme « *Lactobacillus sanfrancisco* » [75] (désormais *Lactobacillus sanfranciscensis*) et « *Lactobacillus rossii* » [76] (désormais *Lb. rossiae*), et la synonymisation des espèces (par ex. *Lactobacillus suntoryeus* établi comme synonyme de *Lactobacillus helveticus* [77]), peuvent prendre du temps d'avant d'être intégrées aux nouvelles publications taxonomiques.

**Tableau 5.3** Espèces de bactéries lactiques généralement associées à la fermentation du levain ou observées dans les levains fermentés<sup>a</sup>

| Hétérofermentaires obligatoires <sup>b</sup>         | Hétérofermentaires facultatives | Homofermentaires obligatoires                    |
|------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Lb. acidifarinae</i>                              | <i>Lb. alimentarius</i>         | <i>E. casseliflavus</i>                          |
| <i>Lb. brevis</i>                                    | <i>Lb. casei/paracasei</i>      | <i>E. durans</i>                                 |
| <i>Lb. buchneri</i>                                  | <i>Lb. coleohominis</i>         | <i>E. faecalis</i>                               |
| <i>Lb. cellobiosus</i>                               | <i>Lb. kimchi</i>               | <i>E. faecium</i>                                |
| <i>Lb. collinoides</i>                               | <i>Lb. paralimentarius</i>      | <i>Lb. acidophilus</i>                           |
| <i>Lb. crustorum</i>                                 | <i>Lb. pentosus</i>             | <i>Lb. amylolyticus</i>                          |
| <i>Lb. curvatus</i>                                  | <i>Lb. perolens</i>             | <i>Lb. amylovorus</i>                            |
| <i>Lb. fermentum</i>                                 | <i>Lb. plantarum</i>            | <i>Lb. crispatus</i>                             |
| <i>Lb. fructivorans</i>                              | <i>Lb. sakei</i>                | <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> |
| <i>Lb. frumenti</i>                                  | <i>P. acidilactici</i>          | <i>Lb.farciminis</i>                             |
| <i>Lb.hammesii</i>                                   | <i>P. dextrinicus</i>           | <i>Lb. gallinarum</i>                            |
| <i>Lb. hilgardii</i>                                 | <i>P. pentosaceus</i>           | <i>Lb. gasseri</i>                               |
| <i>Lb. homohiocii</i>                                |                                 | <i>Lb. helveticus</i>                            |
| <i>Lb. kefir</i>                                     |                                 | <i>Lb. johnsonii</i>                             |
| <i>Lb. kunkei</i>                                    |                                 | <i>Lb. mindensis</i>                             |
| <i>Lb. lindneri</i>                                  |                                 | <i>Lb. nagelii</i>                               |
| <i>Lb. mucosae</i>                                   |                                 | <i>Lb. salivarius</i>                            |
| <i>Lb. namurensis</i>                                |                                 | <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>           |
| <i>Lb. nantensis</i>                                 |                                 | <i>S. constellatus</i>                           |
| <i>Lb. nodensis</i>                                  |                                 | <i>S. equinus</i>                                |
| <i>Lb. oris</i>                                      |                                 | <i>S. suis</i>                                   |
| <i>Lb. panis</i>                                     |                                 |                                                  |
| <i>Lb. parabuchneri</i>                              |                                 |                                                  |
| <i>Lb. pontis</i>                                    |                                 |                                                  |
| <i>Lb. reuteri</i>                                   |                                 |                                                  |
| <i>Lb. rossiae</i>                                   |                                 |                                                  |
| <i>Lb. sanfranciscensis</i>                          |                                 |                                                  |
| <i>Lb. secaliphilus</i>                              |                                 |                                                  |
| <i>Lb. siliginis</i>                                 |                                 |                                                  |
| <i>Lb. spicheri</i>                                  |                                 |                                                  |
| <i>Lb. vaginalis</i>                                 |                                 |                                                  |
| <i>Lb. zymae</i>                                     |                                 |                                                  |
| <i>Le. citreum</i>                                   |                                 |                                                  |
| <i>Le. gelidum</i>                                   |                                 |                                                  |
| <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>      |                                 |                                                  |
| <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>   |                                 |                                                  |
| <i>Le. mesenteroides</i> subsp. <i>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>                                |                                 |                                                  |

*E. Enterococcus, Lb. Lactobacillus, Lc. Lactococcus, Le. Leuconostoc, P. Pediococcus, S. Streptococcus, W. Weissella.*

<sup>a</sup> Données compilées à partir de [57, 58, 68, 70].

<sup>b</sup> Classification en types de fermentation du glucose d’après Felis et Dellaglio [59].

Ces dernières années, suite à l'introduction de méthodes taxonomiques basées sur l'ADN moléculaire dans les études portant sur la microbiologie du levain et à l'introduction d'un nombre croissant de séquences codant pour l'ARNr 16S dans les bases de données publiques, de nombreuses nouvelles espèces *Lactobacillus* ont été décrites, isolées pour la première fois d'un environnement de levain. Depuis l'an 2000, 13 nouvelles espèces *Lactobacillus*, isolées de levains à l'origine, ont été proposées : *Lactobacillus frumenti* [78], *Lactobacillus mindensis* [79], *Lactobacillus spicheri* [80], *Lactobacillus acidifarinae* [81], *Lactobacillus zymae* [81], *Lactobacillus hammesii* [82], *Lb. rossiae* [76], *Lactobacillus siliginis* [83], *Lactobacillus nantensis* [84], *Lactobacillus secaliphilus* [85], *Lactobacillus crustorum* [86], *Lactobacillus namurensis* [87] et *Lactobacillus nodensis* [88] (Tableau 5.3). Toutefois, nombre de ces espèces n'ont été observées qu'une fois ou sont rarement isolées de ce type d'aliment fermenté et ne sont représentées que par quelques souches. On ne peut donc pas établir clairement la typicité des espèces des environnements du levain et leur répartition géographique. En réalité, seules quelques espèces de *Lactobacillus* comme *Lb. sanfranciscensis*, hétérofermentaire obligatoire, et *Lb. paralimentarius*, hétérofermentaire facultative, semblent être adaptées de façon optimale à cet environnement spécifique et sont rarement isolées d'autres sources. D'autres espèces hétérofermentaires comme *Lactobacillus brevis* et *Lb. plantarum*, hétérofermentaire facultative, sont aussi fréquemment isolées de levains fermentés, mais ont également été observées dans de nombreux autres environnements, alimentaires ou non [69].

Bien que le microbiote des bactéries lactiques des levains soit clairement dominé par les lactobacilles, d'autres bactéries lactiques moins dominantes ou sous-dominantes peuvent aussi être observées, par exemple des genres *Weissella*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* (Tableau 5.3). Parmi ces dernières, des espèces spécifiques de *Weissella*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont particulièrement bien adaptées à la survie et la croissance dans des matières d'origine végétale [57, 89]. La taxonomie de ces trois derniers genres est bien moins complexe que celle de *Lactobacillus* et leur présence dans les levains est limitée à quelques espèces seulement. Les bactéries du genre *Weissella* sont des hétérofermentaires obligatoires, dont un certain nombre d'espèces produit du dextrane, l'exopolysaccharide le mieux connu, formé par des bactéries lactiques hétérofermentaires. Dans les levains, les espèces *Weissella cibaria* et *Weissella confusa*, qui produisent du dextrane, sont les plus fréquentes. Ces deux taxons partagent l'un des quatre embranchements phylogénétiques de ce genre d'après des analyses du gène de l'ARNr 16S [90], mais peuvent être différenciés par analyse de restriction du gène amplifié ADNr 16S [91] par RAPD-PCR [92] et PCR ciblant l'ITS ribosomique [26]. Au sein des pédiocoques hétérofermentaires facultatives, les espèces *Pediococcus acidilactici* et *Pediococcus pentosaceus* sont les plus communes dans les levains. La différenciation entre ces deux espèces apparentées sur le plan biochimique et phylogénétique est possible grâce à des systèmes d'empreintes comme le ribotypage [93, 94], l'analyse de restriction d'ADNr 16S (16S-ARDRA) [95], la RAPD-PCR [96, 97] et des analyses de séquence du gène ARNr 16S, des régions ribosomiques ITS et du gène 60 de la protéine de choc thermique [98].

Dans le genre hétérofermentaire obligatoire *Leuconostoc*, la majorité des isolats de levain identifiés jusqu'à présent appartient à *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc citreum*. Pour la première, une autre distinction taxonomique est faite au niveau des sous-espèces entre *Le. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Le. mesenteroides* subsp. *dextranicum* et *Le. mesenteroides* subsp. *cremoris* ([www.bacterio.cict.fr/l/leuconostoc.html](http://www.bacterio.cict.fr/l/leuconostoc.html)). Ces trois sous-espèces peuvent être distinguées selon leur profil RAPD-PCR [99].

## 5.2 Diversité des espèces microbiennes dans les levains

### 5.2.1 Influence de la géographie

#### 5.2.1.1 Origine du levain

Historiquement, la production de levain était une condition *sine qua non* à la transformation des céréales pour la fabrication de produits de boulangerie [100]. Les premiers pains produits il y a des milliers d'années étaient probablement basés sur une fermentation lactique spontanée naturelle, associé ou non à des levures et avec peu ou pas de pousse. La pousse ne pouvait être prononcée à l'époque en raison des céréales utilisées, à savoir l'orge (*Hordeum vulgare*) et des variétés anciennes, comme l'épeautre (*Triticum aestivum* subsp. *spelta*), l'amidonnier (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccum*) et le kamut (*T. turgidum* subsp. *turanicum*), et de l'absence de levure. Cette forme de pain plat (acide) est toujours courante dans de nombreux pays du monde, notamment en Afrique et au Moyen-Orient. La fermentation a dû être une découverte fortuite résultant du développement de la microflore présente dans l'air ou la farine. Mais ce n'est qu'à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle que de la levure exogène a été introduite pour la fabrication de pain à base de farine de blé (*T. aestivum* et *Triticum durum*), d'abord sous forme de levure de bière co-produit de la production brassicole, puis sous forme de levure de boulangerie commerciale produite spécialement, *S. cerevisiae*. La consommation de pain au levain doit donc être très ancienne. Plus tard, la fabrication de pain dans les pays produisant des céréales autres que le blé, comme le seigle (*Secale cereale*), a dû aussi reposer sur la fermentation lactique. La fabrication de pain au seigle nécessite l'acidification de la pâte pour inhiber l' $\alpha$ -amylase présente en quantité abondante dans la farine de seigle. Cela permet à l'amidon de seigle et aux pentosanes d'absorber davantage l'eau pour que la pâte ait une bonne consistance et compenser la faible teneur en gluten du seigle. Différents pains (de seigle) d'Allemagne, de pays d'Europe centrale et de Scandinavie sont produits à base de levain. Aux États-Unis, le pain était principalement à base de levain en Californie du Nord durant la ruée vers l'or, car il était facile à stocker et à réactiver pour la production quotidienne de pain. Aujourd'hui, le pain au levain de San Francisco est produit au niveau commercial dans la région de San Francisco et fait partie de l'identité culturelle de la baie. Au début des années 1970, *Lb. sanfrancisco*, désormais *Lb. sanfranciscensis*, ainsi nommée en raison de la région où elle fut découverte, a été désignée comme la bactérie à l'origine de ce levain [75].

Il est à noter que cette bactérie lactique est en fait identique à *Lb. brevis* var. *lindneri* (désormais *Lb. sanfranciscensis*), à laquelle on attribue différents pains au levain produits en Europe [17].

Il a également été démontré que cette bactérie lactique du levain apparaît en association stable avec, respectivement, les levures *C. humilis* (syn. *C. milleri*) et *K. exigua* (syn. *S. exiguus*) [7, 101]. De nos jours, le levain est utilisé pour ses avantages technologiques (transformation de la pâte, texture, goût et conservation du pain) et nutritionnels [57, 58, 69, 102, 103]. En outre, les produits au levain sont appréciés pour leur valeur traditionnelle, leur qualité gastronomique et leurs effets bénéfiques et naturels sur la santé [104].

### 5.2.1.2 Origine de la variété des levains

La boulangerie étant depuis longtemps un artisanat, il existe une grande diversité de produits de boulangerie, notamment à base de levain, qui peuvent varier fortement d'une région à une autre. La plupart de ces produits, dont le pain, les gâteaux, les en-cas (snacks) et les pizzas, ont une très longue tradition. Par exemple, en Italie, il existe de nombreux types de pains au levain, souvent appelés par le nom de leur région d'origine, comme le pain d'Altamura et le pain des Pouilles [101]. Il y a également des produits saisonniers, traditionnellement fabriqués à l'occasion de fêtes religieuses – le *panettone* de Milan et le *pandoro* de Vérone sont produits à Noël, tandis que la *colomba* est un gâteau milanais produit à Pâques. Des produits à base de levain comme les crackers, les baguettes françaises et les ciabattas italiennes sont bien plus communs, même si la recette originale a été remplacée par une recette à base de levure de boulanger, dont la croissance est plus rapide et dont la fermentation est prolongée, dans de rares cas, pour permettre le développement des bactéries lactiques et, ainsi, la formation d'arômes (pâtes préfermentées ou levains de levures). Heureusement, de nombreux levains de panification subsistent depuis des décennies grâce aux procédures de rafraîchis, c'est-à-dire l'addition par le boulanger d'un mélange de farine et d'eau à une part du levain, ce qui garantit la qualité des produits. Il s'est avéré que ces levains traditionnels hébergent un mélange de souches distinctes de levures et de bactéries lactiques, ce qui explique peut-être la typicité et la qualité organoleptique des pains ainsi produits, dans la mesure où le rafraîchi engendre une prévalence des souches les mieux adaptées [57, 68, 69]. Cette diversité de levains naturels explique probablement la variété des levains artisanaux produits par les boulangeries, qu'ils soient typiques ou non d'une région géographique. Des starters de levain, composés d'une ou de plusieurs souches définies, sont désormais disponibles dans le commerce. Outre les souches *Lb. sanfranciscensis*, les souches des espèces de bactéries lactiques *Lb. brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum* et *Lb. plantarum* sont aussi commercialisées, même si les souches utilisées ne sont pas toutes suffisamment compétitives pour dominer les processus de fermentation au levain qui doivent être amorcées [69]. Ces starters permettent l'acidification rapide des matières premières et la formation des arômes par fermentation. Des industriels produisent également du levain déshydraté en poudre sans activité fermentaire utilisé comme ingrédient aromatique pour la production de pain.

### 5.2.1.3 Levains régionaux et microbiote associé

On pensait à l'origine qu'un lien pouvait être établi entre la présence de certaines espèces de bactéries lactiques et l'origine géographique des levains. Or, des recherches taxonomiques systématiques et approfondies ont montré que la diversité des bactéries lactiques et des levures dans les levains n'a rien à voir avec la localisation du processus de production du levain (Tableaux 5.1 et 5.4 ; 57, 68, 69). Par exemple, la bactérie typique du pain au levain de San Francisco de la baie du même nom, *Lb. sanfranciscensis*, a été observée dans divers levains au blé en Europe - sa présence (unique) est donc imputable à d'autres facteurs, principalement basés sur la technique de fermentation et les conditions pratiques [121, 152-154]. Dans différents pays, comme en Italie, plusieurs études ont été consacrées aux levains régionaux (Tableau 5.4). Toutefois, aucun lien clair n'a pu être établi entre les levains régionaux et leur microbiote associé. Au contraire, les levains italiens hébergent des communautés de bactéries lactiques simples ou très complexes en fonction des produits finis, comme par exemple *Lb. brevis*, *Lb. (par)alimentarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. fermentum*, *P. pentosaceus* et *W. confusa*. De même, les levains panaires belges ont fait l'objet de nombreuses études et se caractérisent par des groupements de bactéries lactiques de *Lb. brevis*, *Lb. hammesii*, *Lb. nantensis*, *Lb. paralimentarius*, *Lb. plantarum*, *Lb. pontis*, *Lb. sanfranciscensis* et/ou *P. pentosaceus* [105, 106, 155]. Certains levains peuvent aussi présenter une diversité d'espèces à la fois stable et limitée ou bien stable et élargie [106]. D'autre part, *Lb. rossiae* semble répandue dans les levains, comme l'a montré son isolement de levains en Italie centrale et du Sud, en Belgique et ailleurs [74, 105, 106, 156-158]. Les espèces de bactéries lactiques sont responsables de l'acidification de la pâte et contribuent à la formation des arômes. Outre les espèces de bactéries lactiques, une grande variété de levures est présente dans les écosystèmes du levain (Tableaux 5.1 et 5.2). *S. cerevisiae* a été observée dans presque toutes les études sur le levain (38 sur 42 examinées), qu'il y ait ou non ajout de levure de boulangerie (14 études mentionnent *S. cerevisiae*, bien qu'elles précisent l'absence de levure de boulangerie). Un levain héberge généralement une ou deux espèces de levure à un moment donné, parmi lesquelles *C. humilis* (et *K. exigua*) et *P. kudriavzevii* sont les plus fréquentes [40]. Les levures sont responsables de la pousse de la pâte et contribuent également à la formation des arômes.

**Tableau 5.4** Présentation non exhaustive des espèces de bactéries lactiques dans les levains fabriqués à partir de différentes farines et de différentes origines géographiques. La méthode d'identification des espèces de bactéries lactiques est précisée.

| Pays     | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification          | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Référence(s)       |
|----------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Belgique | Blé<br>Moléculaire                                     | <i>Lb. acidifarinae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. crustorum</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. namurensis</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. spicheri</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> | [86, 87, 105, 106] |
|          | Seigle<br>Moléculaire                                  | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | [105, 106]         |
|          | Blé-seigle<br>Moléculaire                              | <i>E. mundtii</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                                                                               | [105, 106]         |
|          | Épeautre<br>Moléculaire                                | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i>                                                                                                                                                                                                                          | [105, 106]         |
|          | Blé (laboratoire)<br>Moléculaire                       | <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | [107]              |
|          | Épeautre<br>(laboratoire)<br>Moléculaire               | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | [107]              |
|          | Blé (laboratoire)<br>Moléculaire +<br>biopuces         | <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [108]              |
|          | Épeautre<br>(laboratoire)<br>Moléculaire +<br>biopuces | <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [108]              |
|          | Seigle (laboratoire)<br>Moléculaire                    | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | [109]              |
|          | Blé<br>Moléculaire                                     | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. crustorum</i> , <i>curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. guizhouensis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. mindensis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. zeae</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                  | [48]               |

| Pays      | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification        | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Référence(s) |
|-----------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Danemark  | Seigle<br>Phénotypique                               | <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. reuteri</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                     | [25]         |
| Ethiopie  | Teff (injera)<br>Phénotypique                        | <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                          | [110]        |
| Finlande  | Seigle<br>Phénotypique                               | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                  | [11]         |
| France    | Blé<br>Phénotypique                                  | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                             | [111]        |
|           | Blé<br>Phénotypique                                  | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                        | [112]        |
|           | Blé<br>Moléculaire                                   | <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. spicheri</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>                                                                                                 | [113]        |
|           | Blé<br>Moléculaire                                   | <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. spicheri</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>                                                                                                                     | [114]        |
|           | Blé<br>Moléculaire                                   | <i>E. hirae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> | [115]        |
|           | Blé<br>Phénotypique                                  | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                 | [116]        |
|           | Seigle<br>Phénotypique                               | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                       | [9, 117]     |
| Allemagne | Seigle - utilisation<br>d'un starter<br>Phénotypique | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Pediococcus</i> spp.                                                                             | [118]        |

| Pays  | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification                                              | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                                                | Référence(s) |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|       | Blé ( <i>panettone</i> , pain de blé d'Allemagne, Italie, Suède et Suisse)<br>Phénotypique | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. homohiochii</i> , <i>Lb. plantarum</i> (spontanée)                                                                                                                         | [119]        |
|       | Seigle<br>Moléculaire                                                                      | <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. pontis/panis</i> , <i>Lb. reuteri</i> (type II)                                                                                                                                                                    | [120]        |
|       | Seigle (son) – utilisation d'un starter<br>Moléculaire                                     | <i>Lb. mindensis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> (seigle, type I)<br><i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. pontis</i> (seigle, type II)<br><i>Lb. Johnsonii</i> , <i>Lb. Reuteri</i> (son de seigle, type II) | [29]         |
|       | Riz<br>Phénotypique + moléculaire                                                          | <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. spicheri</i>                                                                                                                                                                                                 | [80]         |
|       | Blé<br>moléculaire                                                                         | <i>E. faecium</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                            | [121]        |
|       | Seigle<br>Moléculaire                                                                      | <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                                                         | [121]        |
|       | Amarante (d'Inde, Pérou, Mexique, Allemagne)<br>Moléculaire                                | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                         | [122]        |
|       | Céréales et pseudocéréales<br>Moléculaire                                                  | <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. spicheri</i>                                                                                                                              | [123]        |
| Grèce | Blé<br>Phénotypique + moléculaire                                                          | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lb. zymae</i> , <i>W. cibaria</i>                                                                                                                                                     | [72]         |

| Pays   | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification              | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                                                                   | Référence(s) |
|--------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Italie | Blé ( <i>panettone</i> )<br>Phénotypique                   | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                                                                   | [8]          |
|        | Blé ( <i>panettone</i> ,<br>brioche)<br>Phénotypique       | <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.                                                                                                                                                           | [13]         |
|        | Blé (Ombrie)<br>Phénotypique                               | <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                                                 | [17]         |
|        | Pizza de Naples<br>Phénotypique                            | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leuc. gelidum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>                                                                                                                                                                                                | [124]        |
|        | Blé (Molise,<br>Ombrie, Venise)<br>Moléculaire             | <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                | [125, 126]   |
|        | Levains-chefs<br>(Lombardie)<br>Moléculaire                | <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                | [21]         |
|        | Blé (Apulie)<br>Moléculaire                                | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. fermentum</i> ,<br><i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>W. confusa</i> | [26]         |
|        | Blé (Italie du Sud)<br>Moléculaire                         | <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. plantarum</i> ,<br><i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                           | [127]        |
|        | Blé (Molise)<br>Moléculaire                                | <i>Lb. arizonensis/plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. kimchii/paralimentarius</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                         | [33]         |
|        | Blé (Sicile)<br>Moléculaire                                | <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. kimchii/alimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                    | [128]        |
|        | Blé (Molise)<br>Moléculaire                                | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                              | [129]        |
|        | Blé (Altamura,<br>Apulie)<br>Phénotypique<br>+ moléculaire | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>                                                                                                                                                                            | [130]        |
|        | Blé (Sardaigne)<br>Moléculaire                             | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                                                           | [131]        |

| Pays | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification                    | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Référence(s) |
|------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|      | Blé (Abruzzes)<br>Physiologique +<br>moléculaire                 | <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. mindensis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> | [133]        |
|      | Blé (Abruzzes)<br>Moléculaire                                    | <i>E. faecium</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | [133]        |
|      | Blé ( <i>panettone</i><br>d'Italie centrale)<br>Moléculaire      | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>                                                                                                                                                                                                                                                             | [39]         |
|      | Blé (cornetto,<br>Basilicate)<br>Phénotypique +<br>moléculaire   | <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mensenteroides</i> ,<br><i>W. cibaria</i>                                                                                                                                                                                                                                        | [134]        |
|      | Blé –<br>utilisation<br>starter<br>Phénotypique +<br>moléculaire | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Leuc. durionis</i> ,<br><i>Leuc. fructosus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i>                                                                                                                                                                 | [41]         |
|      | Blé (Marches)<br>Phénotypique +<br>moléculaire                   | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. parali-mentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>                                                 | [43]         |

| Pays    | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification          | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                          | Référence(s) |
|---------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Iran    | Blé – utilisation d'un starter Moléculaire             | <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. cibaria/confusa</i>             | [135]        |
|         | Orge – utilisation d'un starter Moléculaire            | <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                   | [136]        |
|         | Emmer Moléculaire                                      | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                                                     | [137]        |
|         | Épeautre Moléculaire                                   | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>P. pentosaceus/ acidilactici</i> , <i>W. confusa</i>                                                                            | [137]        |
|         | Blé Moléculaire                                        | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                 | [138]        |
|         | Germe de blé Moléculaire                               | <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rossiae</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. confusa</i>                                                                                                                                             | [139]        |
|         | Sangak Phénotypique                                    | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i>                                                                                                                                      | [140]        |
|         | Avoine Moléculaire                                     | <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Leuc. argentinum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i>                                                                                                                                     | [141]        |
|         | Sarrasin Moléculaire                                   | <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Leuc. holzapfelii</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>W. cibaria</i> | [47]         |
|         | Sarrasin – utilisation d'un levain naturel Moléculaire | <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. argentinum</i> , <i>W. cibaria</i>                                          | [142]        |
| Irlande | Teff Moléculaire                                       | <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Leuc. holzapfelii</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                        | [47]         |

| Pays     | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification     | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                                                      | Référence(s) |
|----------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
|          | Teff – utilisation<br>d'un starter<br>Moléculaire | <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> ,<br><i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>P. acidilactici</i> | [142]        |
| Mexique  | Maïs (pozol)<br>Moléculaire                       | <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>S. suis</i>                                                                                                               | [143]        |
| Maroc    | Ferments de levain,<br>et Sponges<br>Phénotypique | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> spp.                                                                                                      | [16]         |
|          | Farine de froment<br>Phénotypique                 | <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                     | [144]        |
| Nigeria  | Maïs                                              | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. acidilactici</i>                                                                                                      | [145]        |
| Portugal | Maïs (broa, nord du<br>Portugal)<br>Phénotypique  | <i>E. casseiliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lc. lactis subsp. lactis</i> ,<br><i>Leuconostoc</i> spp., <i>S. constellatus</i> , <i>S. equines</i>                          | [21]         |
| Russie   | Seigle<br>Phénotypique                            | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                               | [146]        |
| Espagne  | Blé<br>Phénotypique                               | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                                                      | [10]         |
|          | Blé<br>Phénotypique                               | <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>                                                                                                                                                | [12, 147]    |
| Soudan   | Sorgo (kisra)<br>Phénotypique                     | <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. reuteri</i>                                                                                                                                                                             | [14]         |
|          | Kisra<br>Moléculaire                              | <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. vaginalis</i> , <i>Lc. lactis</i>                                                                                                             | [148]        |
| Suède    | Seigle-blé<br>Phénotypique                        | <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i> , <i>W. viridescens</i>                        | [149]        |
|          | Seigle<br>Phénotypique                            | esp. <i>Lactobacillus</i> , <i>P. pentosaceus</i>                                                                                                                                                                                             | [150]        |

| Pays       | Type de farine<br>Méthode<br>d'identification | Espèces de bactéries lactiques observées                                                                                                                                                                      | Référence(s) |
|------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Thaïlande  | Blé<br>Phénotypique +<br>moléculaire          | <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>                                                                                                                                                                       | [42]         |
| Turquie    | Blé<br>Phénotypique                           | <i>C. divergens</i> , <i>Lb. acetotolerans</i> , <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>T. halophilus</i> | [151]        |
| États-Unis | Blé<br>Phénotypique                           | <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                                                                                   | [75]         |
|            | Blé<br>Moléculaire                            | <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>                                                                                                                               | [121]        |

*C. Carnobacterium*, *E. Enterococcus*, *Lb. Lactobacillus*, *Lc. Lactococcus*, *Le. Leuconostoc*, *P. Pediococcus*, *S. Streptococcus*, *W. Weissella*

La démarche d'isolement des levures et des bactéries lactiques a fait qu'elles ont été associées à tort à certaines régions de production de levain, pas seulement à cause de l'isolement aléatoire lui-même, mais aussi à cause de l'habitat unique (levain) étudié. Ainsi, l'association, par exemple, de *Lb. spicheri* aux levains de riz allemands [80] peut être due à des découvertes accidentelles [57, 68, 69]. À l'inverse, l'utilisation spécifique de matières premières basiques ainsi que de certains procédés technologiques permet de déterminer la stabilité et la persistance des communautés de levures et de bactéries lactiques impliquées dans le processus de fermentation du levain. La présence de *Lb. sanfranciscensis* dans les levains de blé, qui a été pendant longtemps l'habitat unique de cette bactérie lactique (depuis, elle a aussi été observée dans les levains de seigle [Tableau 5.4] et dans les intestins d'insectes [159]), peut être imputée à sa sélection par le type de technique appliquée, à savoir les pratiques de rafraîchi, la température d'incubation de la pâte, le pH de la pâte et/ou les interactions microbiennes [113, 121, 135, 160, 161]. Toutefois, l'utilisation de certaines matières premières, y compris les types de céréales et d'autres ingrédients (glucides, sel, yaourt, herbes, etc.), ainsi que les pratiques, comme la quantité d'eau dans la pâte (DoughYield) et la durée des rafraîchis, peuvent être liées à des traditions locales. Elles pourraient favoriser des micro-organismes particuliers en raison de liens et interactions métaboliques et trophiques (coopération et antibiose) et ainsi associer des espèces spécifiques de bactéries lactiques et/ou de levures à certaines régions géographiques. Par exemple, l'utilisation de seigle peut favoriser *Lactobacillus amylovorus* homofermentaire amylase-positif, bien que des températures plus élevées favorisent la prédominance de lactobacilles hétérofermentaires [120, 162]. La prédominance de bactéries lactiques principalement hétérofermentaires dans les levains traditionnels est due à un métabolisme glucidique très bien adapté, à l'assimilation spécifique d'acides aminés et à des réactions au stress environnemental [57, 58, 68, 163-166]. Le maltose, en particulier, source d'énergie fermentable la plus abondante dans la pâte, est métabolisé par la voie de la maltose phosphorylase et la voie des pentoses phosphates par des bactéries lactiques strictement hétérofermentaires, comme *Lb. sanfranciscensis*, *Lactobacillus reuteri* et *Lb. fermentum*. Ce métabolisme efficace du maltose, associé à l'utilisation d'accepteurs d'électrons alternatifs externes comme le fructose, ainsi qu'à des voies spécifiques comme la voie d'arginine déiminase (ADI) et diverses réactions au stress environnemental comme la réaction à des conditions acides, augmente sa compétitivité dans l'environnement hostile du levain [167-172]. De plus, les bactéries lactiques maltose-positives comme *Lb. sanfranciscensis* forment souvent une association stable avec les levures maltose-négatives comme *C. humilis*, ce qui évite la concurrence pour les mêmes sources de glucides [58, 164, 165]. D'autre part, la production lors des rafraîchis, de composés inhibiteurs spécifiques, comme la reutéricycline antibiotique produit par *Lb. reuteri*, peut favoriser la dominance de cette bactérie lactique, comme c'est le cas dans certains levains allemands de type II [173].

## 5.2.2 Influence des céréales et des autres matières premières

Les farines de céréales ne sont pas stériles. Leur stabilité microbiologique est liée à leur faible  $a_w$ . Les levures et les bactéries lactiques se trouvant naturellement dans les matières végétales, les farines de céréales hébergent ces deux groupes de micro-organismes et le nombre des espèces compétitives de levures et de bactéries lactiques présentes, est supérieur à celui du microbiote fortuit qui résulte de la fermentation d'un mélange farine-eau [57]. Toutefois, l'hypothèse selon laquelle le type de farine joue un rôle essentiel dans la croissance des bactéries lactiques du levain reste controversée [25, 26, 47, 89, 105, 107, 121, 123, 135]. Par exemple, alors que l'on croyait que la fermentation du levain de riz favorisait *Lb. spicheri* [80], cette bactérie lactique n'est pas toujours retrouvée dans les levains de riz [123]. Cela a été imputé à la compétitivité des micro-organismes présents dans l'écosystème du levain. En effet, les interactions microbiennes entre le microbiote spontané d'un levain et un starter ajouté peuvent conduire à la dominance des espèces et/ou souches de bactéries lactiques autochtones. Entre autres mécanismes, la compétitivité pourrait expliquer la prévalence apparente d'espèces de bactéries lactiques dans certaines préparations au levain, comme l'ont montré des travaux sur *Lb. amylovorus* dans les levains de seigle [120], *Lactobacillus sakei* dans les levains d'amarante [122] et *Lb. pontis* dans les levains de teff [47]. Pourtant, avec la farine comme seul ingrédient non stérile, les fermentations au levain spontanées réalisées en laboratoire indiquent que le type et la qualité (microbiologique et nutritionnelle) de la farine de céréales utilisée est de fait une source importante de bactéries lactiques et de levures autochtones observées dans les levains mûrs [40, 107]. La farine joue donc un rôle essentiel dans l'établissement de consortiums microbiens stables en peu de temps. Dans ce contexte, des recherches ont montré que les levains de laboratoire à base de blé, de seigle ou d'épeautre, rafraîchis chaque jour pendant dix jours à 30°C, amorcés ou non avec un starter contenant *Lb. sanfranciscensis* [comme dans l'étude de Siragusa *et al.* sur les fermentations au levain de blé [135]], parviennent à un équilibre d'espèces de bactéries lactiques à la suite d'un processus de fermentation en trois étapes : (1) prévalence de bactéries lactiques atypiques du levain (par ex. *Enterococcus* spp. et *Lc. lactis* subsp. *lactis*) ; (2) prévalence de bactéries lactiques typiques du levain (par ex. espèces de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella*) ; et (3) prévalence de bactéries lactiques typiques du levain et très bien adaptées (par ex. *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum*) [107-109, 135]. Il a été prouvé que les bactéries lactiques *Lb. fermentum* (strictement hétérofermentaires) et *Lb. plantarum* (hétérofermentaires facultatives) dominent plusieurs processus de fermentation au levain, indépendamment du type de farine ou de l'ajout de ferments/ starters qui ne sont pas adaptés [47, 108, 123, 136-138, 142, 172, 174, 175]. Concernant les levures, *C. glabrata* et *W. anomalus* sont dominantes dans les fermentations au levain en laboratoire [40]. De plus, il a été démontré que l'introduction préalable de farine dans le fournil contribue à former un « microbiote domestique » qui constitue un inoculum important pour les fermentations au levain ultérieures [155]. En effet, les souches de bactéries lactiques adaptées au levain et à l'environnement boulanger (matériels, air, etc.), censées être indifférenciables sur le plan génétique, peuvent être introduites de façon répétée dans des levains consécutifs durant le rafraîchi. L'utilisation répandue de levure de boulangerie pourrait expliquer la prévalence de *S. cerevisiae* dans les levains panaires [26, 29, 31, 34-36, 39, 40].

Toutefois, certaines données moléculaires fiables mettent aussi en évidence une grande diversité de souches de *S. cerevisiae* dans certains levains, ce qui indique aussi l'origine autochtone de cette levure dans la farine de blé [27, 30, 34]. L'origine autochtone de *S. cerevisiae* semble aussi justifiée par la présence de cette espèce dans la farine de seigle [29]. Pourtant, durant les fermentations en laboratoire, où la farine était le seul ingrédient non stérile et où aucune levure de boulangerie n'était ajoutée, d'autres espèces comme *C. glabrata* et *W. anomalus* apparaissent [40]. L'environnement direct est une autre source importante de contamination (fortuite) de la farine par des bactéries lactiques et des levures. Les conditions d'hygiène dans le levain et sur le lieu de production jouent donc également un rôle. Enfin, les micro-organismes observés dans les céréales et donc dans les levains peuvent être d'origine intestinale en raison des méthodes de fertilisation dans les champs céréaliers, des fèces de souris ou d'insectes dans les minoteries ou de la contamination fécale de l'environnement de production du levain [70, 175-178]. Cela pourrait expliquer la présence opportuniste de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lb. reuteri* et *Lb. rossiae*, communes dans l'appareil digestif.

### 5.2.3 Influence de la technologie

Outre les céréales et d'autres ingrédients de la pâte, principales sources de l'activité métabolique grâce aux enzymes de la farine et aux micro-organismes endogènes, les paramètres spécifiques du processus technologique déterminent la diversité, le nombre et l'activité métabolique des micro-organismes (ajoutés ou non) présents dans le levain stable et mature. Ces paramètres comprennent par exemple la composition chimique et la granulométrie de la farine, la température de fermentation et de stockage, la durée de fermentation, le pH, le potentiel d'oxydoréduction, le rendement en pâte (DY), la durée du rafraîchi, le nombre d'étapes de fermentation et les interactions entre les micro-organismes [57, 102, 164, 165, 179].

Il existe différents types de levain qui dépendent des conditions de transformation et/ ou de la technologie utilisée pour la production, et chaque type présente un microbiote spécifique [57, 180]. Les levains de type I, ou traditionnels, sont produits à partir d'un rafraîchi continu (quotidien) à température ambiante (< 30 °C) pour maintenir les micro-organismes dans un état actif. Par conséquent, les levains-chefs servent d'inoculum pour les pâtes suivantes, par rajout de la quantité désirée de pâte à un nouveau mélange de farine et d'eau, selon des cycles de préparation définis. Ces productions de levain à petite échelle sont utilisées pour la fabrication traditionnelle 'fait maison' de pain au levain. Les levains naturels hébergent souvent *Lb. sanfranciscensis* et *C. humilis*/*K. exigua*, respectivement bactéries lactiques et levures dominantes. Les levains de type II, ou industriels, reposent sur un long processus de fermentation (généralement deux à cinq jours), en une étape, à une température supérieure à 30 °C et avec une forte teneur en eau. Ces productions de levain à grande échelle donnent des préparations semi-fluides, utilisées comme acidifiant ou ingrédient aromatique. *Lb. amylovorus*, *Lb. fermentum*, *Lb. pontis* et *Lb. reuteri* sont fréquentes dans les levains de blé et de seigle de type II.

Les levains de type III sont préparés sous forme déshydratée et servent d'acidifiant non vivant et de vecteur de goût pour la production de pain (au levain). Contrairement aux levains de type I, les levains de type II et III nécessitent l'ajout de levure de boulangerie pour obtenir la pousse de la pâte.

Les starters commercialisés pour préparer des levains de type II et III sont destinés à normaliser les produits finis par l'acidification de la pâte et la formation des arômes [69, 181, 182]. On tend maintenant à développer des starters qui offrent de meilleures propriétés fonctionnelles autres que l'acidification et la formation des arômes, comme l'amélioration de la texture, des activités antibactériennes et antifongiques et des effets bénéfiques pour la santé [69, 166]. Dans ce contexte, la robustesse et la qualité des souches vis-à-vis des « concurrents » microbiens et aux conditions environnementales devraient être les principaux critères de sélection de starters utiles pour les processus de fermentation au levain, car il a été prouvé que des souches autochtones émergent souvent [69, 135, 138, 142]. Toutefois, il existe peu d'études sur l'exploitation industrielle des starters de levain [183, 184]. Récemment, l'utilisation de starters dans les levains fermentés de type I a fait l'objet de recherches [89, 123, 135, 185]. Naturellement, le fait que la température de fermentation affecte la proportion acide lactique/acide acétique est bien connu [185, 187]. En général, les starters à base de bactéries lactiques homofermentaires sont utilisés à haute température et pendant de courtes durées de fermentation (par ex. 37°C pendant 36 heures) et les starters à base de bactéries lactiques hétérofermentaires sont utilisés à basse température sur des durées plus longues (par ex. 25°C pendant 48 heures), ce qui produit plus d'acide lactique dans le premier cas et plus d'acide acétique dans le second cas. Toutefois, il serait très utile de connaître les circonstances de l'expression d'autres propriétés fonctionnelles qui constituent une valeur ajoutée des levains [182].

La température de fermentation, l'un des critères pour distinguer les levains de type I et II, est essentielle pour la dynamique des communautés et la stabilité du microbiote d'un levain [29, 160, 175, 179, 185, 188, 189]. Par exemple, les fermentations spontanées avec rafraîchi de levain de blé (type I) réalisées à 23°C pendant dix jours, favorisent *Le. citreum* plutôt que *Lb. fermentum*, qui domine à 30°C et 37°C [175]. De même, les fermentations à base de seigle amorcées par des starters commerciaux maintiennent la présence de *Lb. mindensis* et *Lb. sanfranciscensis* à 25°C (type I), mais favorisent *Lactobacillus crispatus* et *Lb. pontis* à 30°C et *Lb. crispatus*, *Lb. frumenti* et *Lb. panis* à 40°C (type II dans les deux cas) [184]. Tandis que *Lb. sanfranciscensis* préfère les longues fermentations à une température relativement basse, conditions souvent réunies durant la préparation de levains de type I, cette espèce prolifère de façon optimale à 32°C [159, 189]. Toutefois, si *C. humilis* croît de façon optimale à 27-28 °C mais ne prolifère pas au-dessus de 35°C [160, 189], l'association *Lb. sanfranciscensis*-*C. humilis* se développe optimalement à 25°C et 30°C, ce qui pourrait expliquer sa stabilité entre 20°C et 30°C [160, 190]. L'abondance de *Lb. sanfranciscensis* dans les levains de blé obtenus à température ambiante indique la faible compétitivité d'autres bactéries lactiques, comme *Lb. fermentum*, qui préfèrent une température plus élevée pour une croissance optimale. De même, la température pourrait être responsable d'une sélection favorisant *Lb. helveticus* dans les fermentations au levain de sorgho réalisées à 37°C [148].

Le pH joue également un rôle important dans la croissance des bactéries lactiques du levain [160, 179, 188, 189]. Par exemple, *Lb. sanfranciscensis* ne peut proliférer si le pH est inférieur à 3,8-4,0 [160, 189], tandis que *C. humilis* n'est pas dépendante du pH [190]. Le pH optimal se situe autour de 5,0 pour *Lb. sanfranciscensis*. Cette valeur correspond plus ou moins à celle qui est observée durant la première étape de fermentation de la pâte. En revanche, la prolifération des lactobacilles prévaut sur celle des levures quand le pH est supérieur à 4,5 [160]. Le taux d'acidification de la pâte pourrait donc déterminer le taux de *Lb. sanfranciscensis* dans la pâte. Les fermentations naturelles au levain qui présentent un pH plus élevé sont souvent dominées par un microbiote différent, avec *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella*, courantes dans les farines de céréales [57, 133] ou au début du processus de fermentation, mais qui disparaissent avec la baisse sensible du pH au cours de la fermentation [89, 108].

Bien que la fermentation au levain se fasse en anaérobiose, la présence d'oxygène au début de la fermentation et l'utilisation de petites quantités de pâte (surface élevée par rapport au volume) peuvent favoriser certaines espèces de bactéries lactiques et de levures [179, 190, 192]. Par exemple, une légère aération a une influence positive sur la compétitivité de *Lb. amylovorus* DCE 471 [179]. De même, *P. kudriavzevii* ne peut proliférer que s'il y a suffisamment d'oxygène durant la fermentation [190]. La force ionique et la concentration en sel de la pâte affectent également la croissance microbienne [160, 179, 193, 194]. De même, la présence d'acides organiques dans la farine et la capacité tampon de la farine influent sur la croissance des levures comme des bactéries lactiques [160, 179]. En général, les bactéries lactiques du levain sont acidotolérantes et leur croissance est favorisée par la présence de sel, comme c'est le cas par exemple de *Lb. amylovorus* DCE 471 [188, 193]. La croissance de *C. humilis* et *S. exiguus* est complètement inhibée par 4 % de chlorure de sodium ; la croissance de ces levures est aussi fortement inhibée par la présence d'acide acétique et, dans une moindre mesure, d'acide lactique [160, 179].

Tandis que les pratiques de rafraîchis favorisent principalement les bactéries lactiques hétérofermentaires, les quantités de pâte utilisées pour les rafraîchis et leur fréquence déterminent la dynamique de la communauté ainsi que la stabilité du microbiote du levain. La quantité de pâte utilisée dans le rafraîchi définit le pH initial et, ainsi, influe sur la croissance et les taux d'acidification des bactéries lactiques impliquées [107, 189, 190]. D'autre part, la quantité de pâte utilisée pour le rafraîchi détermine le rendement en pâte et, par conséquent, la disponibilité de l'eau ( $a_w$  de la pâte). Les rafraîchis courts pourraient favoriser des espèces de bactéries lactiques qui prolifèrent rapidement, facteur qui dépend à son tour de la température de fermentation et qui influence le taux d'acidification. À cet égard, *Lb. fermentum* est la plus compétitive à 30°C et 37°C avec un rafraîchi toutes les 24 heures, tandis qu'un mélange de *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum* prévaut à 30°C, avec un rafraîchi toutes les 48 heures [175]. Cela pourrait expliquer pourquoi *Lb. sanfranciscensis* est parfois absente durant les fermentations réalisées en laboratoire [136, 175]. D'autre part, un rafraîchi court semble favoriser *C. humilis* sur *S. cerevisiae* durant la fermentation au levain [190].

Enfin, les interactions entre bactéries lactiques et levures sont un aspect important pour la dynamique de la communauté et la stabilité du microbiote du levain [50, 57, 165, 189, 195, 196]. Les interactions sont à la fois coopératives et antagonistes. Durant certains processus de fermentation, les levures peuvent ne pas proliférer du tout, peut-être en raison d'une compétition nutritionnelle ou de la présence de composés inhibiteurs [47, 123, 175].

Dans d'autres processus, des interactions mutualistes engendrent des associations stables, pas seulement entre bactéries lactiques et levures (outre *Lb. sanfranciscensis*/*C. humilis*, *Lb. sanfranciscensis*/*K. barnettii*, *Lb. plantarum*/*S. cerevisiae* et *Lb. brevis*/*Candida* spp.), mais aussi entre bactéries lactiques (par ex. entre *Lb. sanfranciscensis* et *Lb. plantarum* ou *Lb. paralimentarius*) [40, 41, 58, 69, 142]. Néanmoins, la concurrence des bactéries lactiques et des levures dans le levain semble être spécifique aux souches et non aux espèces, comme cela a été prouvé récemment pour les souches de *Lb. sanfranciscensis* [135] et *Lb. plantarum* [138] dans les levains de blé.

## **5.3 Isolement des levures et des bactéries lactiques du levain**

### **5.3.1 Isolement des levures du levain**

L'isolement de levures dans les levains mûrs est relativement simple dans la mesure où un levain stable contient généralement une population homogène de levures dans le microbiote résident. Toutefois, le suivi de différentes étapes du développement d'un levain ou la recherche de composants mineurs nécessitent une stratégie optimisée pour la détection de composants sous-dominants. Deak a fourni des informations détaillées sur l'isolement des levures alimentaires [197]. Nous ne donnons ici qu'un bref aperçu des méthodes utilisées actuellement pour isoler les levures des levains, complété par quelques références de ressources méthodologiques plus complètes. Après homogénéisation et dilution des échantillons, la culture des levures est réalisée sur milieux solides. Cette séquence de manipulations doit être effectuée le plus rapidement possible pour éviter l'implantation de cellules de levures et la mort de cellules. Des diluants, généralement de l'eau distillée, de l'eau peptonée, une solution saline ou une solution de Ringer, peuvent influencer les comptes cellulaires, l'eau peptonée ayant engendré le taux le plus élevé de récupération cellulaire [198]. Yarrow [199] et Beuchat [200] donnent respectivement un aperçu des milieux de croissance et des techniques d'isolement classiques pour les levures et les levures alimentaires. Les milieux de culture utilisés dans les analyses de levain sont des milieux riches qui contiennent des composés complexes comme la peptone (par ex. gélose de Sabouraud), la tryptone (par ex. gélose nutritive Wallerstein Laboratory), l'extrait de levure (par ex. gélose à base de levure-peptone-dextrose), le malt (par ex. gélose à l'extrait de malt et de levure, gélose Wort) et l'infusion de pommes de terre (par ex. gélose dextrosée à la pomme de terre), associés à un composant supplémentaire pour inhiber la prolifération bactérienne. Très souvent, le chloramphénicol sert d'antibiotique et peut être ajouté au milieu avant la stérilisation sans perdre son activité.

L'acidification du milieu est parfois utilisée pour limiter la prolifération bactérienne ce qui, comme on le sait, affecte la croissance de certaines levures (du genre *Schizosaccharomyces*). Toutefois, en raison de l'acidité du levain, il semble improbable que des souches sensibles à l'acidité soient présentes dans un levain mûr. En général, la plupart des levures présentent une bonne croissance végétative à température ambiante, même si certaines peuvent proliférer à des températures négatives et d'autres à des températures allant jusqu'à 45°C [201].

Les températures cardinales de prolifération des levures sont spécifiques aux espèces et aux souches. La température d'incubation la plus adaptée pour les levures de levain serait la température à laquelle le levain est le plus actif. Les températures les plus fréquentes se situent entre 25°C et 30°C. Dans ces conditions, les premières levures sont généralement observées au bout de deux ou trois jours ; un contrôle quotidien des milieux de culture est recommandé pendant cinq à dix jours pour pouvoir pleinement différencier la morphologie des colonies et détecter les composants qui prolifèrent plus lentement.

Outre la prise en compte des conditions de croissance, la sélection des colonies de levures pour les caractériser et les identifier plus précisément est le facteur le plus important qui influence le caractère complet d'une étude sur la diversité. Même si les échantillons de levain présentent souvent une population de levures homogène, il faut garder à l'esprit que la morphologie de colonies d'espèces de levures distinctes est souvent très similaire. Chaque morphotype observé doit donc être prélevé plusieurs fois. Une stratégie logique consisterait à récupérer un nombre de colonies de chaque type qui représente un pourcentage raisonnable du nombre total de colonies de ce morphotype particulier. Chaque pourcentage de morphotype fournit de nombreuses données importantes sur les espèces présentes dans le levain si plus d'une espèce de levure est isolée. La génération de cultures pures est cruciale avant la caractérisation et l'identification des isolats. La pureté doit être testée au microscope et dans un milieu sans antibiotique pour exclure toute contamination du microbiote bactérien associé.

### **5.3.2 Isolement des bactéries lactiques du levain**

L'isolement des bactéries lactiques des environnements du levain est délicat pour trois raisons. Premièrement, les levains sont des écosystèmes complexes, non seulement en termes de composition microbienne, mais aussi en raison des effets interactifs entre les types de processus et d'ingrédients entrant dans la fabrication du pain. L'utilisation de glucides solubles par les bactéries lactiques et, par conséquent, leur rendement énergétique, sont fortement influencés par les levures associées et varient en fonction du type de glucides [195]. Toutefois, étant donné que de nombreux milieux utilisés pour l'isolement sélectif de bactéries lactiques contiennent des agents inhibiteurs de levure comme la cycloheximide, la pimarinine et l'amphotéricine B, l'interaction trophique entre les bactéries lactiques et les levures est perturbée, ce qui peut affecter la récupération potentielle des souches de bactéries lactiques fortement dépendantes de cette association. Deuxièmement, la fermentation du levain est un processus dynamique dans lequel les bactéries lactiques qui acidifient rapidement dominent l'écosystème dans un premier temps, avant d'être remplacées progressivement par des bactéries lactiques

typiques du levain qui contribuent largement aux propriétés organoleptiques et de texture du produit fini. Selon que l'isolement vise les bactéries lactiques sous-dominantes du début du processus et/ou les bactéries lactiques dominantes finales, il peut être nécessaire de prévoir plusieurs échantillons prélevés à différents moments. Troisièmement, les communautés de bactéries lactiques dans les levains peuvent être composées de groupes très divers sur le plan métabolique, avec des espèces homofermentaires obligatoires et facultatives ou hétérofermentaires obligatoires.

Certaines de ces espèces répondant à des critères de croissance spécifiques quant au milieu et aux conditions d'incubation (par ex. température, pH, atmosphère, etc.), il semble indispensable de prévoir différents paramètres de formulation du milieu et/ou conditions d'incubation pour couvrir l'intégralité du spectre métabolique des bactéries lactiques présentes dans un échantillon de levain.

Au départ, les bactéries lactiques du levain étaient essentiellement isolées sur milieu Man-Rogosa-Sharpe (MRS) [202], qui est le milieu général utilisé pour l'isolement et le dénombrement des lactobacilles issus des aliments fermentés. Le milieu MRS contient du glucose, principale source de glucides. Grâce aux connaissances croissantes sur la diversité des bactéries lactiques associées au levain, un certain nombre de milieux plus spécialisés ont été développés pour l'isolement sélectif d'espèces typiques du levain. Pour la détection de *Lb. sanfranciscensis*, Kline et Sugihara [75] ont proposé le milieu « SourDough Bacteria » (SDB), qui contient du maltose comme source de glucides, en plus de l'extrait de levure fraîchement préparé (FYE) pour favoriser la croissance. Le milieu Sanfrancisco a été développé pour l'isolement et l'identification de *Lb. pontis* et *Lb. mindensis* [79, 203]. Ce milieu contient trois glucides (maltose, fructose et glucose), du FYE, de la cystéine et du son de seigle ou de blé. Parallèlement à l'élaboration de nouveaux milieux, plusieurs auteurs ont aussi décrit des variations de la formule originale du milieu MRS pour l'isolement des bactéries lactiques du levain. Vogel et al. [203] ont proposé un milieu MRS modifié, appelé MRS « Vogel », avec un pH plus élevé (6,3), tandis que le milieu MRS5 [185] contient les trois principaux glucides présents dans l'écosystème du levain (maltose, fructose et glucose), avec de la cystéine et un mélange de vitamines. Dans des études ultérieures, le milieu MRS5 a permis d'isoler plusieurs nouvelles espèces de *Lactobacillus* du levain comme *Lb. spicheri* [80], *Lb. namurensis* [87] et *Lb. crustorum* [86]. Ces identifications récentes font apparaître que l'utilisation d'une formule modifiée du MRS, avec un pH moins élevé (<6,0) et enrichi d'une source supplémentaire de glucides comme le maltose et/ou le fructose ainsi que d'acides aminés et de vitamines, en anaérobiose, est l'une des stratégies les plus efficaces pour isoler de (nouvelles) espèces de bactéries lactiques du levain. Une étude récente a comparé la performance qualitative et quantitative de onze milieux de culture électifs et sélectifs pour l'isolement de lactobacilles de levains de type I [204]. D'après les résultats de l'identification obtenus par profil protéique, la plus grande diversité d'espèces a été obtenue sur milieu MRS contenant du maltose. Toutefois, le fait que le milieu MRS5 ait permis l'isolement d'une sous-population spécifique (mais non identifiée) observée uniquement sur ce milieu indique qu'il n'y a pas de milieu unique pour récupérer efficacement l'ensemble des lactobacilles des levains de type I.

## 5.4 Identification des levures et des bactéries lactiques du levain

Traditionnellement, l'identification des micro-organismes du levain était réalisée à partir de la culture (sélective), de la sélection et de la purification d'un nombre limité d'isolats et l'identification des isolats purifiés à l'aide de méthodes phénotypiques et/ou génotypiques.

Bien que cette approche ait sensiblement contribué à notre connaissance actuelle de la diversité des levures et des bactéries lactiques associées au levain, l'utilisation de milieux de culture présente un certain nombre de limites intrinsèques.

Dans une approche basée sur l'approche culturale, les espèces ayant des conditions de nutrition et de croissance très spécifiques ne peuvent être récupérées que de façon sporadique, voire pas du tout, ce qui entraîne une sous-estimation de la diversité réelle des espèces microbiennes présentes dans l'écosystème complexe du levain [68]. À l'inverse, les techniques non-culturelles, basées sur l'analyse métagénomique de l'ADN extrait directement de l'échantillon, permettent de déchiffrer la diversité des espèces et la dynamique des levures et des bactéries lactiques du levain, sans avoir à isoler et cultiver tous ses composants. Toutefois, ces méthodes basées sur l'étude de l'ADN présentent aussi des limites, comme la faible capacité de détection des espèces sous-dominantes et la résolution taxonomique inadéquate entre les espèces qui sont très proches sur le plan phylogénétique. En fonction de l'objectif de l'étude, la culture conventionnelle et les méthodes moléculaires sont donc souvent combinées pour mieux cerner la diversité des espèces microbiennes des écosystèmes du levain [41, 106].

## Références

1. Kurtzman CP, Fell JW (eds) (1998) The yeasts: a taxonomic study, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 111–947
2. Suh S-O, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance M-A (2006) Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycetous yeasts. *Mycologia* 98:1006–1017
3. Kurtzman CP (2003) Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Cluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS Yeast Res* 4:233–245
4. Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E (2008) Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Res* 8:939–954
5. Kurtzman CP (2011) Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:13–23
6. Daniel HM, Redhead SA, Schürer J, Naumov GI, Kurtzman CP (2012) Proposals to conserve the name *Wickerhamomyces* against *Hansenula* and to reject the name *Saccharomyces sphaericus* (Ascomycota: Saccharomycotina). *Taxon* 61 (2):459–461.
7. Sugihara TF, Kline L, Miller MW (1971) Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. *Appl Microbiol* 21:456–458
8. Galli A, Ottogalli G (1973) The microflora of the sour dough of “Panettone” cake. *Ann Microbiol* 23:39–49
8. Sichert G, Schröder R, Schöllhammer K (1979) Die Mikroflora des Sauerteiges. *Z Lebensm Unters Forsch* 169:77–81
10. Barber S, Báguena R, Martínez-Anaya MA, Torner MJ (1983) Microflora of the sour dough of wheat flour bread. I. Identification and functional properties of microorganisms of

- industrial sour doughs. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 23:552–562
11. Salovaara H, Savolainen J (1984) Yeast type isolated from Finnish sour rye dough starters. *Act Aliment Pol* 10:241–246
12. Barber S, Báguena R (1988) Microflora of the sour dough of wheat flour bread. V. Isolation, identification and evaluation of functional properties of sourdough's microorganisms. *Rev Agroquím Tecnol Aliment* 28:67–78
13. Galli A, Franzetti L, Fortina MG (1988) Isolation and identification of sour dough microflora. *Microbiol Aliment Nutr* 6:345–351
14. Hamad SH, Böcker G, Vogel RF, Hammes WP (1992) Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kisra production. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:728–731
15. Infantes M, Schmidt JL (1992) Characterization of the yeast flora of natural sourdoughs located in various French areas. *Sci Alim* 12:271–287
16. Boraam F, Faid M, Larpent JP, Breton A (1993) Lactic acid bacteria and yeasts associated with traditional Moroccan sourdough bread fermentation. *Sci Alim* 13:501–509
17. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J, La Rosa F, De Vincenzi S (1994) Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of Central Italy. *Ital J Food Sci* 6:85–94
18. Obiri-Danso K (1994) Microbiological studies on corn dough fermentation. *Cer Chem* 71:186–188
19. Iorizzo M, Coppola R, Sorrentino E, Grazia L (1995) Microbiological characterization of sourdough from Molise. *Industrie Alimentari XXXIV*:1290–1294
20. Almeida MJ, Pais CS (1996) Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Lett Appl Microbiol* 23:154–158
21. Foschino R, Terraneo R, Mora D, Galli A (1999) Microbial characterization of sourdoughs for sweet baked products. *Ital J Food Sci* 11:19–28
22. Mäntynen VH, Korhola M, Gudmundsson H, Turakainen H, Alfredsson GA, Salovaara H, Lindström K (1999) A polyphasic study on the taxonomic position of industrial sour dough yeasts. *Syst Appl Microbiol* 22:87–96
23. Rocha JM, Malcata FX (1999) On the microbiological profile of traditional Portuguese sourdough. *J Food Prot* 62:1416–1429
24. Paramithiotis S, Muller MRA, Ehrmann MA, Tsakalidou E, Seiler H, Vogel R, Kalantzopoulos G (2000) Polyphasic identification of wild yeast strains isolated from Greek sourdoughs. *Syst Appl Microbiol* 23:156–164
25. Rosenquist H, Hansen A (2000) The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. *Food Microbiol* 17:241–250
26. 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. *Int J Food Microbiol* 64:95–104
27. Pulvirenti A, Caggia C, Restuccia C, Gullo M, Giudici P (2001) DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs. *Ann Microbiol* 51:107–120
28. Gullo M, Romano AD, Pulvirenti A, Giudici P (2003) *Candida humilis* – dominant species in sourdoughs for the production of durum wheat bran flour bread. *Int J Food Microbiol* 80:55–59
29. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:7453–7461
30. Solieri L, De Vero L, Pulvirenti A, Gullo M (2003) A phenotypical and molecular study of yeast species in home-made sourdoughs. *Industri Aliment XLII*:971–978
31. Succi M, Reale A, Andrighetto C, Lombardi A, Sorrentino E, Coppola R (2003) Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiol Lett* 225:143–148
32. Foschino R, Gallina S, Andrighetto C, Rossetti L, Galli A (2004) Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Res* 4:609–618
33. Gatto V, Torriani S (2004) Microbial population changes during sourdough fermentation

- monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Ann Microbiol* 54:31–42
34. Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, De Vero L, Giudici P (2004) Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Lett Appl Microbiol* 38:113–117
35. Vernocchi P, Valmorri S, Gatto V, Torriani S, Gianotti A, Suzzi G, Guerzoni ME, Gardini F (2004) A survey on yeast microbiota associated with an Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation. *Food Res Int* 37:469–476
36. Vernocchi P, Valmorri S, Dalai I, Torriani S, Gianotti A, Suzzi G, Guerzoni ME, Mastrocola D, Gardini F (2004) Characterization of the yeast population involved in the production of a typical Italian bread. *J Food Sci* 69:M182–M186
37. Lombardi A, Zilio F, Andrighetto C, Zampese L, Loddo A (2007) Microbiological characterization of sourdoughs of Veneto region. *Industr Aliment XLVI*:147–151
38. Restuccia C, Randazzo C, Pitino I, Caggia C, Fiasconaro N (2007) Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria and yeasts from sourdough for Panettone production. *Industr Aliment XLVI*:1231–1236
39. Garofalo C, Silvestri G, Aquilanti L, Clementi F (2008) PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *J Appl Microbiol* 105:243–254
40. Vrancken G, De Vuyst L, Van der Meulen R, Huys G, Vandamme P, Daniel HM (2010) Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Res* 10:471–481
41. 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 Microbiol* 26:128–135
42. Luangsakul N, Keeratipibul S, Jindamorakot S, Tanasupawat S (2009) Lactic acid bacteria and yeasts isolated from the starter doughs for Chinese steamed buns in Thailand. *LWT-Food Sci Technol* 42:1404–1412
43. Osimani A, Zannini E, Aquilanti L, Mannazzu I, Comitini F, Clementi F (2009) Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche region. *Ital J Food Sci* 21:269–286
44. Saeed M, Anjum FM, Zahoor T, Nawaz H, Rehman SU (2009) Isolation and characterization of starter culture from spontaneous fermentation of sourdough. *Int J Agric Biol* 11:329–332
45. Paramithiotis S, Tsiasiotou S, Drosinos E (2010) Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *Eur Food Res Technol* 231:883–890
46. 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
47. Moroni AV, Arendt EK, Dal Bello F (2011) Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiol* 28:497–502
48. Zhang J, Liu W, Sun Z, Bao Q, Wang F, Yu J, Chen W, Zhang H (2011) Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in Inner Mongolia of China. *Food Contr* 22:767–774
49. Yarrow D (1978) *Candida milleri* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 28:608–610
50. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J (1994) The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:456–460
51. Daniel HM, Moons MC, Huret S, Vrancken G, De Vuyst L (2011) *Wickerhamomyces anomalous* in the sourdough microbial ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:63–73
52. Sampaio JP, Gonçalves P (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol* 74:2144–2152
53. Nel EE, van der Walt JP (1968) *Torulopsis humilis*, sp. n. *Mycopathol Mycol Appl* 36:94–96
54. Meyer SA, Payne RW, Yarrow D (1998) *Candida* Berkout. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts: a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 454–573
55. Daniel HM, Meyer W (2003) Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *Int J Food Microbiol* 86:61–78
56. Vaughan-Martini A (1995) *Saccharomyces barnetti* and *Saccharomyces spencerorum*: two new species of *Saccharomyces sensu lato* (van der Walt). *Antonie van Leeuwenhoek*

- 68:111–118
57. De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol* 16:43–56
58. Corsetti A, Settanni L (2007) Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int* 40:539–558
59. Orla-Jensen S (1919) The lactic acid bacteria. Fred Host and Son, Copenhagen
60. Felis GE, Dellaglio F (2007) Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Iss Intest Microbiol* 8:44–61
61. Schleifer KH, Ludwig W (1995) Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol* 18:461–467
62. Stiles ME, Holzapfel WH (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol* 36:1–29
63. Björkroth KJ, Schillinger U, Geisen R, Weiss N, Hoste B, Holzapfel WH, Korkeala HJ, Vandamme P (2002) Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:141–148
64. Cachat E, Priest FG (2005) *Lactobacillus suntoryeus* sp. nov., isolated from malt whisky distilleries. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:31–34
65. Leisner JJ, Vancanneyt M, Lefebvre K, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Vilalta NE, Rusul G, Swings J (2002) *Lactobacillus durianis* sp. nov., isolated from an acid-fermented condiment (tempoyak) in Malaysia. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:927–931
66. Yoon JH, Kang SS, Mheen TI, Ahn JS, Lee HJ, Kim TK, Park CS, Kho YH, Kang KH, Park YH (2000) *Lactobacillus kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1789–1795
67. Naser SM, Dawyndt PSR, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J (2007) Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2777–2789
68. De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 24:120–127
69. De Vuyst L, Vrancken G, Ravyts F, Rimaux T, Weckx S (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiol* 26:666–675
70. Ehrmann MA, Vogel R (2005) Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:31–42
71. Torriani S, Felis GE, Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* 67:3450–3454
72. De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Kalatzopoulos G, Tsakalidou E, Messens W (2002) The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl Environ Microbiol* 68:6059–6069
73. Gevers D, Huys G, Swings J (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett* 205:31–36
74. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Vrancken G, De Vuyst L, Settanni L, Vandamme P, Huys G (2009) Polyphasic taxonomic characterization of *Lactobacillus rossiae* isolates from Belgian and Italian sourdoughs reveals intraspecific heterogeneity. *Syst Appl Microbiol* 32:151–156
75. Kline L, Sugihara TF (1971) Microorganisms of the San Francisco sourdough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl Microbiol* 21:459–465
76. Corsetti A, Settanni L, van Sinderen D, Felis GE, Dellaglio F, Gobbetti M (2005) *Lactobacillus rossii* sp. nov., isolated from wheat sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:35–40
77. Naser SM, Hagen KE, Vancanneyt M, Cleenwerck I, Swings J, Tompkins TA et al (1980) *Lactobacillus suntoryeus* Cachat and Priest 2005 is a later synonym of *Lactobacillus helveticus* (Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1925 (Approved Lists 1980). *J Syst Evol Microbiol* 2006(56):355–360
78. Müller MRA, Ehrmann MA, Vogel RF (2000) *Lactobacillus frumenti* sp. nov., a new lactic

- acid bacterium isolated from rye-bran fermentations with a long fermentation period. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:2127–2133
79. Ehrmann MA, Müller MRA, Vogel RF (2003) Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int. J Syst Evol Microbiol* 53:7–13
80. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2004) Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri*, sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27:151–159
81. 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. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:615–620
82. Valcheva R, Korakli M, Onno B, Prévost H, Ivanova I, Ehrmann MA, Dousset X, Gänzle MG, Vogel RF (2005) *Lactobacillus hammessi* sp. nov., isolated from French sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:763–767
83. Aslam Z, Im WT, Ten LN, Lee MJ, Kim KH, Lee ST (2006) *Lactobacillus siliginis* sp. nov., isolated from wheat sourdough in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2209–2213
84. Valcheva R, Ferchichi MF, Korakli M, Ivanova I, Gänzle MG, Vogel RF, Prévost H, Onno B, Dousset X (2006) *Lactobacillus nantensis* sp. nov., isolated from French wheat sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:587–591
85. Ehrmann MA, Brandt M, Stolz P, Vogel RF, Korakli M (2007) *Lactobacillus secaliphilus* sp. nov, isolated from type II sourdough fermentation. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:745–750
86. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Huys G, Vandamme P, De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1461–1467
87. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Cleenwerck I, Huys G, Vandamme P, De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) *Lactobacillus namurensis* sp. nov., isolated from a traditional Belgian sourdough. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:223–227
88. Kashiwagi T, Suzuki T, Kamakura T (2009) *Lactobacillus nodensis* sp. nov., isolated from rice bran. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:83–86
89. Corsetti A, Settanni L, Valmorri S, Mastrangelo M, Suzzi G (2007) Identification of subdominant sourdough lactic acid bacteria and their evolution during laboratory-scale fermentations. *Food Microbiol* 24:592–600
90. Björkroth J, Dicks LMT, Holzapfel WH (2009) Genus III. *Weissella*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer K-H, Whitman WB (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, The Firmicutes. Springer, Dordrecht/New York, pp 643–654
91. Villani F, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S (1997) Characterization of strains of *Leuconostoc mesenteroides* by analysis of soluble whole-cell protein pattern, DNA fingerprinting and restriction of ribosomal DNA. *J Appl Microbiol* 82:578–588
92. Nigatu A (2000) Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus plantarum*, *Lact. fermentum*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. sake*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. gallinarum*, *Lact. casei*, *Weissella minor* and related taxa isolated from *kocho* and *tef*. *J Appl Microbiol* 89:969–978
93. Satokari R, Mattila-Sandholm T, Suihko ML (2000) Identification of pediococci by ribotyping. *J Appl Microbiol* 88:260–265
94. Barney M, Volgyi A, Navarro A, Ryder D (2001) Ribotyping and 16S rRNA sequencing for identification of brewery *Pediococcus* isolates. *Appl Environ Microbiol* 67:553–560
95. Rodas AM, Ferrer S, Pardo I (2003) 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst Appl Microbiol* 26:412–422
96. Nigatu A, Ahne S, Gashe BA, Molin G (1998) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Lett Appl Microbiol* 26:412–416
97. Mora D, Fortina MG, Parini C, Daffonchio D, Manachini PL (2000) Genomic subpopulations within the species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin AcH/PA-producing and non-producing strains. *Microbiology* 146:2027–2038
98. Dobson CM, Deneer H, Lee S, Hemmingsen S, Glaze S, Ziola B (2002) Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*: *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid

- bacterium isolated from beer. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:2003–2010
99. Pérez G, Cardell E, Zárate V (2002) Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides subspecies* isolated from Tenerife cheese. *Lett Appl Microbiol* 34:82–85
100. Hutkins RW (ed) (2006) *Microbiology and technology of fermented foods*. Blackwell Publishing, Iowa, pp 1–473
101. Ottogalli G, Galli A, Foschino R (1996) Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Adv Food Sci* 18:131–144
102. Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH, Vogelmann A (2005) Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol* 16:4–11
103. Arendt EK, Ryan LAM, Dal Bello F (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* 24:165–174
104. Leroy F, De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 15:67–78
105. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G (2007) Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* 73:6262–6269
106. 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. *Appl Environ Microbiol* 74:2414–2423
107. 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. *Appl Environ Microbiol* 73:4741–4750
108. Weckx S, Van der Meulen R, Allemeersch J, Huys G, Vandamme P, Van Hummelen P, De Vuyst L (2010) Community dynamics of sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Appl Environ Microbiol* 76:5402–5408
109. 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 Microbiol* 27:1000–1008
110. Gashe BA (1985) Involvement of lactic acid bacteria in the fermentation of tef (*Eragrostis tef*), an Ethiopian fermented food. *J Food Sci* 50:800–801
111. Infantes L, Tourneur C (1991) Survey on the lactic flora of natural sourdoughs located in various French areas. *Sci Alim* 11:527–545
112. Gabriel V, Lefebvre D, Vayssier Y, Faucher C (1999) Characterization of microflora from natural sourdoughs. *Microbiol Alim Nutr* 17:171–179
113. Ferchichi M, Valcheva R, Prevost H, Onno B, Dousset X (2007) Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol* 24:678–686
114. Ferchichi M, Valcheva R, Oheix N, Kabadjova P, Prevost H, Onno B, Dousset X (2008) Rapid investigation of French sourdough microbiota by restriction fragment length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2425–2434
115. 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. *Int J Food Microbiol* 135:53–59
116. Spicher G (1959) Die Mikroflora des Sauerteiges. I. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in Sauerteigen anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Zeitblatt für Bakteriologie II Abt* 113:80–106
117. Spicher G, Schröder R (1978) Die Mikroflora des Sauerteiges. IV. Mitteilung: Untersuchungen über die Art der in “Reinzuchtsauern” anzutreffenden stäbchenförmigen Milchsäurebakterien (Genus *Lactobacillus* Beijerinck). *Z Lebensm Unters Forsch* 167:342–354
118. Spicher G (1984) Weitere Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Variabilität der Mikroflora handelsüblicher Sauerteig-Starter. *Z Lebensm Unters Forsch* 178:106–109
119. Spicher G (1987) Die Mikroflora des Sauerteiges. XXII. Mitteilung: Die in

- Weizensauerteigen vorkommenden Lactobacillen. Z Lebensm Unters Forsch 184:300–303
120. Müller MRA, Wolfrum G, Stolz P, Ehrmann MA, Vogel RF (2001) Monitoring the growth of *Lactobacillus* species in a sourdough fermentation. Food Microbiol 18:217–227
121. Kitahara M, Sakata S, Benno Y (2005) Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. Lett Appl Microbiol 40:353–357
122. Sterr Y, Weiss A, Schmidt H (2009) Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. Int J Food Microbiol 136:75–82
123. Vogelmann SA, Seitter M, Singer U, Brandt MJ, 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. Int J Food Microbiol 130:205–212
124. Coppola S, Pepe O, Masi P, Sepe M (1996) Characterization of leavened doughs for pizza in Naples. Adv Food Sci 18:160–162
125. Zapparoli G, De Benedictis P, Salardi C, Veneri G, Torriani S, Dellaglio F (1996) Lactobacilli of sourdoughs from Verona bakery: a preliminary investigation. Adv Food Sci 18:163–166
126. Zapparoli G, Torriani S, Dellaglio F (1998) Differentiation of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. FEMS Microbiol Lett 166:325–332
127. Corsetti A, De Angelis M, Dellaglio F, Paparella A, Fox PF, Settanni L, Gobbetti M (2003) Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. J Appl Microbiol 94:641–654
128. Randazzo CL, Heilig H, Restuccia C, Giudici P, Caggia C (2005) Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. J Appl Microbiol 99:251–258
129. Reale A, Tremonte P, Succi M, Sorrentino E, Coppola R (2005) Exploration of lactic acid bacteria ecosystem of sourdoughs from the Molise region. Ann Microbiol 55:17–22
130. Ricciardi A, Parente E, Piraino P, Paraggio M, Romano P (2005) Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). Int J Food Microbiol 98:63–72
131. Catzeddu P, Mura E, Parente E, Sanna M, Farris GA (2006) Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. Syst Appl Microbiol 29:138–144
132. Valmorri S, Settanni L, Suzzi G, Gardini F, Vernocchi P, Corsetti A (2006) Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (Central Italy). Let Appl Microbiol 43:343–349
133. Corsetti A, Settanni L, Lopez CC, Felis GE, Mastrangelo M, Suzzi G (2007) A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolated from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. Syst Appl Microbiol 30:561–571
134. Zotta T, Piraino P, Parente E, Salzano G, Ricciardi A (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Cornetto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). World J Microbiol Biotechnol 24:1785–1795
135. 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. Appl Environ Microbiol 75:1099–1109
136. Zannini E, Garofalo C, Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Clementi F (2009) Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiol 26:744–753
137. Coda R, Nionelli L, Rizzello CG, De Angelis M, Tossut P, Gobbetti M (2010) Spelt and emmer flours: characterization of the lactic acid bacteria microbiota and selection of mixed starters for bread making. J Appl Microbiol 108:925–935
138. Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Pinto D, Siragusa S, Rizzello CG, Gobbetti M (2010) Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. Food Microbiol 27:897–908
139. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, De Angelis M, Gobbetti M (2010) Effect of sourdough fermentation on stabilisation, and chemical and nutritional characteristics of wheat germ. Food Chem 119:1079–1089
140. Azar M, Ter-Sarkissian N, Ghavifek H, Ferguson T, Ghassemi H (1977) Microbiological aspects of Sangak bread. J Food Sci Technol 14:251–254

141. Hüttner EK, Dal Bello F, Arendt EK (2010) Identification of lactic acid bacteria isolated from oat sourdoughs and investigation into their potential for the improvement of oat bread quality. *Eur Food Res Technol* 230:849–857
142. Moroni AV, Arendt EK, Morrissey JP, Dal Bello F (2010) Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. *Int J Food Microbiol* 142:142–148
143. Escalante A, Wachter C, Farres A (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 64:21–31
144. Faid M, Boraam F, Zyani I, Larpent JP (1994) Characterization of sourdough bread ferments made in the laboratory by traditional methods. *Z Lebensm Unters Forsch* 198:287–291
145. Edema MO, Sanni AI (2006) Micro-population of fermenting maize meal for sour maize bread production in Nigeria. *Nig J Microbiol* 20:937–946
146. Kazanskaya LN, Afanasyeva OV, Patt VA (1983) Microflora of rye sours and some specific features of its accumulation in bread baking plants of the USSR. In: Holas J, Kratochvil F (eds) *Developments in food science*, vol 5B, *Progress in cereal chemistry and technology*. Elsevier, London, pp 759–763
147. Barber S, Báguena R (1989) Microflora de la masa madre panaria. XI. Evolución de la microflora de masas madre durante el proceso de elaboración por el sistema de ‘refrescos’ sucesivos y de sus correspondientes masa panarias. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 29:478–491
148. Hamad SH, Dieng MC, Ehrmann MA, Vogel RF (1997) Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J Appl Microbiol* 83:764–770
149. Spicher G, Lönner C (1985) Die Mikroflora des Sauerteiges. XXI. Mitteilung: Die in Sauerteigen Schwedischer Bäckereien vorkommenden Lactobacillen. *Z Lebensm Unters Forsch* 181:9–13
150. Lönner C, Welander T, Molin N, Dostálek M, Blickstad E (1986) The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. *Food Microbiol* 3:3–12
151. Gül H, Özçelik S, Sağdıç O, Certel M (2005) Sourdough bread production with lactobacilli and *S. cerevisiae* isolated from sourdoughs. *Proc Biochem* 40:691–697
152. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J (1996) *Lactobacillus sanfrancisco*, a key sourdough lactic acid bacterium: physiology, genetic and biotechnology. *Adv Food Sci* 18:167–175
153. Foschino R, Arrigoni C, Picozzi C, Mora D, Galli A (2001) Phenotypic and genotypic aspects of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs in Italy. *Food Microbiol* 18:277–285
154. Picozzi C, Bonacina G, Vigentini I, Foschino R (2001) Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Microbiology* 156:2035–2045
155. 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. *J Appl Microbiol* 106:1081–1092
156. Settanni L, Van Sinderen D, Rossi J, Corsetti A (2005) Rapid differentiation and *in situ* detection of 16 sourdough *Lactobacillus species* by multiplex PCR. *Appl Environ Microbiol* 71:3049–3059
157. Settanni L, Valmorri S, van Sinderen D, Suzzi G, Paparella A, Corsetti A (2006) Combination of multiplex PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis for monitoring common sourdough-associated *Lactobacillus species*. *Appl Environ Microbiol* 72:3793–3796
158. Di Cagno R, De Angelis M, Gallo G, Settanni L, Berloco MG, Siragusa S, Parente E, Corsetti A, Gobbetti M (2007) Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. *J Appl Microbiol* 103:821–835
159. Groenewald WH, Van Reenen CA, Todorov SD, Du Toit M, Witthuhn R, Holzapfel WH, Dicks LMT (2006) Identification of lactic acid bacteria from vinegar flies based on phenotypic and genotypic characteristics. *Am J Enol Viticult* 57:519–525
160. Gänzle MG, Ehmann M, Hammes WP (1998) Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 64:2616–2623
161. Picozzi C, D’Anchise F, Foschino R (2006) PCR detection of *Lactobacillus sanfranciscensis*

- in sourdough and Panettone baked product. *Eur Food Res Technol* 222:330–335
162. Leroy F, De Winter T, Foulquié Moreno MR, De Vuyst L (2007) The bacteriocin producer *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is a competitive starter culture for type II sourdough fermentations. *J Sci Food Agricult* 87:1726–1736
  163. Hammes WP, Stolz P, Gänzle M (1996) Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Adv Food Sci* 18:176–184
  164. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:57–69
  165. Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel RF (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol* 24:128–138
  166. Gänzle MG (2009) From gene to function: metabolic traits of starter cultures for improved quality of cereal foods. *Int J Food Microbiol* 134:29–36
  167. Dal Bello F, Walter J, Roos S, Jonsson H, Hertel C (2005) Inducible gene expression in *Lactobacillus reuteri* LTH5531 during type II sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 71:5873–5878
  168. Hüfner E, Britton RA, Roos S, Jonsson H, Hertel C (2008) Global transcriptional response of *Lactobacillus reuteri* to the sourdough environment. *Syst Appl Microbiol* 31:323–338
  169. Vrancken G, Rimaux T, De Vuyst L, Leroy F (2008) Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. *Int J Food Microbiol* 128:55–66
  170. Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, De Vuyst L, Leroy F (2009) Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *Int J Food Microbiol* 135:216–222
  171. 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 Microbiol* 26:720–727
  172. Weckx S, Altemeersch J, Van der Meulen R, Vrancken G, Huys G, Vandamme P, Van Hummelen P, De Vuyst L (2011) Metatranscriptome analysis for insight into whole-ecosystem gene expression during spontaneous wheat and spelt sourdough fermentations. *Appl Environ Microbiol* 77:618–626
  173. Gänzle MG, Vogel R (2003) Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *Int J Food Microbiol* 80:31–45
  174. Pepe O, Blaiotta G, Anatasio M, Moschetti G, Ercolini D, Villani F (2004) Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Syst Appl Microbiol* 27:443–453
  175. Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, Leroy F, De Vuyst L (2011) Influence of temperature and backslipping time on the microbiota of a type I propagated laboratory wheat sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 77:2716–2726
  176. Du Toit M, Dicks LMT, Holzapfel WH (2003) Identification of heterofermentative lactobacilli isolated from pig faeces by numerical analysis of total soluble cell protein and RAPD patterns. *Lett Appl Microbiol* 37:12–16
  177. Park SH, Itoh K (2005) Species-specific oligonucleotide probes for the detection and identification of *Lactobacillus* isolated from mouse faeces. *J Appl Microbiol* 99:51–57
  178. De Angelis M, Siragusa S, Berloco M, Caputo L, Settanni L, Alfonsi G, Amerio M, Grandi A, Ragni A, Gobbetti M (2006) Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. *Res Microbiol* 157:792–801
  179. Neysens P, De Vuyst L (2005) Kinetics and modelling of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:95–103
  180. Böcker G, Stolz P, Hammes WP (1995) Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der Sauerteig-typischen Stämme *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Broth* 49:370–374
  181. Vogel RF, Ehrmann MA, Gänzle MG (2002) Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:631–638
  182. Ravyts F, De Vuyst L (2011) Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. *Food Microbiol* 28:1129–1139

183. Brandt MJ (2007) Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol* 24:161–164
184. Carnevali P, Ciati R, Leporati A, Paese M (2007) Liquid sourdough fermentation: industrial application perspectives. *Food Microbiol* 24:150–154
185. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt M, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475–482
186. Decock P, Cappelle S (2005) Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Technol* 16:113–120
187. Katina K, Heinio R-L, Autio K, Poutanen K (2006) Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. *Food Sci Technol* 39:1189–1202
188. Messens W, Neysens P, Vansielegheem 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. *Appl Environ Microbiol* 68:1431–1435
189. Brandt MJ, Hammes WP, Gänzle MG (2004) Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *Eur Food Res Technol* 218:333–338
190. Vogelmann SA, Hertel C (2011) Impact of ecological factors on the stability of microbial associations in sourdough fermentation. *Food Microbiol* 28:583–589
191. Valmorri S, Mortensen HD, Jesperen L, Corsetti A, Gardini F, Suzzi G, Arneborg N (2008) Variations of internal pH in typical Italian sourdough yeasts during co-fermentation with lactobacilli. *Food Sci Technol* 41:1610–1615
192. Martínez-Anaya MA, Llin ML, Macias MP, Collar C (1994) Regulation of acetic acid production by homo- and heterofermentative lactobacilli in whole-wheat sourdoughs. *Z Lebensm Unters Forsch* 199:186–190
193. Neysens P, Messens W, De Vuyst L (2003) Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int J Food Microbiol* 88:29–39
194. Simonson L, Salovaara H, Korhola M (2003) Response of wheat sourdough parameters to temperature, NaCl and sucrose variations. *Food Microbiol* 20:193–199
195. Gobbetti M (1998) The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends Food Sci Technol* 9:267–274
196. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J (1994) The sourdough microflora – interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of amino acids. *World J Microbiol Biotechnol* 10:275–279
197. Deak T (2003) Detection, enumeration and isolation of yeasts. In: Boekhout T, Robert V (eds) *Yeasts in food*, 1st edn. Behr's Verlag, Hamburg, pp 39–68
198. Mian MA, Fleet GH, Hocking AD (1997) Effect of diluent type on viability of yeasts enumerated from foods or pure culture. *Int J Food Microbiol* 35:103–107
199. Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The yeasts: a taxonomic study*, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, pp 77–100
200. Beuchat LR (1993) Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int J Food Microbiol* 19:1–14
201. Arthur H, Watson K (1976) Thermal adaptation in yeasts: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. *J Bacteriol* 128:56–68
202. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME (1960) A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 23:130–135
203. Vogel RF, Böcker G, Stolz P, Ehrmann M, Fanta D, Ludwig W, Pot B, Kersters K, Schleifer KH, Hammes WP (1994) Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *Int J Food Microbiol* 44:223–229
204. Vera A, Rigobello V, Demarigny Y (2009) Comparative study of culture media used for sourdough lactobacilli. *Food Microbiol* 26:728–733

## Chapitre 7 (extraits)

# Physiologie et biochimie des bactéries lactiques

Michael Gänzle et Marco Gobbetti

### 7.1 Introduction

Au cours des dernières décennies, les études sur la physiologie et la biochimie des bactéries lactiques du levain ont permis de mieux comprendre l'écologie microbienne du levain ainsi que l'influence de l'activité métabolique des bactéries lactiques sur le goût, la texture, la conservation et les propriétés nutritionnelles des produits de boulangerie à pâte levée. Les bactéries lactiques sont les micro-organismes dominants du levain. Leur polyvalence métabolique favorise leur adaptation aux conditions de transformation variables et les interactions métaboliques avec les levures autochtones déterminent les mécanismes de protocoopération durant la fermentation au levain [1-3]. Les *Lactobacillus* sont les espèces les plus fréquemment observées dans les fermentations au levain, même si des espèces des genres *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella* et *Leuconostoc* ont aussi été identifiées ([4-6], voir Chap. 5). Un grand nombre d'espèces du genre *Lactobacillus* ont été identifiées pour la première fois dans des levains ou des processus de fermentation de céréales [5]. Ce chapitre présente les paramètres généraux de croissance et les facteurs de stress, le métabolisme des glucides et des acides aminés, la synthèse des exopolysaccharides et des composés antimicrobiens et la conversion des composés phénoliques et des lipides des bactéries lactiques durant la fermentation au levain.

---

M. Gänzle (\*)

Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta  
Edmonton, Canada  
e-mail : mgaenzle@ualberta.ca

M. Gobbetti

Department of Soil, Plant and Food Science, University of Bari Aldo Moro, Bari, Italie

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*, DOI  
10.1007/978-1-4614-5425-0\_7, © Springer Science+Business Media New York 2013

## 7.2 Paramètres généraux de croissance et de stress

Les bactéries lactiques associées à la fermentation au levain (Chap. 5) sont aussi diversifiées que les paramètres généraux de croissance et de stress. Différents processus de fermentation au levain favorisent des organismes aux critères de croissance variables. Généralement, les levains de type I, fréquemment rafraîchis pour obtenir la fermentation de la pâte sans levure de boulangerie, favorisent des organismes qui prolifèrent rapidement dans les substrats composés de céréales. Dans ces conditions, *Lactobacillus sanfranciscensis* est souvent l'organisme prédominant. Les levains de type II, caractérisés, eux, par des fermentations prolongées à des températures élevées, sélectionnent des organismes acidotolérants, comme *L. pontis*, *L. fermentum*, *L. reuteri* et des organismes associés [6-8].

Cet effet des paramètres de fermentation sur le microbiote du levain se traduit par la réaction en termes de croissance des bactéries lactiques au pH, à la température et à la concentration en chlorure de sodium. Des modèles mathématiques pour la croissance des bactéries lactiques du levain ont été élaborés pour *L. sanfranciscensis* [9], *L. pontis* [10], *L. amylovorus* [10, 11] et *L. plantarum* [12]. La température optimale de croissance est spécifique à chaque espèce : pour les organismes mésophiles, elle se situe entre 30 et 35°C, tandis que les organismes thermophiles ne prolifèrent pas à température ambiante (25°C), mais idéalement entre 40 et 45°C [9-11, 13]. Les fermentations traditionnelles du levain en Europe ont généralement lieu entre 25 et 35°C (Chap. 4) et sont donc dominées par les bactéries lactiques mésophiles. Les processus industriels et fermentations de céréales dans les climats tropicaux ont souvent lieu à des températures plus élevées et, par conséquent, favorisent les bactéries lactiques thermophiles [7, 8].

Le pH optimal des bactéries lactiques du levain est généralement compris entre 5,0 et 6,0 [9-11], ce qui correspond au pH du levain après inoculation de 5 à 20 % d'une portion précédente de levain. Le pH de la farine de blé, (6,2-6,5) est étonnamment proche du pH maximal qui permet la croissance de *L. sanfranciscensis*, à savoir 6,7 [9]. Le pH minimal de croissance de *L. sanfranciscensis* et *L. pontis* a été fixé à respectivement 3,9 et 3,5. La croissance et la production d'acide lactique de *L. plantarum* se poursuivent jusqu'à un pH de 3,1 [12]. La plus grande tolérance de *L. pontis* correspond à sa compétitivité dans les levains de type II, qui favorisent les bactéries lactiques acidotolérantes. L'acidotolérance de *L. pontis* et des organismes associés adaptés aux levains de type II, dépend de la conversion de l'arginine et du glutamate, qui consomment des protons intracellulaires, et de la formation d'exopolysaccharides. Ces voies métaboliques sont détaillées dans le présent chapitre.

Les bactéries lactiques tolèrent des concentrations d'acide acétique et d'acide lactique non dissociés qui sont bien supérieures à celles observées généralement dans les levains [9-11]. La croissance de *L. sanfranciscensis* et *L. pontis* est observée dans des milieux où la concentration maximale de lactate est respectivement de 300 et 500 mmol/L [9, 10] ; ces deux organismes tolèrent également de fortes concentrations d'acide acétique. Cette tolérance élevée aux acides organiques contraste avec la réaction des levures, inhibées par les acides organiques non dissociés, mais pas par un pH bas.

En outre, étant donné que c'est le pH et non la concentration en acides organiques qui limite la croissance des bactéries lactiques dans le levain, la

**Levain de panification : biologie et technologie / sous la direction de Marco Gobbetti & Michael Gänzle**  
sélection de substrats composés de céréales qui ont une forte capacité tampon, comme la farine de blé complet ou le son, permet la production de levain ou de produits à base de levain qui ont une forte concentration d'acides organiques, avec une acidité titrable totale également élevée.

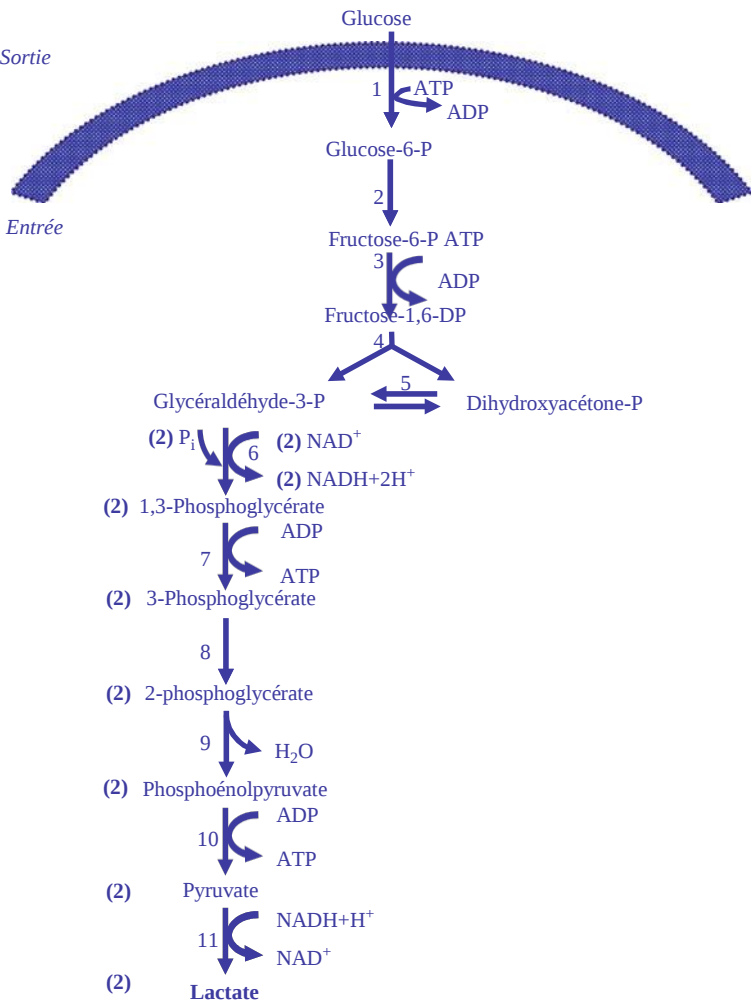
La réaction des bactéries lactiques du levain à de fortes concentrations en sel dépend aussi de chaque espèce. Généralement, les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires sont plus sensibles au chlorure de sodium que d'autres lactobacilles. Par exemple, les espèces hétérofermentaires *L. sanfranciscensis* et *L. pontis* sont inhibées par 4 % de chlorure de sodium, tandis que *L. plantarum* et *L. amylovorus* tolèrent jusqu'à 6 % [9, 10, 12].

### 7.3 Métabolisme des glucides

Les bactéries lactiques se divisent en trois catégories métaboliques :

- (1) les bactéries homofermentaires obligatoires, qui fermentent les hexoses par la voie EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) en lactate, principal produit final du métabolisme glucidique (Fig. 7.1) ; les pentoses ne sont pas fermentés ; dans cette catégorie, le levain contient par exemple les lactobacilles homofermentaires obligatoires *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. farciminis*, *L. amylovorus* et *L. mindensis*.
- (2) les bactéries hétérofermentaires obligatoires, qui fermentent les hexoses et pentoses par la voie 6-PG/PK (6-phosphogluconate/phosphokétolase) et synthétisent des quantités équimoléculaires de lactate et d'éthanol ou d'acétate ; du CO<sub>2</sub> est en outre produit à partir d'hexoses (Fig. 7.2) ; le levain héberge principalement les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires *L. sanfranciscensis*, *L. rossiae*, *L. brevis*, *L. pontis* et *L. fermentum*.
- (3) les bactéries hétérofermentaires facultatifs, qui fermentent les hexoses par la voie EMP, et les pentoses et le gluconate par la voie 6-PG/PK ; le levain contient notamment les lactobacilles homofermentaires facultatifs *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. paralimentarius* et *L. curvatus* [13].

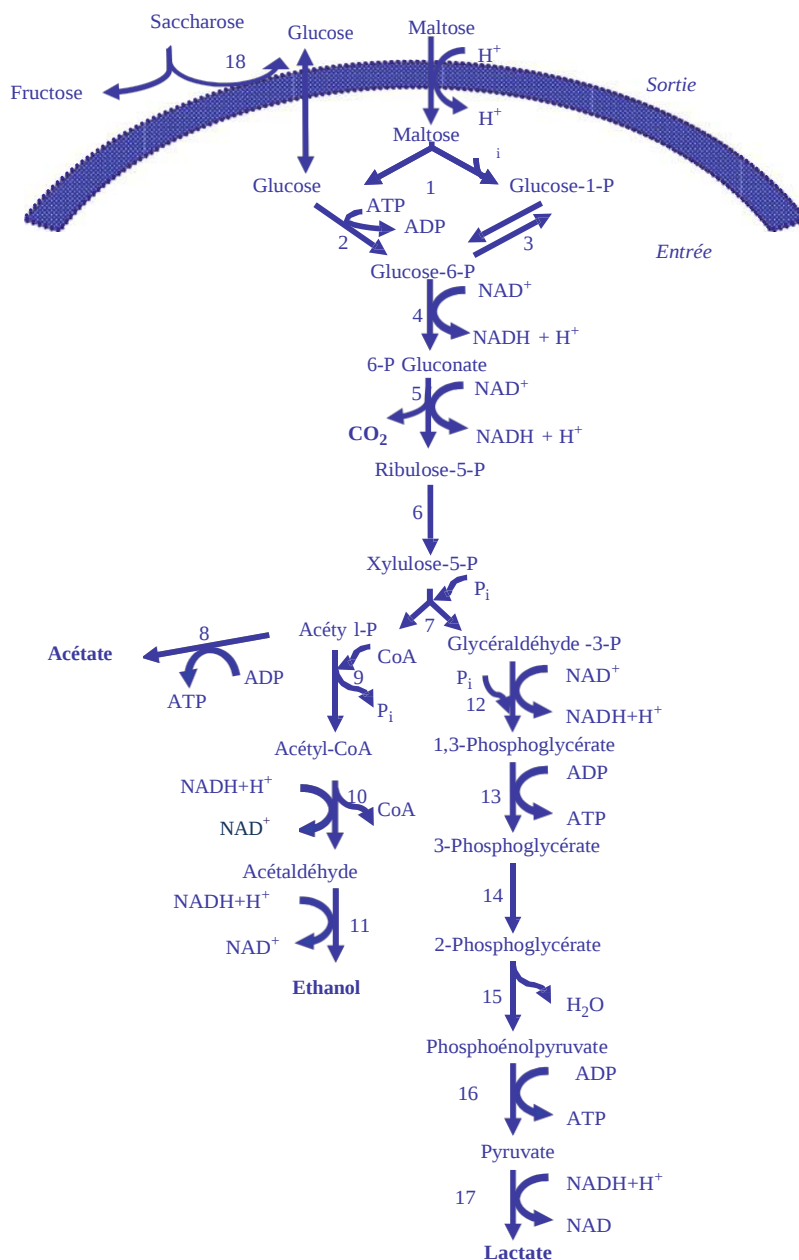
Le métabolisme homofermentaire des hexoses en milieu anaérobie produit 2 mol ATP par mol hexose. Le métabolisme hétérofermentaire des hexoses en milieu anaérobie, produit seulement 1 mol ATP par mol hexose, sauf en présence de co-substrats (Fig. 7.1). Contrairement à d'autres aliments fermentés où les espèces homofermentaires obligatoires jouent le rôle principal, les bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires sont dominantes dans les fermentations au levain [6]. Plusieurs facteurs déterminent la dominance des souches hétérofermentaires : (1) le métabolisme du maltose via l'activité de la maltose phosphorylase, la fermentation simultanée des hexoses et pentoses par la voie 6-PG/PK et l'utilisation de fructose et d'autres substrats comme accepteur externe d'électrons ; (2) la température et le pH optimaux qui coïncident souvent avec les valeurs de la fermentation au levain ; (3) la capacité à avoir des évolutions au niveau des phénotypes et à clairement s'adapter à différents stress environnementaux ; et (4) la synthèse d'un large spectre de composés antimicrobiens [6]. Les sources variables de glucides fermentescibles dans le levain déterminent des réponses phénotypiques, comme l'utilisation d'accepteurs externes d'électrons, l'utilisation préférentielle et/ou simultanée de sources d'énergie non conventionnelles et l'interaction avec des enzymes exogènes ou endogènes de la farine.



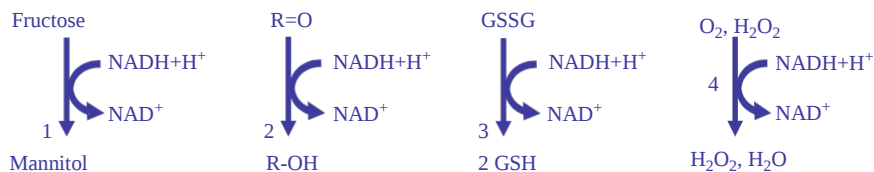
**Fig. 7.1** Voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ; fermentation homolactique. Les produits finaux du métabolisme glucidique sont indiqués en **gras**. (2) indique la formation de deux moles de chaque composé. 1 Glucokinase, 2 glucose-6-phosphate isomérase, 3 phosphofructokinase, 4 fructose 1,6-bisphosphate aldolase, 5 triose-phosphate isomérase, 6 glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, 7 3-phosphoglycérate kinase, 8 phosphoglycérate mutase, 9 énalase, 10 pyruvate kinase, 11 lactate déshydrogénase

### 7.3.1 Utilisation d'accepteurs externes d'électrons

Étant donné que le rendement énergétique du métabolisme hétérofermentaire des hexoses est faible, la compétitivité des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires dépend de l'utilisation d'accepteurs externes d'électrons. Ils présentent l'avantage pratique de modifier sensiblement le quotient de fermentation (voir Chap. 4), qui a un impact positif sur les caractéristiques sensorielles et de conservation des produits de boulangerie au levain [2].



**Fig. 7.2** Voie 6-Phosphogluconate/phosphokétolase (6-PG/PK) ; fermentation hétérolactique. Les produits finaux du métabolisme glucidique sont indiqués en **gras** (adapté de [3]). 1 Maltose phosphorylase, 2 hexokinase, 3 phosphoglucomutase, 4 glucose-6-phosphatedéshydrogénase, 5-6-phosphogluconate décarboxylase, 6 épimérase, 7 phosphokétolase, 8 acétate kinase, 9 phosphotransacétylase, 10 aldéhyde déshydrogénase, 11 alcool déshydrogénase, 12 glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase, 13 3-phosphoglycérate kinase, 14 phosphoglycérate mutase, 15 énalase, 16 pyruvate kinase, 17 lactate déshydrogénase, 18 lévane-saccharase

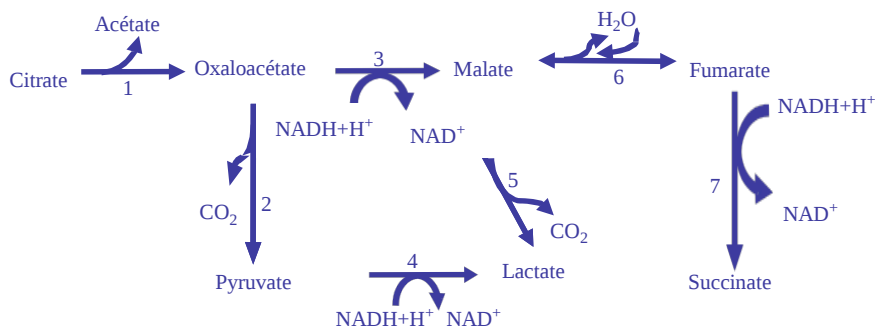


**Fig. 7.3** Exemples de réactions qui permettent la réoxydation du cofacteur NADH + H<sup>+</sup> (adapté de [3]). 1 Mannitol déshydrogénase, 2 alcool déshydrogénase, 3 glutathion déshydrogénase, 4 NADH oxydase. GSSG : glutathion oxydé ; GSH : glutathion réduit ; R=O, aldéhyde (par ex. hexanal) ; R-OH, alcool correspondant (par ex. hexanol)

D'autres ATP sont synthétisées quand l'acétyl-phosphate sert à la synthèse d'acétate par l'acétate kinase (Fig. 7.2). La synthèse d'acétate et d'ATP comme métabolites de substitution à partir d'acétyl-phosphate nécessite des co-substrats pour oxyder le NADH, générés dans la ramification supérieure de la voie 6-PG/PK. Quand des accepteurs externes d'électrons sont disponibles, le recyclage du NADH ne nécessite pas la synthèse d'éthanol à partir d'acétyl-phosphate. La plupart des bactéries lactiques hétérofermentaires sont capables de réduire le fructose en mannitol pour permettre la régénération du cofacteur (Fig. 7.3). Le fructose est converti quantitativement en mannitol par la plupart des bactéries lactiques hétérofermentaires en milieu acide [3, 14]. Quand des bactéries lactiques maltose-négatives et maltose-positives sont associées, la conversion du fructose peut jouer un autre rôle [2]. La plupart des souches de *Weissella* spp. diffèrent des autres bactéries lactiques hétérofermentaires car elles ne convertissent pas le fructose en mannitol avec formation concomitante d'acétate [15]. L'activité de mannitol déshydrogénase de *L. sanfranciscensis* LTH2581 est optimale à 35°C et avec un pH compris entre 5,8 et 8,0 [16]. Une fois synthétisé, le mannitol peut être utilisé comme source énergétique par les souches de *L. plantarum*. Ce processus a lieu en anaérobiose et en présence de cétoacides (par ex. pyruvate) qui agissent comme accepteurs d'électrons [17].

L'oxygène est aussi utilisé comme accepteur externe d'électron et est réduit en H<sub>2</sub>O, avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme intermédiaire ([2, 18] ; Fig. 7.3). L'aérobiose a aussi engendré l'expression d'une superoxyde dismutase (SOD) de 12,5-kDa probablement dépendante de Mn<sup>2+</sup> [18]. Globalement, les bactéries lactiques possèdent différentes enzymes impliquées dans la détoxification des radicaux oxygénés. Les NADH peroxydases et le système impliqué dans le transport de L-cystéine sont spécifiquement utilisés par les lactobacilles du levain pour les détoxifier H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [19].

La phase de latence de croissance et le rendement énergétique de *L. sanfranciscensis* CB1 sont positivement influencés par les traces d'oxygène et Mn<sup>2+</sup> [18]. En présence d'aldéhydes dans l'environnement, *L. sanfranciscensis* présentait une activité réductrice spécifique par l'alcool déshydrogénase dépendante du NADH [20, 21] (Fig. 7.3). Par exemple, la réduction d'hexanal en hexanol active la voie de l'acétate kinase et la synthèse d'acide acétique. La réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH), via glutathion déshydrogénase, protège en outre du stress oxydant et permet la synthèse de l'acide acétique [22] (Fig. 7.3).



**Fig. 7.4** Métabolisme de l'acide citrique (adapté de [3]). 1 Citrate lyase, 2 oxaloacétate décarboxylase, 3 malate déshydrogénase, 4 lactate déshydrogénase, 5 enzyme malolactique, 6 fumarase, 7 succinate déshydrogénase

### 7.3.2 Métabolisme des acides organiques

Les bactéries lactiques du levain présentent un métabolisme du citrate, du malate et du fumarate variable en fonction des souches ; quelques espèces sont aussi capables de métabolisme anaérobie de l'acide lactique. La conversion du citrate, du malate et du lactate consomme des protons intracellulaires, ce qui augmente l'acidotolérance des bactéries lactiques. Les étapes initiales du métabolisme du citrate par les bactéries lactiques sont le transport par la citrate perméase et la réaction catalysée par la citrate lyase (Fig. 7.4). L'oxaloacétate a deux destinations possibles : la première permet la synthèse d'acide succinique ; la seconde procède par décarboxylation en pyruvate [23]. *Lactococcus lactis* convertit une partie du pyruvate en  $\alpha$ -acétolactate. Cette réaction a lieu quand des accepteurs externes d'électrons (par ex. citrate) sont disponibles, auquel cas il y a excédent de pyruvate par rapport à la quantité nécessaire pour la régénération du NADH par lactate déshydrogénase. L' $\alpha$ -acétolactate est réduit en acétoïne ou converti par voie non enzymatique en diacétyle, composé aromatique important de la mie de pain [24]. La formation de diacétyle n'est pas observée chez les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires et la conversion de citrate en succinate est la voie la plus courante pour les autres bactéries lactiques du levain. Toutefois, la synthèse de diacétyle a été observée dans les levains fermentés par *L. plantarum*, *L. farciminis*, *L. alimentarius* et *L. acidophilus* [25]. *Lactobacillus sanfranciscensis* utilise la voie du pyruvate pour convertir le citrate en lactate et en acétate, avec co-fermentation par maltose [26, 27]. La régénération du cofacteur durant la réaction catalysée par la lactate déshydrogénase permet également la synthèse d'acétate. La formation de lactate à partir de citrate n'entraîne pas de baisse du pH et, par conséquent, le métabolisme du citrate de *L. sanfranciscensis* durant la fermentation au levain n'est pas limité par un pH bas [3]. L'utilisation de citrate durant la fermentation au levain favorise donc une hausse des concentrations de lactate et d'acétate. Le malate et le fumarate sont aussi convertis en lactate par *L. sanfranciscensis* [3, 26] (Fig. 7.4).

Dans le levain, la synthèse de pyruvate et lactate peut aussi résulter du catabolisme de substrats non conventionnels (par ex. des acides aminés). La sérine peut, par exemple, être désaminée en ammonium et pyruvate. Ce dernier peut être lui-même réduit en lactate. Le pyruvate peut être synthétisé directement (par ex. à partir de l'alanine) ou indirectement (par ex. à partir de l'acide aspartique) par une réaction de transamination [17].

La conversion du lactate a été décrite pour *L. parabuchneri*, isolat du *ting*, levain de sorgo lactofermenté [28]. La conversion du lactate en propane-diol passe par la réduction, NADH dépendante, du lactate en lactaldéhyde et en 1,2 propane-diol. La réduction de deux NADH en NAD<sup>+</sup> permet la formation concomitante d'acétate à partir du lactate [29]. La conversion du lactate en 1,2-propane-diol a lieu principalement dans la phase stationnaire de croissance et la consommation de lactate améliore la survie de *L. parabuchneri* en phase stationnaire [30].

L'avantage pratique de sources d'énergie non conventionnelles est plus complexe et moins généralisable au sein de la population des bactéries lactiques du levain. Dans certains cas, l'ajout (par ex. citrate) est nécessaire pour conditionner le métabolisme microbien. Dans d'autres cas (par ex. désamination ou transamination d'acides aminés), il est possible d'observer une grande variabilité de phénotypes en fonction des biotypes.

### **7.3.3 Utilisation préférentielle et/ou simultanée des sources énergétiques**

Les bactéries lactiques utilisent différentes sources d'énergie en fonction des caractéristiques hiérarchiques déterminées par les mécanismes de contrôle global, essentiellement régulés au niveau de la transcription [31]. Quand les bactéries sont soumises à diverses sources énergétiques, elles utilisent de préférence le substrat qui garantit le meilleur rendement cellulaire. Dans des mélanges de glucides contenant notamment du glucose, *L. amylovorus* DCE 471 consommait systématiquement le glucose très rapidement, ce qui semblait orienter la croissance durant la première phase. La consommation de maltose commençait uniquement quand le glucose atteignait des niveaux faibles [32]. La présence de glucose réprimait la fermentation de fructose, maltose et saccharose de *L. paralimentarius* et *Weissella cibaria* [33]. Toutefois, le métabolisme du maltose, du saccharose et du fructose n'est pas réprimé par le glucose chez les espèces *L. reuteri* et *L. sanfranciscensis*, adaptées au levain. La lévane-saccharase, la seule enzyme responsable du métabolisme du saccharose chez *L. sanfranciscensis*, essentielle au métabolisme du saccharose chez *L. reuteri*, est exprimée de façon constitutive ou régulée indépendamment de l'apport en glucides [35, 39]. Chez *L. reuteri*, la saccharose phosphorylase est induite par le saccharose ou le raffinose mais n'est pas réprimée par le glucose [40]. Le métabolisme efficace et préférentiel du maltose et du saccharose dû à plusieurs lactobacilles hétérofermentaires obligatoires du levain reflète l'adaptation aux substrats composés de céréales dans lesquels le saccharose et le raffinose sont les principales sources de carbone dans le grain au repos, tandis que le maltose est la principale source de carbone, libéré, à partir de l'amidon, par les enzymes des céréales durant la fermentation.

Le métabolisme du maltose et du saccharose par la maltose phosphorylase ou la

saccharose phosphorylase permet un meilleur rendement énergétique car l'énergie chimique de la liaison glycosidique est utilisée pour la synthèse d'ATP [34, 35]. Ces deux enzymes sont fréquemment observées chez les bactéries lactiques hétérofermentaires du levain. L'expression de la maltose phosphorylase chez *L. sanfranciscensis* et *L. reuteri* est constitutive et non réprimée par le glucose, alors que l'activité de l'hexokinase est observée seulement en présence de glucose. Durant la croissance sur maltose, *L. sanfranciscensis* hydrolyse par phosphorylation le maltose et accumule du glucose dans l'environnement selon un rapport molaire d'environ 1:1 (Fig. 7.2) [34, 36]. Le glucose accumulé par *L. sanfranciscensis* est disponible pour les levures et les bactéries lactiques maltose-négatives. Toutefois, la libération de glucose par la cellule a lieu uniquement quand l'activité de l'enzyme hexokinase n'est pas induite [37]. Aucune accumulation de glucose n'a été observée chez des souches de *L. sanfranciscensis* cultivées en présence de maltose et fructose. L'hypothèse retenue est donc qu'une fois libéré, le glucose est utilisé par l'activité de l'enzyme hexokinase, elle-même induite par la présence de fructose [38].

Certaines souches de *L. sanfranciscensis* ont la capacité d'exprimer une activité  $\beta$ -glucosidase, mais cette activité est réprimée par le glucose [41]. Chez les lactobacilles du levain, la fermentation des pentoses et des hexoses est aussi plus souvent simultanée que consécutive. Par rapport à la croissance sur maltose comme seule source d'énergie, *L. alimentarius* 15 F, *L. brevis* 10A, *L. fermentum* 1 F et *L. plantarum* 20B présentaient les taux de croissance et d'acidification les plus élevés et le meilleur rendement cellulaire quand elles étaient cultivées en présence de xylose, de ribose et d'arabinose [42]. D'autres bactéries lactiques du levain avaient les meilleurs résultats en termes de croissance et de synthèse d'acide acétique quand elles étaient cultivées en présence d'un mélange de pentoses [43]. La présence de pentoses induit la synthèse de l'enzyme phosphokétolase chez les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives (par ex. *L. plantarum*) et permet la seconde moitié de la voie 6-PG/PK (Fig. 7.2). La sélection de lactobacilles qui ont la capacité de fermenter des pentoses pourrait donc remplacer l'ajout de saccharose pour favoriser la formation d'acétate.

## **7.4 Protéolyse et catabolisme des acides aminés libres**

### **7.4.1 Protéolyse**

Les bactéries lactiques sont caractérisées par des auxotrophies en acides aminés multiples. Elles dépendent des protéases présentes dans le milieu ou de l'activité de leur système protéolytique pour satisfaire leur métabolisme azoté [44]. Les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques comprennent une sérine-protéinase associée à l'enveloppe cellulaire (CEP-PrtP), des transporteurs d'oligopeptides et d'acides aminés et un grand nombre de peptidases intracellulaires [45] (Fig. 7.5). Contrairement aux bactéries lactiques des fermentations laitières, *L. sanfranciscensis* ATCC 27651<sup>T</sup> et la plupart des autres lactobacilles du levain ne possèdent pas de protéinase associée à l'enveloppe cellulaire et dépendent des protéases associées aux céréales [46, 47].

La comparaison entre les pâtes au levain et les pâtes acidifiées chimiquement a montré que la dégradation des protéines natives est essentiellement due à l'activité des protéinases endogènes des céréales [46, 48, 49]. L'acidification par les bactéries lactiques du levain favorise l'activation des aspartate-protéinases des céréales, dont le pH d'activité optimal est compris entre 3,0 et 4,5 [50].

Néanmoins, certaines souches des lactobacilles de levain ont montré une capacité à hydrolyser des albumines, des globulines et des gliadines durant la fermentation [51-53]. Les oligopeptides (acides aminés 4-40) sont transportés à l'intérieur de la cellule bactérienne et hydrolysés par un système complexe de peptidases. La Fig. 7.6. présente les peptidases intracellulaires de *L. sanfranciscensis*. Plusieurs peptidases intracellulaires de *L. sanfranciscensis* CB1 ont été caractérisées biochimiquement notamment : une métal-dipeptidase (PepV) de 65-kDa, avec une spécificité élevée par rapport aux dipeptides qui contiennent des acides aminés hydrophobiques, une aminopeptidase générale de 75-kDa (PepN) et une aminopeptidase X-prolyl-dipeptidyl (PepX), qui hydrolyse uniquement les substrats avec la séquence N-terminale X-Pro [51, 54]. La capacité à hydrolyser des oligopeptides adjacents aux résidus de proline a été mise en évidence chez certains lactobacilles du levain. Mais le système protéolytique des bactéries lactiques ne coupe pas les peptides avec le motif de séquence XPP [55]. Globalement, la fermentation au levain augmente les concentrations des acides aminés par rapport aux pâtes acidifiées chimiquement [48, 52]. La protéolyse durant la fermentation au levain comprend deux étapes (Fig. 7.7) : (1) la protéolyse primaire qui libère des oligopeptides, principalement opérée par les protéinases endogènes des céréales activées par un pH bas et l'accumulation de thiols et (2) la protéolyse secondaire qui libère des acides aminés libres et des peptides de petite taille, opérée uniquement par l'activité de peptidase des bactéries lactiques.

La dégradation des protéines des céréales a une importance capitale pour les caractéristiques rhéologiques et sensorielles des produits de boulangerie à pâte levée. Les gluténines à masse moléculaire élevée (HMWG) et les gliadines, par ordre de solubilité décroissante des fractions g, a et w, sont hydrolysées en oligopeptides solubles dans l'alcool [47]. L'hydrolyse partielle des gluténines durant la fermentation au levain induit la dépolymérisation et la solubilisation du macropolymère gluténine (GMP), ce qui affecte les propriétés viscoélastiques de la pâte. Le degré de polymérisation du GMP est aussi influencé par les composés réducteurs. Le glutathion réduit (GSH) est le réducteur le plus important dans la pâte de blé. Le GSH peut être sujet à une réaction d'échange avec les groupes de thiol des protéines de gluten, ce qui réduit les liaisons disulfure intramoléculaires et favorise la baisse de la masse moléculaire du GMP [50]. Les bactéries lactiques hétérofermentaires du levain possèdent une activité de réductase du glutathion (voir Chap. 3.1), qui réduit le GSSG oxydé extracellulaire en GSH. Le recyclage continu de GSSG en GSH maintient les groupements SH dans la pâte à un niveau élevé et augmente le nombre de groupements SH dans les protéines de gluten [56].

Le système protéolytique des bactéries lactiques du levain contribue à l'accumulation de peptides bioactifs dans le levain. La fermentation des levains de malt de seigle par *L. reuteri* a entraîné l'accumulation de peptides inhibiteurs de l'enzyme qui convertit l'angiotensine [55] ; la formation de peptides ayant une activité antioxydante a également été démontrée [57].

Il a été mis en évidence que la fermentation au levain associée à des enzymes fongiques baisse la concentration de gluten à moins de 10 ppm, soit une valeur tolérable par les personnes souffrant de la maladie cœliaque [52, 58]. Cette farine de blé hydrolysée a été utilisée pour la fabrication de produits de boulangerie consommés pendant soixante jours par des personnes intolérantes au gluten. Les analyses hématologiques, immunologiques et histologiques ont montré que la consommation de 10 g de ce type de gluten par jour ne représentait aucun risque pour ces personnes [59, 60]. Neuf peptidases ont été partiellement purifiées de l'extrait cytoplasmique des lactobacilles de levain susmentionnés et utilisées pour hydrolyser l'épitope 33-mer, le peptide immunogénique le plus souvent généré durant la digestion de l'espèce *Triticum*. Au moins trois peptidases, (aminopeptidase générale de type N (PepN), X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase (PepX) et endopeptidase (PepO)) étaient nécessaires pour détoxifier le 33-mer sans générer de peptides immunogéniques associés. Après quatorze heures d'incubation, la combinaison d'au moins six peptidases différentes avait entièrement hydrolysé le 33-mer en acide aminé libre [61]. Les activités peptidasique des lactobacilles du levain présentent une diversité considérable sur le plan des souches [55, 62] et l'expression des gènes qui codent pour les peptidases et le transport des peptides est contrôlée par la concentration des peptides présents durant la fermentation au levain [46].

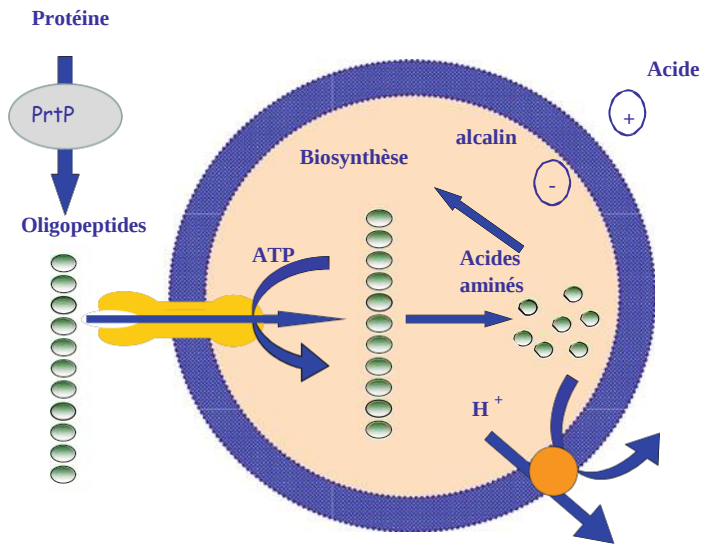


Fig. 7.5 Système protéolytique des bactéries lactiques (Adapté de [44]). PrtP, protéinase associée à l’enveloppe cellulaire (CEP)

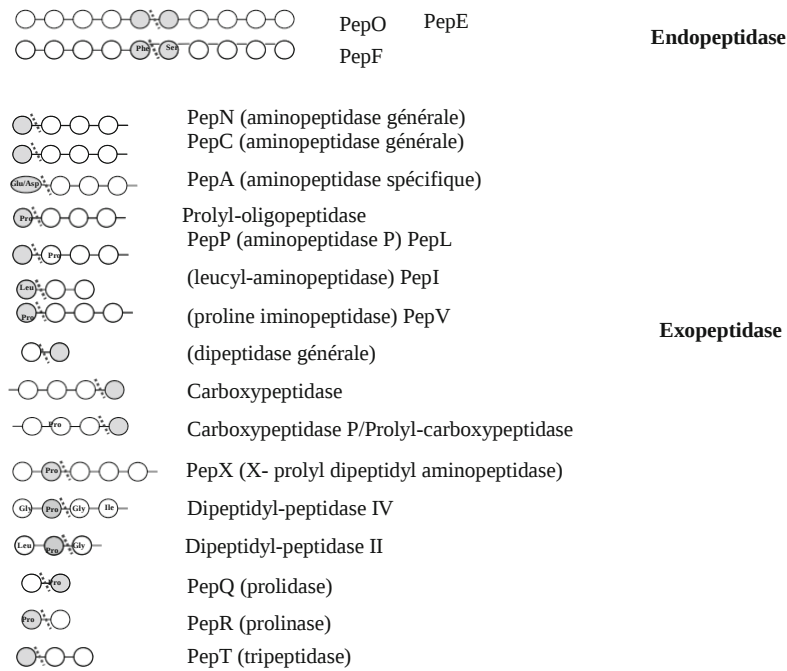
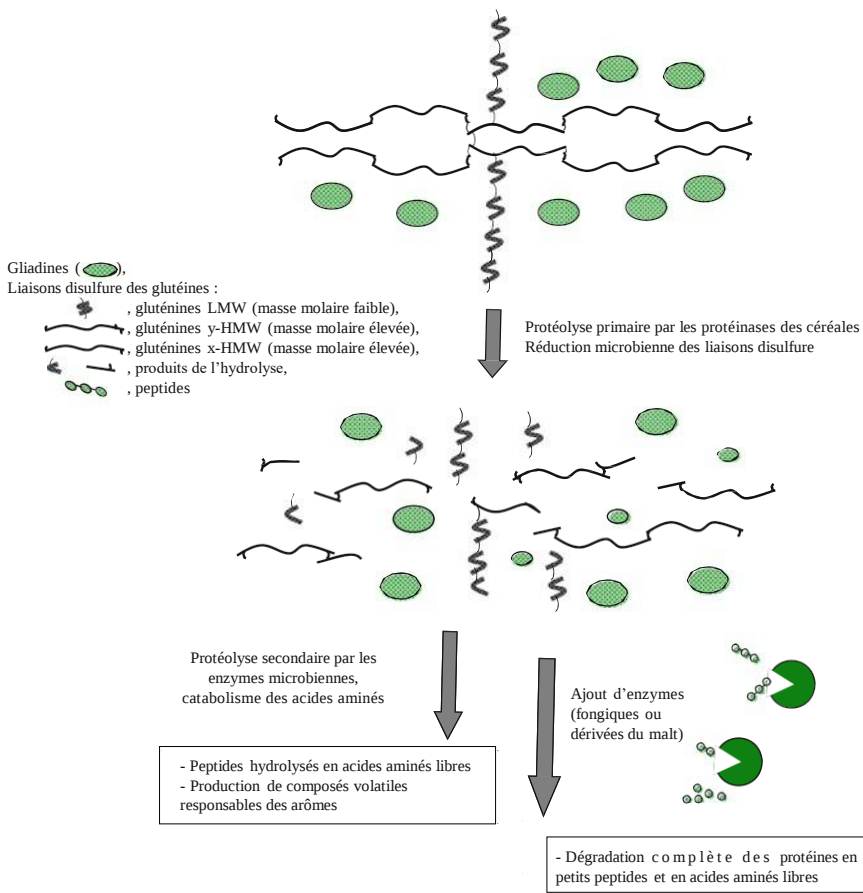


Fig. 7.6 Système de peptidase des bactéries lactiques (par ex. *Lactobacillus sanfranciscensis*) et spécificité du substrat (Adapté [50])



**Fig. 7.7** Système protéolytique durant la fermentation au levain. Le schéma présente les substrats, les enzymes et les activités des protéolyses primaire et secondaire (adapté de [50])

7.4.2 Métabolisme des acides aminés

Les peptides et les acides aminés libres constituent des substrats de conversion par voie microbienne ou sont transformés durant la cuisson en composés aromatiques volatiles (Tableau 7.1). Le catabolisme des acides aminés libres par les bactéries lactiques du levain, en plus de ses effets sur les propriétés sensorielles, augmente la résistance aux acides et le rendement énergétique microbien dans des conditions de dénutrition [63, 64].

**Tableau 7.1** Exemples d’acides aminés précurseurs et composés carbonyliques dérivés, générés durant la fermentation au levain et/ou la cuisson

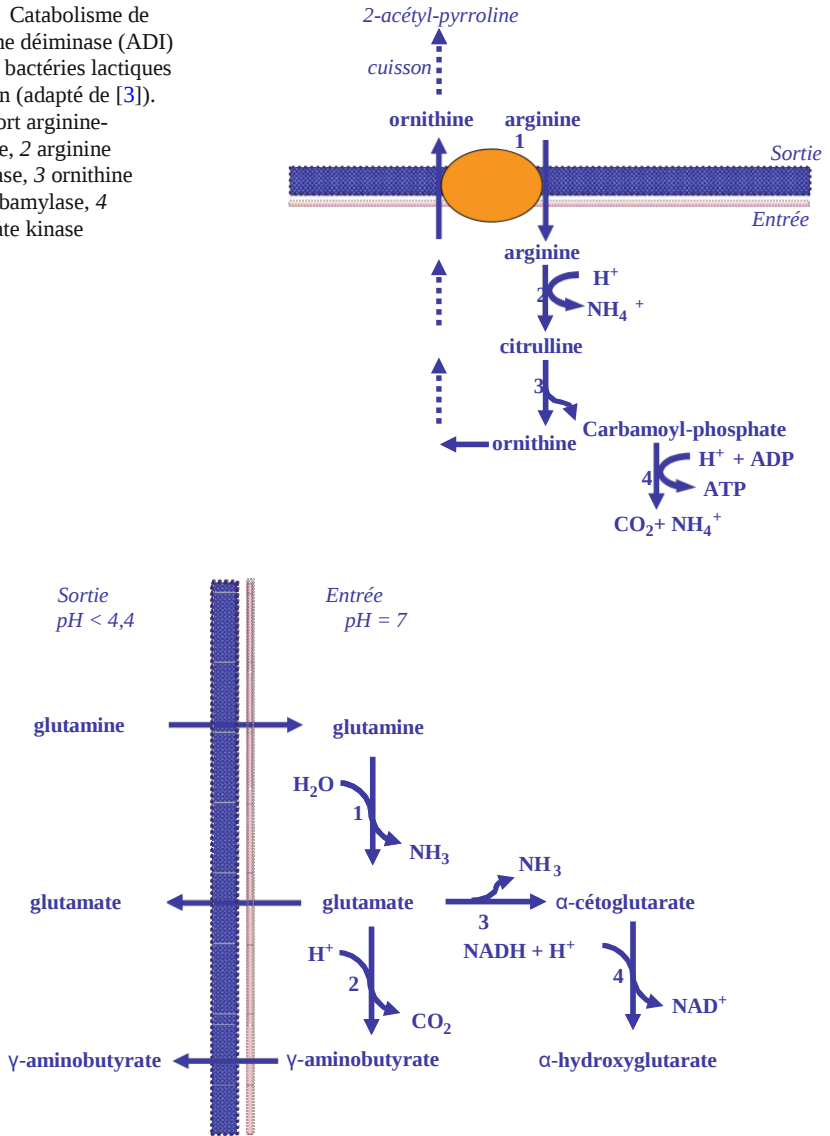
| Précurseur d’acide aminé | Composé carbonylique dérivé |
|--------------------------|-----------------------------|
| Leucine                  | 3-Méthylbutanol             |
| Isoleucine               | 2-Méthylbutanol             |
| Valine                   | 2-Méthylpropional           |
| Alanine                  | Acétaldéhyde                |
| Méthionine               | Méthional                   |
| Phénylalanine            | Phénylacétaldéhyde          |
| Thréonine                | 2-Hydroxypropional          |

La conversion des acides aminés par les bactéries lactiques se fait principalement par des réactions de décarboxylation, par transamination et par métabolisme par lyases (pour plus de détails, voir [65]). Ces voies induisent la synthèse de cétoacides, d’aldéhydes, d’acides et d’alcools, composés aromatiques importants des produits de boulangerie (Tableau 7.1) [66]. Les principales voies qui jouent un rôle important dans la fermentation du levain sont détaillées ci-après.

Le catabolisme de l’arginine (arginine déiminase, ADI) a été étudié en détail sur les bactéries lactiques du levain (Fig. 7.8). Il implique trois enzymes : l’arginine déaminase (ADI), l’ornithine carbamyl transférase (OTC) et la carbamate kinase (CK). Une quatrième protéine, située dans la membrane cellulaire joue le rôle de transporteur et permet l’échange antiport entre l’arginine et l’ornithine [67]. L’activité des enzymes ADI, OTC et CK est une propriété spécifique à plusieurs espèces hétérofermentaires obligatoires, dont *L. rossiae*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. fermentum*, *L. pontis* et *L. fructivorans* [68]. Généralement, l’arginine est convertie quantitativement en ornithine par des bactéries lactiques ADI-positives durant la fermentation au levain [48]. L’activité des enzymes ADI, OTC et CK de *L. rossiae* CB1 est bien adaptée à l’acidité (pH 3,5-4,5) et à la température (30-37°C) de la fermentation au levain [69]. La voie ADI chez *L. fermentum* IMDO 130101 est régulée à la hausse en réponse aux conditions de stress dû à la température et au sel [70]. Durant la fermentation au levain, l’expression de la voie ADI favorise : (1) la croissance et la survie des microbes, ce qui favorise une composition constante de la population microbienne du levain ; (2) la tolérance des bactéries lactiques à l’acidité en contribuant à l’homéostasie du pH intracellulaire ; et (3) la synthèse d’ornithine qui est convertie, durant la cuisson, en 2-acétyl-1-pyrroline, responsable du goût typique de la croûte du pain.

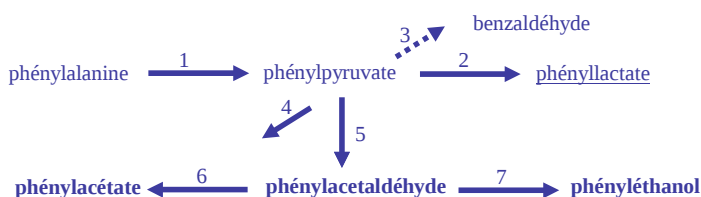
La glutamine est l'acide aminé le plus présent dans les protéines de blé ; *L. sanfranciscensis* et d'autres lactobacilles du levain convertissent la glutamine en glutamate (Fig. 7.9). La conversion de la glutamine en glutamate favorise l'adaptation des lactobacilles à l'acidité du levain en raison de la consommation des protons et de la libération d'ammoniac qui augmente le pH extracellulaire. La synthèse du glutamate a aussi un effet positif sur les propriétés sensorielles des produits de boulangerie à pâte levée [71].

**Fig. 7.8** Catabolisme de l'arginine déiminase (ADI) chez les bactéries lactiques du levain (adapté de [3]).  
1 Antiport arginine-ornithine, 2 arginine déaminase, 3 ornithine transcarbamylase, 4 carbamate kinase



**Fig. 7.9** Métabolisme de la glutamine et du glutamate des bactéries lactiques du levain. 1 glutaminase, 2 glutamate décarboxylase, 3 glutamate déshydrogénase, 4 alcool déshydrogénase

Le glutamate est alternativement décarboxylé en  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) ou converti en  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ KG) par la glutamate déshydrogénase (EC 1.4.1.3). Les lactobacilles hétérofermentaires utilisent de préférence l' $\alpha$ KG comme accepteur d'électron pour régénérer le NADH [20]. L' $\alpha$ KG agit également comme l'accepteur privilégié d'acides aminés dans les réactions de transamination avec la leucine, la phénylalanine et d'autres acides aminés [72]. Après le transport des peptides, les réactions de transamination sont le deuxième facteur qui limite la conversion des acides aminés par les bactéries lactiques [73]. L'ajout d' $\alpha$ -cétoglutarate à la matrice alimentaire ou la sélection de souches de glutamate déshydrogénase-positives augmente considérablement la conversion des acides aminés.



**Fig. 7.10** Catabolisme de la phénylalanine chez *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus sanfranciscensis*. Les produits métaboliques les plus abondants sont soulignés et ceux qui sont responsables des composés aromatiques sont indiqués en **gras** (adapté de [3]). 1 Transaminase, 2 déshydrogénase, 3 oxydation chimique, 4 complexe multi-enzyme, 5 décarboxylase, 6 et 7, déshydrogénase

L'activité de la glutamate déshydrogénase varie en fonction du biotype des bactéries lactiques [73]. Cette enzyme est aussi NADH + H<sup>+</sup> dépendante, ce qui lie le catabolisme du glutamate de *L. sanfranciscensis* DSM20451 à la régénération du NADH durant le métabolisme central des glucides (FigFig. 7.9) [74]. L'activité de la glutamate décarboxylase (GAD) a été également observée chez les bactéries lactiques du levain [75, 76]. La GAD convertit le L-glutamate en GABA, par une  $\alpha$ -décarboxylation en une phase. GABA, acide aminé non protéique à quatre atomes de carbone, a plusieurs activités fonctionnelles. Les fermentations au levain par *L. plantarum* et *Lc. lactis* ou *L. reuteri* permettent la synthèse de GABA dans des concentrations pouvant aller jusqu'à 9 g/kg, comparables à celles des préparations fonctionnelles [75, 76]. La résistance aux acides imputable à la glutamate décarboxylase s'est avérée contribuer à la persistance de *L. reuteri* dans la fermentation des levains de type II [64].

La Fig. 7.10 présente le catabolisme de la phénylalanine par *L. sanfranciscensis* et *L. plantarum*. La leucine, l'isoleucine et la valine subissent un mécanisme similaire. Des voies alternatives pour le métabolisme de la leucine ont été proposées mais restent à valider par des analyses enzymatiques et génétiques [77].

Le phényl-lactate ou le phényl-acétate sont les principaux produits finaux du catabolisme de la phénylalanine. Pour *L. plantarum* TMW1.468, souche glutamate déshydrogénase-négative, la synthèse de phényl-lactate est favorisée par l'ajout d' $\alpha$ KG mais pas par celui de glutamate et de citrate. Inversement, pour *L. sanfranciscensis* DSM20451, souche glutamate déshydrogénase-positive, la synthèse de phényl-lactate est favorisée par l'ajout d' $\alpha$ KG, de glutamate et de peptides contenant du glutamate. Toutefois, l' $\alpha$ KG et le glutamate favorisent la conversion de la phénylalanine seulement en présence de fructose ou de citrate, probablement en raison du cofacteur de dépendance de la glutamate déshydrogénase [74]. Durant la fermentation au levain, *L. plantarum* TMW1.468 et *L. sanfranciscensis* DSM20451 synthétisent environ 0,35-1,1 mM de phényl-lactate ; la concentration d'1,5 mM inhibe la croissance de *L. sanfranciscensis* DSM20451 durant la croissance en milieu MRS avec un pH de 5,3 [3].

Les activités de la cystathionine lyase sont aussi diffuses au sein des bactéries lactiques du levain (Fig. 7.11) [78]. Une cystathionine  $\gamma$ -lyase homotétramérique de 160-kDa a été purifiée et caractérisée à partir de *L. reuteri* DSM 20016 [79]. Cette enzyme active un grand nombre d'acides aminés et de dérivés d'acides aminés, dont la méthionine, et permet la synthèse d'ammoniac, d' $\alpha$ -cétobutyrate et de composés soufrés volatiles à faible masse moléculaire.



**Fig. 7.11** Métabolisme de la cystathionine (adapté de [169]). 1 Cystathionine- $\gamma$ -lyase, 2 cystathionine- $\beta$ -lyase, 3 cystathionine- $\beta$ -synthétases

## 7.5 Synthèse des exopolysaccharides

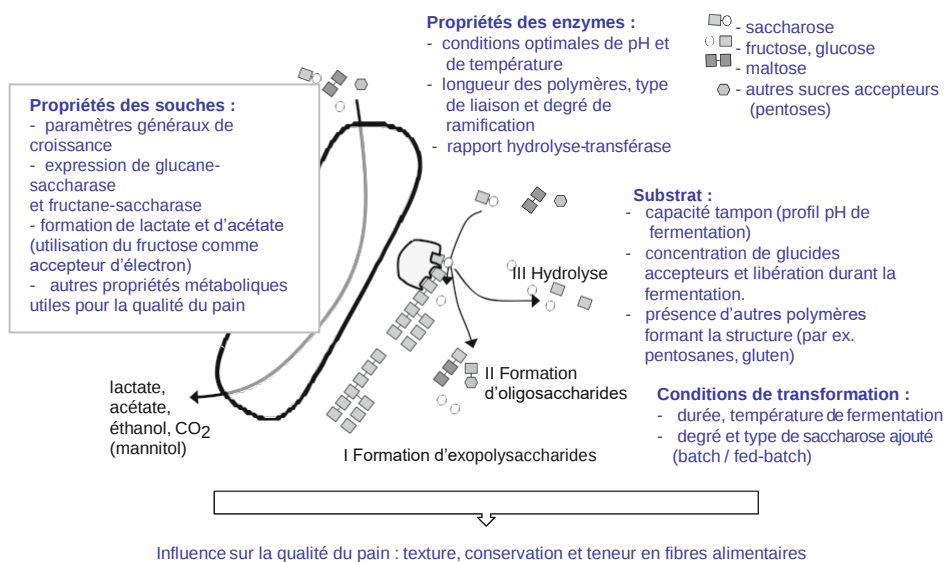
La formation d'exopolysaccharides par les bactéries lactiques durant la fermentation au levain améliore la survie des cultures et la résistance au stress, influe sur la rhéologie de la pâte et la texture du pain et permet de produire du pain doté d'une fonctionnalité nutritionnelle spécifique. Les EPS de bactéries lactiques peuvent être classées en fonction de leur composition ou de leur biosynthèse. Les EPS composés d'un seul type de monosaccharide constitutif sont appelés homopolysaccharides (HoPS). Il s'agit par exemple des lévanes, constitués de fructose, ou des dextranes, constitués de glucose. Les hétéropolysaccharides (HePS) sont composés d'au moins deux monosaccharides constitutifs. Les bactéries lactiques utilisent deux voies alternatives pour la synthèse des EPS : la synthèse intracellulaire à partir des nucléotides de sucre par les glycosyltransférases et la synthèse extracellulaire à partir de saccharose par les glucane-saccharases ou fructane-saccharases. Les EPS produits par les glucane-saccharases ou les fructane-saccharases sont invariablement des HoPS constitués respectivement de glucose et de fructose [80, 81].

Les EPS produits par glycosyltransférases intracellulaires sont principalement des HePS avec glucose, galactose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine, rhamnose ou fucose comme monosaccharides constitutifs [82-84]. Il y a des exceptions notables de HoPS produits par glycosyltransférases intracellulaires, comme un galactane de *Lc. lactis* [85] et un  $\beta$ -glucane produit par *Pediococcus parvulus* et *Oenococcus oeni* [86].

Le screening de larges collections de souches de bactéries lactiques du levain a montré que très peu d'isolats sont capables de former des HePS [39, 87-89] ; un seul rapport fait état de la formation de HePS dans le levain [90]. À l'inverse, la formation de HoPS est une caractéristique fréquente des bactéries lactiques et tout levain est susceptible de contenir au moins une souche formant des HoPS [39, 88]. En outre, la formation *in situ* des HoPS durant la fermentation au levain ainsi que l'effet des HoPS sur la qualité du pain est bien documentée ([91, 92]), pour plus de détails, voir [93] et Chap. 8). Les paragraphes suivants rappellent donc brièvement la formation des HePS pour se concentrer sur la formation et les applications des HoPS.

### 7.5.1 Biosynthèse des EPS et structure des HoPS

La formation des HePS par les bactéries lactiques passe par de grands clusters de gènes encodés sur les plasmides ou le chromosome (pour plus de détails, voir [82-84, 94]).



**Fig. 7.12** Facteurs influençant la production des exopolysaccharides sur la qualité du pain. Les glucane-saccharases catalysent trois réactions alternatives : (I) polymérisation du glucose ou fructose en exopolysaccharides, (II) transfert du glycosyl vers des glucides accepteurs pour former des oligosaccharides, (III) hydrolyse du saccharose en glucose et fructose. Les propriétés et la production des EPS dépendent également de la concentration des glucides accepteurs dérivés des substrats, de la température et du pH ambiants.

Les clusters de gènes d'EPS codent généralement pour les protéines qui régulent la biosynthèse d'EPS (EpsA chez *Streptococcus thermophilus* Sfi6), leur polymérisation, leur exportation et la détermination de la longueur de la chaîne (EpsB, EpsC et EpsD chez *S. thermophilus* Sfi6) et pour une ou plusieurs phosphore-glycosyltransférases ou glycosyltransférases (EpsE, EpsF, EpsG et EpsI chez *S. thermophilus* Sfi6). Les EPS sont synthétisés par les glycosyltransférases avec des nucléotides dérivés du glucose-6-phosphate comme substrats. L'unité récurrente du polysaccharide, composé de deux à huit monosaccharides, est assemblée par l'ajout successif de monosaccharides à l'undéca-prényl pyrophosphate, support lipidique lié à la membrane. L'unité récurrente est exportée et polymérisée à l'extérieur des cellules. La synthèse des HePS nécessite des nucléotides riches en énergie comme précurseurs et l'assemblage et l'exportation des unités récurrentes sont en concurrence avec la biosynthèse du peptidoglycane ; la production de HePS est donc assez basse, généralement bien inférieure à 1 g/L.

La synthèse des HoPS est arbitrée par des glucane-saccharases ou des fructane-saccharases extracellulaires solubles ou associées à la paroi cellulaire [80, 81]. Ces deux groupes d'enzymes sont classées parmi les glycosyl hydrolases rétentrices et utilisent le saccharose comme substrat. Les fructane-saccharases, contrairement aux glucane-saccharases, utilisent également le raffinose, le stachyose ou le verbascose comme substrats [40]. La catalyse par glucane-saccharases ou fructane-saccharases se fait respectivement par l'intermédiaire d'une glucosyl-enzyme ou d'une fructosyl-enzyme liée par covalence, ce qui induit le transfert du groupement de glycosyl vers une chaîne polymère en croissance, un glucide accepteur adapté ou l'eau (Fig. 7.12). L'hydrolyse du saccharose ou la formation d'oligosaccharides sont donc des réactions alternatives à la synthèse de polysaccharides [80, 95-97]. Le rapport entre hydrolyse de saccharose et synthèse d'oligosaccharides ou de polysaccharides dépend de la structure des enzymes ainsi que des concentrations du substrat [98, 99]. Étant donné que le mécanisme catalytique conserve l'énergie chimique de la liaison glycosidique du substrat, la synthèse de HoPS ne nécessite pas de substrats riches en énergie ou de cofacteurs. Plusieurs études récentes expliquent très clairement les relations structure-fonction des glucane-saccharases et fructane-saccharases [80, 81, 100].

Les HoPS produits à partir de saccharose sont constitués uniquement de fructose ou de glucose mais présentent néanmoins une grande diversité en termes de type de liaison ou de degré de ramification et de masse moléculaire. Le dextrane est principalement constitué de molécules de glucose liées  $\alpha$ -(1→6) avec un degré variable de liaisons  $\alpha$ -(1→3) ou  $\alpha$ -(1→2) et des points de ramification  $\alpha$ -(1→3,6). Le dextrane est produit par de nombreuses souches de *Leuconostoc* spp. et *Weissella* spp., mais il a été démontré que *Lactobacillus* spp. produit aussi du dextrane [80, 81, 88]. Le mutane est principalement constitué de groupements de glucose liés  $\alpha$ -(1→3) et est produit par *Streptococcus* spp. et *L. reuteri* [80, 81]. Les glucanes avec des liaisons  $\alpha$ -(1→6) et  $\alpha$ -(1→3) ou  $\alpha$ -(1→4) et  $\alpha$ -(1→6) en alternance sont respectivement connus sous le nom d'alternane et de reutéline. À ce jour, la formation de reutéline a été uniquement observée uniquement chez des souches de *L. reuteri* [81]. Nos connaissances actuelles sur les relations structure-fonction des glucane-saccharases permettent des modifications du type de liaison [101] ainsi que de la masse moléculaire et du degré de ramification [102].

Des informations sur les relations structure-fonction des glucane-saccharases ont aussi servi à l'identification de glucane-saccharases naturelles qui produisent des polymères dotés de propriétés intéressantes [103]. Le type de liaison des oligosaccharides formés par les glucane-saccharases correspond généralement aux types de liaison observés chez les polysaccharides correspondants [81, 97]. Par exemple, *L. reuteri* 121 produit de la reutérine liée  $\alpha$ -(1→4) et  $\alpha$ -(1→6) avec une masse moléculaire relative de  $8 \times 10^7$ ; en présence de glucose ou maltose comme glucides de base, du maltose et de l'isomaltose ou de l'isomaltotriose et du panose sont produits. Les fructanes produits par les bactéries lactiques incluent l'inuline liée avec prédominance de liaisons  $\beta$ -(2→1) et le lévane lié avec prédominance de  $\alpha$ -(2→6); ces deux polymères contiennent des points de ramification  $\beta$ -(2→1→6) [80, 81, 98, 104]. Une majorité des isolats du levain qui produisent du fructane forment des lévanes. Il est étonnant de constater que les lévane-saccharases forment de façon prédominante des fructo-oligosaccharides de type inuline et des hétéro-oligosaccharides à partir de saccharose [95, 98].

### 7.5.2 Fonction écologique de la production des HoPS et formation des HoPS dans la pâte

La fonction écologique des glucane-saccharases et fructane-saccharases pour les bactéries lactiques associées aux céréales a été reliée à la formation du biofilm, à l'utilisation de saccharose et de raffinose et à la résistance au stress. Chez les streptocoques oraux, les glucane-saccharases et fructane-saccharases sont principalement responsables de la formation du biofilm dépendant du saccharose sur l'émail dentaire et sont considérés comme des facteurs de virulence majeurs de ces organismes [105]. Tout comme la formation de biofilm par les streptocoques oraux, la colonisation et la formation de biofilm par *L. reuteri* dans les épithéliums non sécréteurs de l'intestin grêle proximal des animaux s'est avérée dépendre de la formation des HoPS. La reutérine-saccharase de *L. reuteri* TMW1.106 a joué un rôle majeur dans la formation de la matrice de biofilm extracellulaire et la lévane-saccharase dans le même organisme fonctionne comme une protéine de liaison du glucane. Ces deux enzymes sont nécessaires à la re-colonisation de souris sans lactobacilles par *L. reuteri* TMW 1.106 [106].

Les glucane-saccharases et fructane-saccharases utilisent l'un des deux monosaccharides constitutifs du saccharose pour la synthèse de polysaccharides ou d'oligosaccharides; l'autre monosaccharide, respectivement fructose et glucose, s'accumule dans le substrat de fermentation. Les lévane-saccharases libèrent également des  $\alpha$ -galactosides (mélbiose), du manninotriose et du manninotétraose respectivement à partir de raffinose, stachyose et verbascose [40]. Chez *L. sanfranciscensis* LTH2590, la lévane-saccharase est la seule enzyme capable d'hydrolyser le saccharose et le raffinose [40, 98]. Chez *L. reuteri* et *Lc. mesenteroides*, la lévane-saccharase, la glucane-saccharase et la saccharose phosphorylase constituent des voies de substitution pour le métabolisme du saccharose (et du raffinose).

Le métabolisme par les lévane-saccharases extracellulaires est la voie métabolique privilégiée pour le raffinose, le stachyose et le verbascose, vraisemblablement à cause du degré plus faible de polymérisation des  $\alpha$ -galactosides qui en résultent, ce qui facilite le transport à travers la membrane cytoplasmique [40]. L'activité des glucane-saccharases accumule invariablement le fructose et ainsi favorise la formation d'acétate par les bactéries lactiques hétérofermentaires [98]. De grandes quantités d'acétate ayant un effet néfaste sur la structure du pain au blé [107], les *Weissella* spp. qui produisent du dextrane et ne convertissent pas le fructose en mannitol avec formation concomitante d'acétate se sont avérées plus efficaces en boulangerie que *L. reuteri* ou *L. sanfranciscensis* [91, 92, 108].

La contribution de la formation des HoPS à la résistance au stress des bactéries lactiques a été particulièrement démontrée pour *L. reuteri*. Les HoPS ou fructo-oligosaccharides augmentent alors la survie en milieu acide durant la phase stationnaire [103] et améliorent la survie des *L. reuteri* lyophilisées durant le stockage [109]. Les effets protecteurs des lévanes et des fructo-oligosaccharides sont en partie imputables à leur interaction spécifique avec les phospholipides des membranes biologiques [109, 110]. Mais ces effets protecteurs ne se limitent pas aux lévanes et aux fructo-oligosaccharides ; le dextrane et le  $\beta$ -glucane ont aussi renforcé la résistance aux acides et la survie en phase stationnaire [86, 111].

Les bactéries lactiques qui produisent des HoPS à partir de saccharose en laboratoire produisent généralement aussi des HoPS durant leur croissance dans le levain [39]. La concentration des HoPS est généralement comprise entre 1 et 8 g/kg de pâte [39, 91, 92, 98, 112] et peut dépasser 10 g/kg dans des conditions de fermentation optimisées et avec un pH contrôlé [113]. Les glucane-saccharases et fructane-saccharases étant des enzymes extracellulaires, leur activité est régie par les conditions ambiantes plutôt que par le pH intracellulaire et les concentrations du substrat (Fig. 7.12). Le pH optimal des lévane-saccharases et glucane-saccharases des lactobacilles du levain est compris entre 4,5 et 5,5, ce qui correspond au pH de la fermentation au levain [98, 99]. La production de HoPS dans le levain a été augmentée lorsque le pH des fermentations était maintenu à 4,7 [113]. Le saccharose servant à la fois de donneur et d'accepteur de radical glycosyl durant la formation des HoPS, la concentration de saccharose joue un rôle décisif dans le ratio entre hydrolyse du saccharose et formation des oligosaccharides et polysaccharides. En dessous de 10 g/kg de saccharose, l'hydrolyse de saccharose est la réaction prédominante [98, 114]. La hausse des concentrations de saccharose augmente dans un premier temps la formation de lévanes par hydrolyse. Lorsque la concentration de saccharose continue à augmenter, le saccharose agit de plus en plus comme accepteur de glycosyl et la réaction prédominante est la formation d'oligosaccharides, catalysée par les glucane-saccharases et les fructane-saccharases [98, 114, 115]. Durant une fermentation avec 100 g/kg de saccharose, *L. sanfranciscensis* LTH2590 a produit 11 g/kg de fructo-oligosaccharides, mais seulement 5 g/kg de lévanes [98]. Une production élevée de reutéline par *L. reuteri* TMW1.106 a été obtenue dans des levains en continu avec contrôle du pH et une concentration de saccharose constante de 10 % tout au long de la fermentation [113]. L'ajout de glucides accepteurs autres que le saccharose influence également la production de HoPS dans les fermentations du levain.

Le maltose est un accepteur plus puissant pour les glucane-saccharases que le glucose [97, 115]. La production de dextrane dans les levains au blé, caractérisés par de fortes concentrations en maltose tout au long de la fermentation, était sensiblement plus basse par rapport à la production par les mêmes souches dans des levains de sorgho, caractérisés par de faibles concentrations de maltose et de fortes concentrations de glucose [15]. Le maltose, le xylose et l'arabinose agissent également comme glucides accepteurs alternatifs pour l'activité des lévane-saccharases [95, 96].

Des cultures starters pour levain produisant des exopolysaccharides ont un intérêt industriel pour améliorer la texture du pain [116]. Outre la fonction d'hydrocolloïdes que remplissent les HoPS en boulangerie, certains HoPS semblent prévenir l'adhésion pathogène aux cellules eucaryotiques [117] et avoir une activité prébiotique [92, 118]. Les bactéries lactiques qui produisent des HoPS permettent donc de formuler des produits de boulangerie qui présentent des avantages spécifiques pour la santé des consommateurs.

## 7.6 Composés antimicrobiens issus des bactéries lactiques du levain

Les produits de boulangerie à pâte levée peuvent être contaminés par des spores du genre *Bacillus*, qui survivent à la cuisson, par des levures, principalement des genres *Pichia* et *Zygosaccharomyces*, qui colonisent la surface et altèrent les propriétés sensorielles et, surtout, par des moisissures appartenant essentiellement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*, qui altèrent la couleur et les propriétés sensorielles et, dans certains cas, synthétisent des mycotoxines. Plus de quarante espèces de moisissures ont été décrites comme contaminants de produits de boulangerie. Bien que des conservateurs chimiques (par ex. sorbate et propionate, éthanol) soient fréquemment utilisés pour prévenir la contamination des produits de boulangerie à pâte levée, les bactéries lactiques du levain présentent un certain nombre de caractéristiques bio-conservatrices naturelles qui complètent les conservateurs chimiques, voire peuvent les remplacer. Les composés antimicrobiens des bactéries lactiques du levain ont aussi un impact sur le microbiote du levain et contribuent à la stabilité de certaines souches.

L'activité inhibitrice des bactéries lactiques du levain est généralement imputable à la consommation rapide de l'oxygène et des glucides fermentescibles et à la formation de lactate avec baisse concomitante du pH. D'autres métabolites présentent une activité antimicrobienne spécifique, comme le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, l'acétate et d'autres acides gras à chaîne courte et la reutéline. La formation d'acétate par des lactobacilles hétérofermentaires dans le levain est directement modulable par l'ajout de saccharose ou de pentoses [39] et contribue à la prolongation de la conservation du pain (voir ci-après). Le seuil olfactif du diacétyl, du butyrate et du caproate est sensiblement plus bas que les concentrations nécessaires pour une activité antimicrobienne ; ces composés ne peuvent donc pas être accumulés dans le pain sans effet négatif sur les qualités sensorielles du pain. Bien que certaines bactéries lactiques du levain soient capables de synthétiser la reutéline, la formation de reutéline n'a pas pu être obtenue dans les fermentations à base de céréales [119].

### 7.6.1 Composés antifongiques issus des bactéries lactiques du levain

Les composés antifongiques synthétisés par les bactéries lactiques sont le diacétyl, le peroxyde d'hydrogène, l'acétate, le propionate, le caproate, les acides gras trihydroxylés, le phényllactate, les dipeptides cycliques, la reutérine et les peptides fongicides [120]. De nombreux rapports font état d'une amélioration sensible de la conservation du pain en l'absence de moisissure due à l'activité antifongique des bactéries lactiques du levain [121, 122]. Toutefois, les métabolites des bactéries lactiques responsables de l'effet antifongique restent inconnus dans la plupart des cas. L'acétate inhibe la croissance fongique mais les concentrations requises affectent sensiblement les qualités sensorielles et la texture du pain [30, 107, 123]. Le phényllactate et le 4-hydroxyphényllactate ont d'abord été caractérisés comme métabolites antifongiques de *L. plantarum* ITM21B [124]. Les lactobacilles capables de produire du phényllactate et de l'hydroxyphényllactate ont retardé la croissance d'*Aspergillus niger* et *Penicillium roqueforti* jusqu'à sept jours de conservation du pain [125]. La concentration de phényllactate accumulé par les lactobacilles durant la fermentation au levain est cependant cent fois moins élevée que sa concentration minimale inhibitrice (CMI) [74, 126], ce qui signifie que l'effet antifongique du levain ne peut être imputé à l'accumulation du phényllactate. De même, les niveaux de dipeptides cycliques antifongiques dans le pain sont mille fois plus bas que leur CMI, mais plus élevés que le seuil qui engendre un goût métallique et amer [127]. L'effet antifongique des bactéries lactiques du levain est donc attribué à une activité synergique de plusieurs composés. L'effet antifongique de *L. reuteri*, *L. plantarum* et *L. brevis* en présence de propionate de calcium (0,2 %, w/w) [128] a retardé la croissance fongique de huit jours par rapport à du pain produit uniquement à partir de levure de boulangerie. Selon une hypothèse, cet effet était imputable à une activité synergique entre l'acide acétique et le phényllactate avec des conservateurs chimiques. L'action antifongique de *L. buchneri* et *L. diolivorans* dans le pain a été attribuée à une combinaison d'acétate et de propionate [30]. L'effet conservateur de *L. amylovorus* [121, 122] a été attribué à l'activité synergique de plus de dix composés antifongiques, dont le phényllactate, des acides phénoliques, des acides gras et des dipeptides cycliques [129].

Outre les métabolites antifongiques des bactéries lactiques, les peptides inhibiteurs dérivés du substrat pourraient aussi contribuer à la conservation du pain. Un extrait aqueux d'haricots associé à un levain fermenté par *L. brevis* AM7 contenait trois composés inhibiteurs naturels, deux phaséolines (NCBI n. gi 130169, gi 403594) et une lectine (NCBI n. gi 130007) [130]. Des peptides antifongiques ont aussi été identifiés dans l'extrait aqueux du levain. L'activité combinée de tous ces composés a retardé la croissance fongique de vingt-et-un jours, ce qui correspond à une durée de conservation du pain comparable à celle observée avec l'utilisation de propionate de calcium (0,3 % w/w). L'utilisation de bactéries lactiques du levain et de farine d'amarante ou de germe de blé a également permis d'obtenir une très longue durée de conservation [131, 132].

Le levain fermenté par la levure non conventionnelle *Wickerhamomices anomalus* LCF1695 et *L. plantarum* a présenté une forte activité antifongique due aux activités synergiques entre les peptides inhibiteurs libérés par *L. plantarum* et l'acétate d'éthyle produit par *W. anomalus* [133]. La contamination fongique a été retardée de vingt-huit jours dans un fournil pilote.

Même si de réelles avancées ont été obtenues en matière de fabrication et de stockage des produits de boulangerie, la contamination fongique reste l'un des principaux obstacles à leur conservation prolongée. À cet égard, la recherche de nouvelles méthodes de bio-conservation semble être l'une des voies les plus prometteuses, même si une combinaison de divers composés inhibiteurs semble incontournable pour étendre sensiblement la durée de conservation des produits de boulangerie à pâte levée.

### 7.6.2 Composés antibactériens issus des bactéries lactiques du levain

Les métabolites antibactériens issus des bactéries lactiques englobent la reutérine et les acides organiques précités. Toutefois, la recherche sur les activités antibactériennes s'est concentrée sur les bactériocines, les peptides synthétisés au niveau des ribosomes avec une activité antibactérienne contre les organismes étroitement liés et la reutéricycline. Pour prévenir l'altération du pain par les bacilles responsables du pain filant, il n'est pas nécessaire de sélectionner des cultures protectrices spécifiques. La croissance des endospores de *Bacillus* spp. est rapidement inhibée par une acidification modérée comme celle qui caractérise le pain au levain [134-136]. L'acétate et le propionate sont plus efficaces contre les bacilles responsables du pain filant que l'acide lactique [134]. Les bactériocines nisine et pédiocine, qu'il s'agisse d'additifs ou qu'elles soient produites *in situ* par des bactéries lactiques, se sont avérées étonnamment inefficaces [134].

La formation de bactériocines par les bactéries lactiques du levain a été décrite en particulier pour les souches de *L. sakei*, *L. plantarum* et *L. amylovorus* (pour une analyse détaillée, voir [137, 138]). Les bactériocines ne semblent pas à même de prolonger la durée de conservation du pain, mais leur formation durant la fermentation au levain s'est avérée favoriser la stabilité du microbiote du levain. *Lactococcus lactis* M30, une souche qui produit la lacticine 3147 [139], a généré une bactériocine durant la fermentation. Son activité inhibitrice a résisté au milieu acide du levain et à des traitements thermiques équivalents aux températures de cuisson. De même, la souche *L. amylovorus* DCE471 qui produit des bactériocines a persisté pendant une longue durée durant les phases de propagation du levain [140]. La compétitivité de *L. pentosus* 2MF8, qui a synthétisé une substance inhibitrice comparable aux bactériocines [141], et de *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30, qui a synthétisé la lacticine 3147 [139], a été étudiée durant la fermentation au levain. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* M30 a présenté un spectre plus large en termes d'inhibition que *L. pentosus* 2MF8, sans pour autant inhiber la croissance de *L. sanfranciscensis*. Dans ce levain rafraîchi pendant vingt jours, la persistance de *Lc. lactis* subsp. *lactis* M30 a inhibé la souche indicatrice *L. plantarum* 20 sans interférer dans la croissance de *L. sanfranciscensis* CB1.

Ces caractéristiques des bactériocines, associées à une activité inhibitrice *in situ* démontrée, encouragent l'utilisation de composés antimicrobiens pour favoriser l'implantation et la persistance de starters et le contrôle des interactions microbiennes qui ont lieu durant la fermentation au levain.

La reutéricycline est un acide dérivatif tétramique qui présente un large spectre d'activités contre les bactéries à Gram positif, y compris les bacilles responsables du pain filant [142, 143]. À ce jour, toutes les souches qui produisent de la reutéricycline ont été isolées d'un levain de seigle industriel. La reutéricycline est produite en concentrations actives dans le levain et la persistance de souches de *L. reuteri* durant la fermentation à long terme d'un levain de seigle a été imputée à la synthèse de reutéricycline (pour une analyse détaillée, voir [144]). L'utilisation de souches de *L. reuteri* qui produisent de la reutéricycline comme starter du levain a également ralenti la croissance de *Bacillus* sp. durant le stockage du pain [144].

**Les deux sections suivantes ne sont pas traduites : se reporter à la version originale. Elles concernent (i) le métabolisme des composés phénoliques et lipidiques et (ii) la communication intercellulaire entre microorganismes.**

## Références

1. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:57–69
2. Gobbetti M (1998) The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Trends Food Sci Technol* 9:267–274
3. Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel RF (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol* 24:128–138
4. Hammes WP, Gänzle MG, Hammes WP, Gänzle MG (1998) Sourdough bread and related products. In: Wood BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*, vol 199. Blackie Academic and Professional, London
5. Ehrmann MA, Vogel RF (2005) Molecular taxonomy and genetics of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:31–42
6. De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol* 16:43–56
7. Vogel RF, Knorr R, Müller MRA, Steudel U, Gänzle MG, Ehrmann MA, Vogel RF, Knorr R, Müller MRA, Steudel U, Gänzle MG, Ehrmann MA (1999) Non-dairy lactic fermentations. *The cereal world*. Antonie van Leeuwenhoek 76:403–411
8. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR- denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475–482
9. Gänzle MG, Ehmman MA, Hammes WP (1998) Modelling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of the sourdough fermentation. *Appl Environ Microbiol* 64:2616–2623
10. Wolfrum G (2003) Wachstum und Physiologie der Mikroflora in Getreidefermentationen. Dissertation, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
11. 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 fermentation. *Appl Environ Microbiol* 68:1431–1435
12. Passos FV, Fleming HP, Ollis DF, Felder RM, McFeeters RF (1994) Kinetics and modeling

- of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol 60:2627–2636
13. Hammes WP, Vogel RF (1995) The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH (eds) The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, p 19
14. Vrancken G, Rimaux T, De Vuyst L, Leroy F (2008) Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. Int J Food Microbiol 128:58–66
15. Galle S, Schwab C, Arendt E, Gänzle M (2010) Exopolysaccharide forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. J Agric Food Chem 58:5834–5841
16. Korakli M, Vogel RF (2003) Purification and characterization of mannitol dehydrogenase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. FEMS Microbiol Lett 220:281–286
17. Liu SQ (2003) Practical implication of lactose and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentation. Int J Food Microbiol 83:115–131
18. De Angelis M, Gobbetti M (1999) *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: manganese, oxygen, superoxide dismutase and metabolism. Appl Microbiol Biotechnol 51:358–363
19. De Angelis M, Gobbetti M (2004) Environmental stress response in *Lactobacillus*: a review. Proteomics 4:106–122
20. Zhang C, Gänzle MG (2010) Metabolic pathway of  $\alpha$ -ketoglutarate in *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Lactobacillus reuteri* during sourdough fermentation. J Appl Microbiol 109:1301–1310
21. Vermeulen N, Czerny M, Gänzle MG, Schieberle P, Vogel RF (2007) Reduction of (E)-2-nonenal and (E, E)-2,4-decadienal during sourdough fermentation. J Cereal Sci 45:78–87
22. Vermeulen N, Kretzer J, Machalitz H, Vogel RF, Gänzle MG (2006) Influence of redox-reactions catalysed by homo- and heterofermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. J Cereal Sci 43:137–143
23. Ferain T, Schanck AN, Delcour J (1996) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an ldhL-ldhD double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol 178:7311–7315
24. Hansen Å, Schieberle P (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. Trends Food Sci Technol 16:85–94
25. Damiani P, Gobbetti M, Cossignani L, Corsetti A, Simonetti MS, Rossi J (1996) The sourdough microflora. Characterization of hetero- and homofermentative lactic acid bacteria, yeast and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. Z Lebensm Wiss Technol 29:63–70
26. Stolz P, Böcker G, Hammes WP, Vogel RF (1995) Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough I *Lactobacillus sanfrancisco*. Z Lebensm Unters Forsch 201:91–96
27. Gobbetti M, Corsetti A (1996) Co-metabolism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 citrate-negative strain: effect on growth, end-products and sourdough fermentation. Z Lebensm Unters Forsch 203:82–87
28. Sekwati-Monang B, Gänzle M (2011) Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. Int J Food Microbiol 150:115–121
29. Oude Elferink SJWH, Krooneman J, Gottschal JC, Spoelstra SF, Faber F, Driehuis F (2001) Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Appl Environ Microbiol 67:125–132
30. Zhang C, Brandt MJ, Schwab C, Gänzle MG (2010) Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. Food Microbiol 27:390–395
31. Titgemeyer F, Hillen W (2002) Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. Antonie Van Leeuwenhoek 82:59–71
32. Leroy F, De Winter T, Adriany T, Neysens P, De Vuyst L (2006) Sugars relevant for sourdough fermentation stimulate growth of and bacteriocin production by *Lactobacillus amylo- vorus* DCE 471. Int J Food Microbiol 112:102–111
33. Paramithiotis S, Sofou A, Tskalidou E, Kalantzopulos G (2007) Flour carbohydrate catabolism and metabolite production by sourdough lactic acid bacteria. World J Microbiol Biotechnol 23:1417–1423
34. Stolz P, Böcker G, Vogel RF, Hammes WP (1993) Utilization of maltose and glucose by

- lactobacilli isolated from sourdough. FEMS Microbiol Lett 109:237–242
35. Schwab C, Walter J, Tannock GW, Vogel RF, Gänzle MG (2007) Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. Syst Appl Microbiol 30:433–443
36. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J (1994) The sourdough microflora. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. Appl Microbiol Biotechnol 41:456–460
37. Neubauer H, Glaesker E, Hammes WP, Poolman B, Konings WN (1994) Mechanisms of maltose uptake and glucose excretion in *Lactobacillus sanfrancisco*. J Bacteriol 176:3007–3012
38. De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Messens W (2002) The biodiversity of lactic acid bacteria in greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. Appl Environ Microbiol 68:6059–6069
39. Tiekling M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2003) In situ production of EPS by intestinal and cereal isolates of lactic acid bacteria during sourdough fermentation. Appl Environ Microbiol 69:945–952
40. Teixeira JS, McNeill V, Gänzle MG (2012) Levansucrase and sucrose phosphorylase contribute to raffinose, stachyose, and verbascose metabolism by lactobacilli. Food Microbiol 31:278–284
41. De Angelis M, Gallo G, Settanni L, Corbo MR, McSweeney PLH, Gobbetti M (2005) Purification and characterization of an intracellular family 3  $\beta$ -glucosidase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Ital J Food Sci 17:131–142
42. Gobbetti M, Lavermicocca P, Minervini F, De Angelis M, Corsetti A (2000) Arabinose fermentation by *Lactobacillus plantarum* in sourdough with added pentosans and  $\alpha$ -L-arabino-funariosidase: a tool to increase the production of acetic acid. J Appl Microbiol 88:317–324
43. Gobbetti M, De Angelis M, Arnault P, Tossut P, Corsetti A, Lavermicocca P (1999) Added pentosans in breadmaking: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiol 16:409–418
44. Kunji ER, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 70:187–221
45. Guédon E, Renault P, Ehrlich SD, 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. J Bacteriol 183:3614–3622
46. Vermeulen N, Pavlovic M, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2005) Functional characterization of the proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T during growth in sourdough. Appl Environ Microbiol 71:6260–6266
47. Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel RF (2007) Effect of different *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. Eur Food Res Technol 226:14
48. Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. Cereal Chem 79:45–51
49. Loponen J, Mikola M, Katina K, Sontag-Strohm T, Salovaara H (2004) Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentation. Cereal Chem 81:87–93
50. Gänzle MG, Loponen J, Gobbetti M (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. Trends Food Sci Technol 19:513–521
51. Gobbetti M, Smacchi E, Corsetti A (1996) The proteolytic system of *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an amino-peptidase. Appl Environ Microbiol 62:3220–3226
52. 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. Appl Environ Microbiol 68:623–633
53. Pepe O, Villani F, Oliviero D, Greco T, Coppola S (2003) Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. Int J Food Microbiol 84:319–326
54. Gallo G, De Angelis M, McSweeney PLH, Corbo MR, Gobbetti M (2005) Partial

- purification and characterization of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactobacillus sanfranci- scensis* CB1. Food Chem 9:535–544
55. Hu Y, Stromeck A, Loponen J, Lopes-Lutz D, Schieber A, Gänzle MG (2011) LC-MS/MS quantification of bioactive antitensin I-converting enzyme inhibitory peptides in rye malt sourdoughs. J Agric Food Chem 59:11983–11989
56. Jansch A, Korakli M, Vogel RF, Gänzle MG (2007) Glutathione reductase from *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T: contribution to oxygen tolerance and thiol-exchange reactions in wheat sourdoughs. Appl Environ Microbiol 73:4469–4476
57. Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. Appl Environ Microbiol 78:1087–1096
58. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. Appl Environ Microbiol 73:4499–4507
59. Di Cagno R, Barbato M, Di Camillo C, Rizzello CG, De Angelis M, Giuliani G, De Vincenzi M, Gobbetti M, Cucchiera S (2010) Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. J Ped Gastroent Nutr 51:777–783
60. Greco L, Gobbetti M, Auricchio R, Di Mase R, Landolfo F, Paparo F, Di Cagno R, De Angelis M, Rizzello CG, Cassone A, Terrone G, Timpone L, D’Aniello M, Maglio M, Troncone R, Auricchio S (2011) Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. Clin Gastroenterol Pathol 9:24–29
61. De Angelis M, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, Di Cagno R, Francavilla R, Gobbetti M (2010) Gluten-free pasta made of *Triticum turgidum* L. var. *durum*: mechanisms of epitopes hydrolysis by peptidases of sourdough lactobacilli. Appl Environ Microbiol 75:50–518
62. De Angelis M, Di Cagno R, Gallo G, Curci M, Siragusa S, Crecchio C, Parente E, Gobbetti M (2007) Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. Int J Food Microbiol 114:69–82
63. Christensen JF, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 76:217–246
64. Su MSW, Schlicht S, Gänzle MG (2011) Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. Microb Cell Factories 10(suppl1):S8
65. Fernandez M, Zuniga M (2006) Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. Crit Rev Microbiol 32:155–183
66. Kieronczyk A, Skeie S, Olsen K, Langsrud T (2001) Metabolism of amino acids by resting cells of non-starter lactobacilli in relation to flavour development in cheese. Int Dairy J 11:217–224
67. Tonon T, Bourdineaud JP, Lonvaud-Funel A (2001) The arcABC gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. Res Microbiol 152:653–661
68. Hammes WP, Hertel C (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes 4:320–403
69. De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollàn G, Gobbetti M (2002) Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: Purification and characterization of the arginine deiminase (ADI) pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. Appl Environ Microbiol 68:6193–6201
70. 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 Microbiol 26:720–727
71. Vermeulen N, Gänzle MG, Vogel RF (2007) Glutamine deamidation by cereal-associated lactic acid bacteria. J Appl Microbiol 103:1197–1205
72. Weingand-Ziadé A, Gerber-Dé Combay C, Affolter M (2003) Functional characterization of a salt- and thermotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus*. Enzyme Microb Technol 32:862–867
73. Tanous C, Kieronczyk A, Helinck S, Chambellon E, Yvon M (2002) Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid

- bacteria strains. Antonie Van Leeuwenhoek 82:271–278
74. Vermeulen N, Gänzle MG, Vogel RF (2006) Influence of peptide supply and co-substrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.468. J Agric Food Chem 54:3832–3839
75. Coda R, Rizzello CG, Gobbetti M (2010) Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). Int J Food Microbiol 37:236–245
76. Stromeck A, Hu Y, Chen L, Gänzle MG (2011) Proteolysis and bioconversion of cereal proteins to glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate in rye malt sourdoughs. J Agric Food Chem 59:1392–1399
77. Serrazanetti DI, Ndagijimana M, Sado-Kamdem SL, Corsetti A, Vogel RF, Ehrmann M, Guerzoni ME (2011) Acid-stress mediated metabolic shift in *Lactobacillus sanfranciscensis* LSCE1. Appl Environ Microbiol 77:2659–2666
78. Curtin AC, De Angelis M, Cipriani M, Corbo MR, McSweeney PLH, Gobbetti M (2001) Amino acid catabolism in cheese-related bacteria: selection and study of the effects of pH, temperature and NaCl by quadratic response surface methodology. J Appl Microbiol 91:312–321
79. De Angelis M, Curtin AC, McSweeney PLH, Faccia M, Gobbetti M (2002) *Lactobacillus reuteri* DSM 20016: purification and characterization of a cystathionine  $\gamma$ -lyase and use as adjunct starter in cheese-making. J Dairy Res 69:255–267
80. Korakli M, Vogel RF (2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycosyltransferases and therapeutic potential of their synthesised glycans. Appl Microbiol Biotechnol 71:790–803
81. van Hijum SAFT, Kralj S, Ozimek LK, Kijkhuizen L, van Geel-Schutten IGH (2006) Structure-function relationships of glucosyltransferase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. Microbiol Molec Biol Rev 70:157–176
82. de Vuyst L, de Vin F, Vaningelem F, Degeest B (2001) Recent development in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int Dairy J 11:687–708
83. Boels IC, van Kranenburg R, Hugenholtz J, Kleerebezem M, de Vos WM (2001) Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. Int Dairy J 11:723–732
84. Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ, Moineau S (2003) Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production from *Streptococcus thermophilus*: a review. J Dairy Sci 86:407–423
85. Gruter M, Leeflang BR, Kuiper J, Kamerling JP, Vliegenthart JF (1992) Structure of the exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* H414 grown in a defined medium or skimmed milk. Carbohydr Res 231:273–291
86. Dols-Lafargue M, Lee HY, le Marrec C, Heyraud A, Chambat GP, Lonvaud-Funel A (2008) Characterization of *gtf*, a glucosyltransferase gene in the genomes of *Pediococcus parvulus* and *Oenococcus oeni*, two bacterial species commonly found in wine. Appl Environ Microbiol 74:4079–4090
87. Van der Meulen R, Grosu-Tudor S, Mozzi F, Vaningelgem F, Zamfir M, Font de Valdez G, De Vuyst L (2007) Screening of lactic acid bacteria isolates from dairy and cereal products for exopolysaccharide production and genes involved. Int J Food Microbiol 118:250–258
88. Bunaix 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. J Agric Food Chem 57:10889–10897
89. Palomba S, Cavella S, Torrieri E, Piccolo A, Mazzei P, Blaiotta G, Ventorino V, Pepe O (2012) Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. Appl Environ Microbiol 78:2737–2747
90. Galle S, Schwab C, Arendt EK, Gänzle MG (2011) Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. Food Microbiol 28:547–553
91. Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Minervini F, Carnevali P, Corsetti A, Gänzle M, Ciati R, Gobbetti M (2006) Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria*

- and *Lactobacillus plantarum* and their effect on bread texture. J Agric Food Chem 54:9873–9881
92. Schwab C, Mastrangelo M, Corsetti A, Gänzle MG (2008) Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10 M in sorghum sourdoughs. Cereal Chem 85:679–684
93. Galle S, Arendt EK Exopolysaccharides from sourdough lactic acid bacteria. A review. Crit Rev Food Sci Nutr (in press)
94. Jolly L, Stingle F (2001) Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. Int Dairy J 11:733–746
95. Tieking M, Kühnl W, Gänzle MG (2005) Evidence for formation of heterooligosaccharides by *Lactobacillus sanfranciscensis* during growth in wheat sourdough. J Agric Food Chem 53:2456–2461
96. Beine R, Moraru R, Nimtz M, Na'amineh S, Pawlowski A, Buchholz K, Seibel J (2008) Synthesis of novel fructooligosaccharides by substrate and enzyme engineering. J Biotechnol 138:33–41
97. Dols M, Remaud Simeon M, Willemot R-M, Vignon MR, Monsan PF (1998) Structural characterization of the maltose acceptor-products synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. Carbohydr Res 305:549–559
98. Tieking M, Ehrmann MA, Vogel RF, Gänzle MG (2005) Molecular and functional characterization of a levansucrase from *Lactobacillus sanfranciscensis*. Appl Microbiol Biotechnol 66:655–663
99. Kralj S, Stripling E, Sanders P, van Geel-Schutten GH, Dijkhuizen L (2005) Highly hydrolytic reuteransucrase from probiotic *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730. Appl Environ Microbiol 71:3942–3950
100. Seibel J, Buchholz K (2010) Tools in oligosaccharide synthesis: current research an application. Adv Carbohydr Chem Biochem 63:101–138
101. Kralj S, van Leeuwen SS, Valk V, Eeuwema W, Kamerling JP, Dijkhuizen L (2008) Hybrid reuteransucrase enzymes reveal regions important for glucosidic linkage specificity and the transglucosylation/hydrolysis ratio. FEBS J 275:6002–6010
102. Irague R, Rolland-Sabaté A, Laurence Tarpus L, Doublier JLO, Moulis C, Monsan P, Remeaud-Siméon M, Potocki-Véronèse G, Buléon A (2011) Structure and property engineering of α-D-glucans synthesized by dextranucrase mutants. Biomacromolecules 13:187–195
103. Kaditzki SJ, Behr J, Stocker A, Kaden P, Gänzle MG, Vogel RF (2008) Influence of pH on the formation of glucan by *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 exerting a protective function against extreme pH values. Food Biotechnol 22:398–418
104. Anwar MA, Kralj S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2008) The probiotic *Lactobacillus johnsonii* NCC533 produces high-molecular-mass inulin from sucrose by using an inulosucrase enzyme. Appl Environ Microbiol 74:3426–3433
105. Cvitkovitch DG, LI YH, Ellen RP (2003) Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. J Clin Invest 112:1626–1632
106. Walter J, Schwab C, Loach DM, Gänzle MG, Tannock GW (2008) Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. Microbiology 154:72–80
107. Kaditzky S, Seitter M, Hertel C, Vogel RF (2008) Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. Eur Food Res Technol 227:433–442
108. Galle S, Schwab C, Dal Bello F, Coffey A, Gänzle M, Arendt E (2012) Influence of in situ synthesised exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. Int J Food Microbiol 155:105–112
109. Schwab C, Vogel RF, Gänzle MG (2007) Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying. Cryobiology 55:108–114
110. Vereyken IJ, Chupin V, Demel RA, Smeekens SCM, De Kruijff B (2003) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. Biochim Biophys Acta 1510:307–320
111. Kim D-S, Thomas S, Fogler HS (2000) Effects of pH and trace minerals on long-term

- starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl Environ Microbiol 66:976–981
112. Katina K, Maina NH, Juvonen R, Flander F, Johansson L, Virkki L, Genkanen M, Laitila A (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. Food Microbiol 26:734–743
113. Kaditzky S, Vogel RF (2008) Optimization of exopolysaccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli. Eur Food Res Technol 228:291–299
114. Waldherr FW, Meissner D, Vogel RF (2008) Genetic and functional characterization of *Lactobacillus panis* levansucrase. Arch Microbiol 190:497–505
115. Rodrigues S, Lona LMF, Franco TT (2005) The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. Bioprocess Biosyst Eng 28:9–14
116. Decock P, Capelle S (2005) Bread Technology and sourdough technology. Trends Food Sci 16:113–120
117. Wang Y, Gänzle MG, Schwab C (2010) EPS synthesized by *Lactobacillus reuteri* decreases binding ability of enterotoxigenic *Escherichia coli* to porcine erythrocytes. Appl Environ Microbiol 76:4863–4866
118. Bello FD, Walter J, Hertel C, Hammes WP (2001) In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. Syst Appl Microbiol 24:232–237
119. Gänzle MG, Zhang C, Sekwati-Monang B, Lee V, Schwab C (2009) Novel metabolites from cereal-associated lactobacilli – Novel functionalities for cereal products? Food Microbiol 26:712–719
120. Schnürer J, Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as preservatives. Trends Food Sci Technol 16:70–78
121. Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Ström K, Sjörgen J, van Sinderen D, Schnürer J, Arendt EK (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST1.7. J Cereal Sci 45:209–218
122. Ryan LAM, Dal Bello F, Arendt EK (2008) The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. Int J Food Microbiol 125:274–278
123. Drews E (1959) Der Einfluß gesteigerter Essigsäurebildung auf die Haltbarkeit des Schrotbrotes. Brot Gebäck 13:113–114
124. 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. Appl Environ Microbiol 66:4084–4090
125. Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A (2003) Antifungal activity of phenyllactic acid against moulds isolated from bakery products. Appl Environ Microbiol 69:634–640
126. Ryan LAM, Dal Bello F, Czerny M, Koehler P, Arendt EK (2009) Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography – mass spectrometry. J Agric Food Chem 57:1060–1064
127. Ryan LAM, Dal Bello F, Arendt EK, Koehler P (2009) Detection and quantitation of 2,5-diketopeperazines in wheat sourdough bread. J Agric Food Chem 57:9563–9568
128. Gerez CL, Torino MI, Rollán G, de Valdez GF (2009) Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control 20:144–148
129. Ryan LAM, Zannini E, Dal Bello F, Pawloska A, Koehler P, Arendt EK (2011) *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. Int J Food Microbiol 146:276–283
130. Coda R, Rizzello CG, Nigro F, De Angelis M, Arnault P, Gobbetti M (2008) Long-term fungal inhibitory Activity of water-soluble extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and sourdough lactic acid bacteria during bread storage. Appl Environ Microbiol 74:7391–7398
131. Rizzello CG, Cassone A, Coda R, Gobbetti M (2011) Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. Food Chem 127:952–959
132. Rizzello CG, Coda R, De Angelis M, Di Cagno R, Carnevali P, Gobbetti M (2009) Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. Int J Food Microbiol 131:189–196
133. Coda R, Cassone A, Rizzello CG, Nionelli L, Cardinali G, Gobbetti M (2011) Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of

- wheat bread. Appl Environ Microbiol 77:3484–3492
134. Rosenquist H, Hansen A (1998) The antimicrobial effect of organic acids, sour dough and nisin against *Bacillus subtilis* and *B. Licheniformis* isolated from wheat bread. J Appl Microbiol 85:621–631
135. Katina K, Sauri M, Alakomi H-L, Mattila-Sandholm T (2002) Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. Lebensm Wiss u-Technol 35:38–45
136. Pepe O, Blaiotta G, Moschetti G, Greco T, Villani F (2003) Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 69:2321–2329
137. Messens W, De Vuyst L (2002) Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. Int J Food Microbiol 72:31–43
138. Settanni L, Corsetti A (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. Int J Food Microbiol 121:123–138
139. Hartnett DJ, Vaughan A, van Sinderen D (2002) Antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from raw barley and sorghum. J Inst Brew 108:169–177
140. Leroy F, De Winter T, Foulquié Moreno MR, De Vuyst L (2007) The bacteriocin producer *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is a competitive starter culture for type II sourdough fermentations. J Sci Food Agric 87:1726–1736
141. Corsetti A, Settanni L, Van Sinderen D (2004) Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity. J Appl Microbiol 96:521–534
142. Gänzle MG, Höltzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP (2000) Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. Appl Environ Microbiol 66:4325–4333
143. Hurdle JG, Heathcott AE, Yan B, Lee RE (2011) Reutericyclin and related analogues kill stationary phase *Clostridium difficile* at achievable colonic concentrations. J Antimicrob Chemother 66:1773–1776
144. Gänzle MG (2004) Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential application. Appl Microbiol Biotechnol 64:326–332

## Chapitre 8

# Le levain : un outil pour améliorer la structure du pain

Sandra Galle

### 8.1 Introduction

La qualité du pain est caractérisée par son goût, sa valeur nutritionnelle, sa texture et sa durée de conservation [1]. En boulangerie, ces caractéristiques sont optimisées à l'aide d'améliorants de panification ou d'enzymes. L'ajout de levain a aussi un impact sur tous les aspects de la qualité du pain et répond à la demande du consommateur qui souhaite moins d'additifs. Le levain étant un produit intermédiaire et non un produit fini, l'activité microbiologique doit être déterminée à partir de l'impact sur la qualité du pain. Les changements biochimiques durant la fermentation au levain concernent les composants protéiques et glucidiques de la farine. La vitesse et l'étendue de ces changements influent sensiblement sur les propriétés du levain et donc sur la qualité de la pâte et la structure du pain. Les effets sont associés aux métabolites produits par les bactéries lactiques et les levures durant la fermentation, y compris les acides organiques, les exopolysaccharides (EPS), les enzymes et le CO<sub>2</sub>. Ce chapitre traite de l'impact de la fermentation au levain sur les composants du pain qui forment sa structure et sur la texture du pain.

### 8.2 Composants déterminant la structure de la pâte et du pain

Les protéines du gluten de blé donnent à la pâte ses propriétés visco-élastiques uniques qui permettent sa prise de volume suite à la formation de dioxyde de carbone et d'en retenir la majeure partie dans la pâte. Les gluténines polymériques donnent à la pâte à base de blé sa force et son élasticité, tandis que les gliadines monomériques sont responsables des propriétés visqueuses de la pâte [2, 3]. Des granules d'amidon enchassées dans le réseau protéique forment une structure continue avec le gluten durant le pétrissage.

---

S. Galle (\*)

Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, Edmonton, University of Alberta, Alberta, Canada - e-mail: galle@ualberta.ca

Dans le pain frais, les principaux réseaux sont le réseau continu de gluten qui forme une matrice entre les granules d'amidon gélatinisés et gonflés et le réseau d'amidon transitoire, composé de polymères d'amidon gélatinisés. [4]. Durant le refroidissement, les principaux changements ont lieu dans la fraction d'amidon où l'amylose forme un réseau d'amylose partiellement cristallin, avec de l'amylose cristallin et un complexe amylose-lipide. C'est le réseau d'amylose associé au réseau glutineux formé durant la cuisson qui détermine l'élasticité du pain frais. Les réseaux de pentosanes (arabinoxylanes) et d'amylopectine gélatinisée contribuent également à la formation de la structure transitoire du pain de blé frais. Durant le stockage, la texture du pain se durcit essentiellement à cause des changements physiques qui ont lieu dans la matrice amidon-protéine de la mie de pain [5]. La rétrogradation est le processus au cours duquel l'amidon retrouve une forme plus cristalline après la gélatinisation. L'amylose étant déjà entièrement rétrogradée dans le pain frais, c'est la rétrogradation progressive de l'amylopectine qui provoque le rassissement du pain [6]. En outre, l'eau migre dans la mie et de la mie vers la croûte. Cette perte d'eau est un autre facteur essentiel dans le processus de rassissement du pain [4].

La composition de gluten, la gélatinisation de l'amidon et l'activité des  $\alpha$ -amylases de la farine de seigle diffèrent de celles de la farine de blé [7]. Les facteurs qui déterminent la formation de la structure de la pâte à base de seigle et du pain de seigle diffèrent donc également par rapport à la pâte et au pain de blé. Alors que le levain était un ingrédient essentiel pour garantir les propriétés de panification des pâtes contenant plus de 20 % de farine de seigle, son ajout aux pâtes à base de blé est facultatif. L'utilisation de levain suscite un intérêt croissant depuis une décennie pour améliorer la qualité et le goût du pain de blé. [1]. Mais les conclusions sur l'effet du levain sur le produit fini de blé varient sensiblement et l'utilisation de levain semble diminuer [8-10] ou augmenter le volume du pain [10-15].

### **8.3 Acides organiques**

La production d'acides organiques et la baisse du pH du levain qui en résulte ont un effet majeur sur les composants qui forment la structure du pain, comme l'amidon, le gluten et l'arabinoxylane (Tableau 8.1). Les acides ont comme effet principal sur la fraction protéique d'augmenter le gonflement et la solubilité des protéines du gluten [16, 17]. Cet effet s'explique par une charge nette positive des protéines dans un environnement acide. La répulsion électrostatique intramoléculaire renforcée entraîne le déploiement des protéines du gluten qui sont exposées à un plus grand nombre de groupes hydrophobiques. La présence de forces répulsives électrostatiques intramoléculaires accrues empêche la formation de nouveaux liens. Il en résulte une pâte plus souple, moins stable et qui nécessite un pétrissage plus court [18, 19]. En outre, la souplesse du gluten favorise le gonflement et l'absorption d'eau [20]. L'hydrolyse acide partielle de l'amidon a aussi des effets positifs sur les granules d'amidon, avec une meilleure capacité de rétention d'eau [8, 21]. Outre l'impact du pH bas sur les composants de la farine, l'acidification et la durée de fermentation ont des effets secondaires, comme des changements d'activité des enzymes des céréales. Le pH optimal des protéases de farine est acide et la protéolyse est favorisée dans les pâtes de pH 4, en comparaison aux systèmes non-acidifiants [22].

Tableau 8.1 Effets des métabolites du levain sur la structure du pain

| Métabolites        | Effets sur les composants de la farine                                                                                                                                                 | Effets sur la structure de la pâte/du pain                                                                                                                                                                                |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Acides organiques  | Meilleurs gonflement et solubilité du gluten<br>Meilleure rétention d’eau du gluten et de l’amidon<br>Meilleure protéolyse des protéines du gluten par protéases endogènes à la farine | Pétrissage plus court, pâte moins stable<br>Meilleure élasticité et souplesse de la pâte<br>Augmentation et diminution du volume de pain<br>Hausse du volume et meilleure structure de la mie du pain de blé et de seigle |
| Acides organiques  | Meilleure solubilité des pentosanes par hydrolyse acide et pentosanases endogènes                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                           |
| Acides organiques  | Inhibition des $\alpha$ -amylases endogènes                                                                                                                                            | Aptitude à la panification du pain de seigle                                                                                                                                                                              |
| Enzymes            | Protéolyse                                                                                                                                                                             | Affaiblissement de la structure du gluten, assouplissement de la pâte                                                                                                                                                     |
| Exopolysaccharides | Glutathion-réductase<br>Meilleure absorption de l’eau<br>Interaction avec le réseau gluten-amidon<br>Inhibition de la rétrogradation de l’amidon                                       | Pâte plus souple, meilleure texture et augmentation du volume<br>Meilleure conservation (anti-rassissement)                                                                                                               |
| CO <sub>2</sub>    | Expansion des cellules gazeuses                                                                                                                                                        | Fermentation de la pâte et du pain                                                                                                                                                                                        |

En comparaison aux fermentations directes, l’activité stimulée des protéases des céréales est aussi imputable aux plus longues durées de fermentation. La conséquence rhéologique de la dégradation du gluten est la forte baisse de l’élasticité et de la fermeté du levain et de la pâte à pain qui en résulte [10, 23, 24]. En fonction du profil d’acidité et du réseau de gluten, les effets sur le volume de pain et le rassissement pourront être positifs ou négatifs. Les changements physicochimiques du réseau protéique dus à la fermentation au levain favorisent la rétention des gaz et l’expansion grâce à des pâtes plus souples et plus extensibles [11, 13, 25]. La microscopie confocale à balayage laser a visualisé l’effet de l’incorporation de levain sur la microstructure de la pâte : comparativement à la structure régulière du réseau du produit témoin, le gluten de la pâte au levain avait une nature plus amorphe et il y avait de plus grandes zones de matière agrégée composée de brins de protéines plus épais [23]. La présence de ces brins plus épais pourrait aussi expliquer la hausse sensible du volume de pain [26]. Un volume plus important implique une mie plus moelleuse et un rassissement moins rapide [13, 27]. Toutefois, si l’acidité du levain augmente davantage, le volume du pain diminue [8-10]. Une analyse quantitative du gluten dans les pâtes à levain et les pâtes acidifiées chimiquement a montré que les gliadines et gluténines sont hydrolysées [28, 29]. Les gluténines de masse molaire élevée, en particulier, sont complètement dégradées, ce qui entraîne un fort assouplissement du gluten. Un gluten plus faible augmente l’expansion de la pâte mais réduit aussi la rétention des gaz. Le taux d’acidité du levain et la pâte correspondante doivent donc être rigoureusement contrôlés afin d’obtenir un volume plus important [30].

La baisse du pH durant la fermentation n’affecte pas seulement les protéases des céréales mais aussi l’activité des amylases, en partie inactivées par des conditions acides. C’est un aspect important pour les produits de boulangerie à base de seigle, étant donné qu’une activité  $\alpha$ -amylase excessive donne une mie collante, un grain

très ouvert et une réduction du volume du pain [7, 21]. Dans la farine de blé, les  $\alpha$ -amylases sont pratiquement absentes, tandis que les  $\beta$ -amylases sont abondamment présentes, même si ces dernières n'agissent peu, voire pas sur les granules d'amidon et sont inactivées avant la gélatinisation de l'amidon [4].

Dans la farine de seigle, les protéines ne sont pas capables de former un réseau similaire à celui du gluten de blé et le processus de formation de la structure est donc assuré par les pentosanes qui retiennent l'eau [21]. Les pentosanes sont principalement composés d'arabinoxylanes (AX), elles-mêmes divisées en arabinoxylanes extractibles par l'eau (WEAX) et non extractibles par l'eau (WUAX). Les WUAX ont une influence délétère sur la qualité du pain, contrairement aux WEAX, qui augmentent le volume du pain en raison de leur capacité élevée à retenir l'eau et à subir la gélification oxydative [31] (voir Chap. 2). L'acidification a un effet prononcé sur la solubilité d'AX à cause de l'hydrolyse acide des WUAX, ce qui entraîne l'augmentation de la proportion des WEAX [32]. En outre, durant la fermentation au levain, les valeurs optimales de pH pour les enzymes de seigle endogènes comme L-arabinofuranosidase, endoxylanase et xylosidase sont atteintes [33]. Dans la farine de blé, les endoxylanases causent une baisse des WUAX et une hausse des WEAX [6]. Les WEAX bénéfiques peuvent ainsi augmenter durant la fermentation au levain. Dans les pâtes à base de seigle, leur présence améliore les propriétés physiques en augmentant l'élasticité de la pâte et, par conséquent, de la mie de pain. La mie est plus agréable en bouche, sa structure est améliorée et son volume augmente [7, 31, 33]. Dans les produits à base de blé, la meilleure solubilité des pentosanes dans le levain contribue également à augmenter le volume du pain et son moelleux [6, 13, 34].

## 8.4 Enzymes des bactéries lactiques contribuant à la structure de la pâte et du pain

Dans les levains, la protéolyse est principalement basée sur l'activation des protéases de farine endogènes par le pH [28, 29, 35] (Tableau 8.1). Les lactobacilles utilisés dans la fermentation au levain peuvent aussi présenter une activité protéolytique spécifique à la souche [36, 37], mais semblent jouer un rôle mineur dans le processus global de protéolyse. Bien que les bactéries lactiques n'aient pas d'influence sur la protéolyse en général quand on les compare aux pâtes acidifiées de façon aseptique, elles affectent le profil des produits hydrolysés en augmentant le taux de dipeptides et d'acides aminés. En réalité, la protéolyse à partir de bactéries lactiques rendait la pâte plus souple que les pâtes acidifiées chimiquement [37]. En outre, le choix d'une culture de départ hautement protéolytique, comme *Enterococcus faecalis*, contribuait fortement à la protéolyse du gluten [38].

Le rôle important des enzymes produits par les bactéries lactiques a été avancé pour expliquer les différences observées dans le rassissement du pain au levain [12, 13]. Les pains au levain, avec des taux d'acidité comparables, avaient des taux de rassissement variables en termes de fermeté et de rétrogradation de l'amidon. Les souches de bactéries lactiques qui présentaient des activités protéolytiques et amylolytiques retardaient très efficacement le rassissement [12].

Outre les protéases des céréales dépendantes du pH et les protéases libérées par les bactéries lactiques, la glutathion-réductase exprimée par les lactobacilles hétérofermentaires contribue à la dépolymérisation des protéines du gluten [39] (Tableau 8.1). La glutathion-réductase réduit le glutathion oxydé extracellulaire (GSSG) à l'agent réducteur glutathion (GSH), ce qui entraîne l'augmentation de groupements SH dans les protéines du gluten. Le GSH subit des réactions d'échange de thiols avec les protéines du gluten et diminue la réticulation intermoléculaire de disulfure, ce qui engendre une baisse de la masse molaire du macropolymère gluténine (GMP). De petites quantités d'agents réducteurs suffisent à affecter fortement le réseau disulfure de gluténines [40].

## 8.5. Exopolysaccharides(EPS)

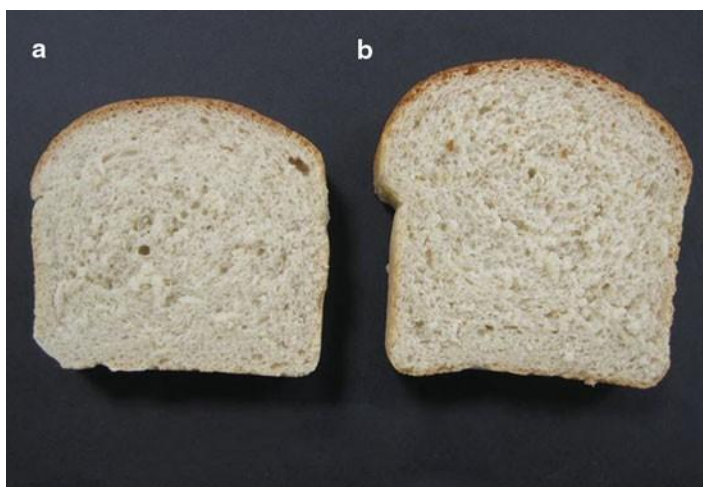
Certaines souches de bactéries lactiques synthétisent des EPS à partir de saccharose. Les EPS ont un effet positif sur la texture, la sensation en bouche, le goût et la stabilité des aliments fermentés. En outre, des effets prébiotiques ont été attribués à certains EPS [41-43].

Les EPS se divisent en homopolysaccharides (HoPS) et hétéropolysaccharides (HePS) en fonction de leur parcours biosynthétique. Les HoPS sont synthétisés à partir du saccharose par des glucansucrases ou fructansucrases extracellulaires et ne contiennent qu'un seul type de monosaccharide, respectivement glucose ou fructose. Les HePS sont synthétisés par des glycosyltransférases intracellulaires et sont composés d'un ou de plusieurs monosaccharides (voir Chap. 7). La formation de HePS par des bactéries lactiques est utilisée dans la fermentation laitière pour améliorer la texture des yaourts et autres produits laitiers fermentés, mais a aussi été utilisée récemment pour la fermentation au levain de sorgho [44]. La synthèse de glucanes et fructanes a été observée pour *Leuconostoc* spp. et *Weissella* spp., qui synthétisent du dextrane [45]. *Lactobacillus reuteri*, *L. panis*, *L. pontis*, *L. frumenti* et *L. sanfranciscensis* produisent des fructanes (lévanes ou inuline) et des glucanes (dextrane, reuterane ou mutane) [43]. Il semblerait que tout levain est susceptible de contenir au moins une souche productrice d'EPS [43, 46]. Outre les EPS, le glucane et les fructansucrases peuvent synthétiser respectivement des gluco-oligosaccharides et fructo-oligosaccharides. Dans le levain, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis* et *Weissella cibaria* ont synthétisé respectivement des FOS, 1-kestose et isomalto-oligosaccharides [47-49]. Avec les EPS, en particulier les lévanes de *L. sanfranciscensis*, les oligosaccharides ont été décrits pour leurs effets bénéfiques sur la santé. La production d'EPS par les bactéries lactiques du levain remplit deux fonctions : elle améliore la valeur nutritionnelle (Chap. 9) et la texture du pain.

Les HoPS bactériennes dans le levain agissent comme des hydrocolloïdes. L'effet des EPS bactériens et des hydrocolloïdes sur la pâte et le pain est basé sur deux fonctions : (1) rétention d'eau lors de la fabrication de la pâte et (2) interaction avec d'autres composants de la pâte, comme les protéines et l'amidon. Cette interaction influe sur les réseaux structurels durant la fermentation et le processus de cuisson [50]. Durant les fermentations au levain, les bactéries lactiques peuvent produire des EPS dans des quantités suffisantes pour améliorer la structure de la pâte [49]. Le dextrane de *Leuconostoc mesenteroides* semble contribuer à la longue durée de conservation du panettone [51].

L'application des EPS formés *in situ* peut donc réduire l'apport d'hydrocolloïdes pour satisfaire le consommateur, qui souhaite des produits plus naturels, à moindre coût. En outre, le lévane produit *in situ* était plus efficace qu'un lévane ajoutée en externe [52].

Les avantages technologiques des EPS formés *in situ* dépendent des propriétés des EPS et du rendement des polymères. Ces derniers dépendent eux-mêmes de l'apport de glucides dans le substrat de fermentation. En fonction de la souche, la farine, le rendement en pâte et les conditions de fermentation peuvent être choisis pour obtenir une production optimale d'EPS [53].



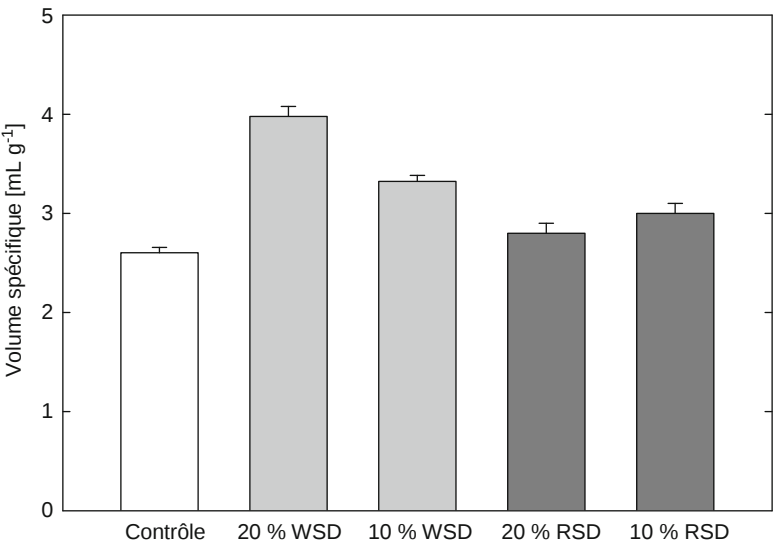
**III. 8.1** Pain de blé à base de levain préparé sans EPS (a) comparé à un pain à base de levain préparé avec des EPS (b) (données de Galle [10])

La formation d'EPS dans la pâte a réduit son élasticité et sa force, ce qui prouve l'interaction des EPS avec les composants responsables de la formation de la structure [10]. L'ajout de levain fermenté avec des souches productrices d'HoPS dans des pâtes à base de blé et de seigle a augmenté le moelleux et la fraîcheur de la mie ainsi que le volume de pain (Ill. 8.1) [10, 14, 51]. Actuellement, le secteur de la boulangerie utilise des EPS formés *in situ*, dont le potentiel comme améliorants de panification est croissant. Un processus a été mis au point pour adapter le microbiote du levain à un taux de saccharose élevé et atteindre un taux de 25 % de dextrane [54]. Le dextrane interagit avec le réseau de gluten pour former une structure qui améliore la stabilité de la pâte et la rétention des gaz. Sa forte capacité de rétention d'eau explique la fraîcheur du produit. Le dextrane linéaire qui a une masse molaire élevée a plus d'effet sur le volume de pain qu'un dextrane ramifié avec une masse molaire élevée [51, 54, 55]. À quantités égales de reuterane, lévane ou dextrane ajoutées à une pâte de blé, c'est le dextrane qui a eu le meilleur effet sur les propriétés viscoélastiques de la pâte et sur le volume du pain final [43].

Le métabolisme du saccharose des bactéries lactiques ne donne pas uniquement des EPS, mais aussi du glucose et du fructose. Le glucose favorise la production de gaz par la levure et contribue à la fermentation de la pâte [10, 25, 56]. Le fructose

stimule la formation de mannitol et d'acétate par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Si l'acétate a des propriétés antimicrobiennes, de fortes concentrations d'acétate ont un effet négatif sur le goût et la structure du pain.

Les effets bénéfiques des lévanes et reuteranes sur le volume du pain, dus respectivement à *L. sanfranciscensis* et *L. reuteri*, ont été atténués par les effets négatifs de l'acétate (III. 8.2) [9, 10]. Contrairement aux lactobacilles hétérofermentaires, *Weissella* spp. ne forme que de faibles quantités d'acétate, mais des quantités significatives de dextrane, en même temps [15, 47, 48]. L'application de levains *Weissella* contenant du dextrane a produit un pain légèrement acide avec une meilleure structure et durée de conservation. L'incorporation de plus grandes quantités de levains *Weissella* augmente la concentration de dextrane dans le pain final, sans impact négatif sur le goût et la texture du pain [10, 15].



**III. 8.2** Volume spécifique de pain préparé avec 10 % et 20 % de levain *Weissella* contenant des EPS (WSD) comparé au volume de pain préparé avec 10 % et 20 % de levain *L. reuteri* contenant des EPS et de l'acétate (RSD) (données de Galle [10])

Les conclusions sur l'influence des EPS sur les produits de blé et de seigle peuvent être appliquées aux produits sans gluten (Tableau 8.2) et sont présentées en détail dans le Chap. 10. En résumé, les EPS formés durant la fermentation au levain à partir de saccharose peuvent permettre d'optimiser la fabrication du pain ; pour cela, il faut sélectionner une culture de starter qui produit des EPS non seulement en fonction de ses propriétés polymériques et de son rendement en polymères, mais aussi en fonction de ses produits dérivés et de ses performances de fermentation.

## **8.6 Formation de CO<sub>2</sub>**

Le levain contient généralement des levures et des bactéries lactiques. Les interactions entre les levures et les lactobacilles sont importantes pour l'activité microbienne et la formation de CO<sub>2</sub> dans le levain [57]. La formation de micro-organismes est nécessaire pour permettre la fermentation du pain. Dans le levain, le dioxyde de carbone est produit par les bactéries lactiques hétérofermentaires et les levures. La contribution de chaque groupe au volume de gaz global dépend de la culture de départ et de la technologie appliquée à la pâte [21, 25]. Une augmentation du volume du pâton a été observée quand le levain ajouté à la pâte avait subi une fermentation plus longue ; avec l'ajout de levure de boulangerie, la production de gaz par les levures supplantait la production de gaz par les bactéries lactiques [11, 21, 30]. À moins que le levain ne serve de ferment unique, on part généralement du principe que le levain favorise la rétention des gaz, mais pas leur production dans la pâte à pain [11, 21].

**Tableau 8.2** EPS formés *in situ* et leur effet sur la qualité du pain

| EPS       | Souches                    | Quantités [g kg <sup>-1</sup> SD <sup>a</sup> ] | Effets sur la structure du pain                           | Références           |
|-----------|----------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------|
| Dextrane  | <i>Ln. mesenteroides</i>   | 0,6-16 g/kg                                     | Augmente le volume (blé)                                  | [10, 15, 48, 51, 56] |
|           | <i>W. cibaria</i>          |                                                 | Diminue la fermeté (blé, sorgho)                          |                      |
|           | <i>W. confusa</i>          |                                                 | Améliore la fraîcheur (blé, seigle, sorgho)               |                      |
| Glucane   | <i>W. cibaria</i>          | 2,5 g/kg                                        | Augmente la viscosité de la pâte (blé)                    | [14]                 |
|           | <i>L. plantarum</i>        |                                                 | Augmente le volume (blé)                                  |                      |
|           |                            |                                                 | Diminue la fermeté (blé)                                  |                      |
| Lévane    | <i>L. reuteri</i>          | 1,5-5,2 g kg <sup>-1</sup>                      | Aucune amélioration (blé, sorgho)                         | [9, 48]              |
|           | <i>L. sanfranciscensis</i> |                                                 |                                                           |                      |
| Fructane  | <i>L. reuteri</i>          | 3,3 g kg <sup>-1</sup>                          | Diminue la fermeté (sorgho)                               | [56]                 |
|           |                            |                                                 | Réduit la fraîcheur (sorgho)                              |                      |
| Reuterane | <i>L. reuteri</i>          | 0,6-5,1 g kg <sup>-1</sup>                      | Diminue la fermeté (sorgho, blé)                          | [10, 56]             |
|           |                            |                                                 | Améliore la fraîcheur (sorgho, blé)                       |                      |
|           |                            |                                                 | Diminue la force et l'élasticité de la pâte (blé, sorgho) |                      |
| HePS      | <i>L. buchneri</i>         | n.d.                                            | Diminue la force et l'élasticité de la pâte (sorgho)      | [44]                 |

<sup>a</sup>SD: levain ; n.d. : la quantité d'HePS n'est pas détectable, la formation d'HePS dans le levain a été confirmée par expression génique

## **8.7 Autres fermentations et effets synergiques du levain et des additifs**

De nombreuses études ont prouvé l'importance nutritionnelle des fibres alimentaires. Il est difficile d'obtenir un pain complet avec un volume acceptable et un taux élevé de fibres. La fermentation du son favorise l'absorption de l'eau et la modification de la texture des particules de son. L'utilisation de son fermenté associé à un mélange d'enzymes ( $\alpha$ -amylases, xylanase et lipase) a amélioré le volume, la texture et la durée de conservation du pain de blé riche en fibres [58]. L'utilisation combinée d'enzymes exogènes et de levain dans les produits panifiés de blé augmente aussi le taux d'acidification et le volume du pain et retarde le rassissement [13, 59, 60]. Récemment, le levain associé à des cryoprotecteurs et/ou des additifs conventionnels (par ex. miel, hydrocolloïdes) dans des pâtes surgelées a servi à remédier à des problèmes tels que la durée d'apprêt prolongée, la baisse du volume et de mauvaises caractéristiques du pain [61].

## **8.8 Conclusion**

L'ajout de levain améliore la qualité du pain et est utilisé depuis longtemps pour produire du pain de blé et de seigle. L'acide organique, les EPS, les enzymes et le CO<sub>2</sub> synthétisés durant la fermentation au levain par les bactéries lactiques et les levures sont à l'origine de l'amélioration de la pâte et de la qualité du pain. Les acides organiques ont une influence positive sur les composés responsables de la structure de la pâte de blé et de seigle, en particulier le gluten, l'amidon et les arabinoxylanes. En outre, la production d'acides organiques et la baisse du pH qui en résulte induit/inhibe les enzymes endogènes comme les protéinases, pentosanases et amylases, qui interfèrent aussi avec les composantes structurales. Les EPS formés à partir du saccharose durant la fermentation peuvent remplacer les hydrocolloïdes, utilisés actuellement comme améliorants de la pâte et du pain. Toutefois, on peut considérer que le métabolisme de la microflore du levain peut aussi avoir des impacts négatifs sur la qualité du pain : un taux d'acidification plus élevé compromet la structure de la mie et masque les effets bénéfiques des EPS. Une meilleure connaissance des métabolites formés durant la fermentation au levain et de leur interaction avec les composants de la pâte permet une optimisation plus directe de la qualité du pain. Les études présentées ici montrent qu'un processus de fermentation au levain optimisé pour la production de pain offre une technologie exploitable pour obtenir des pains avec une texture, un volume et une durée de conservation plus satisfaisants. La technologie du levain peut être utile pour réduire ou éliminer le nombre d'additifs souvent utilisés dans les produits de boulangerie et permet de satisfaire les demandes des consommateurs qui souhaitent des produits plus naturels et moins coûteux.

## Références

1. Arendt EK, Ryan LAM, Dal Bello F (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* 24:165–174
2. Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1992) High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci* 15:105–120
3. Belton PS (1999) On the elasticity of wheat gluten. *J Cereal Sci* 29:103–107
4. Goesaert H, Slade H, Levine H, Delcour JA (2009) Amylases and bread firming – an integrated view. *J Cereal Sci* 50:345–352
5. Gray JA, Bemiller JN (2003) Bread staling: molecular basis and control. *Compr Rev Food Sci Food Safety* 2:1–20
6. Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke WS, Courtin CM, Gebruers K, Delcour JA (2005) Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends Food Sci Tech* 16:12–30
7. Brandt MJ (2006) Bedeutung von Sauerteig für die Brotqualität. In: Brandt MJ, Gänzle MG (eds) *Handbuch Sauerteig*. B. Behr's Verlag, Hamburg, pp 21–40
8. Barber B, Ortolá C, Barber S, Fernández F (1992) Storage of packaged white bread. *Z Lebensm Forsch* 194:442–449
9. Kaditzky S, Seitter M, Hertel C, Vogel RF (2008) Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. *Eur Food Res Tech* 227:433–442
10. Galle S (2011) Isolation, characterization and application of exopolysaccharides from lactic acid bacteria to improve the quality of wheat and gluten-free bread. Doctoral thesis, University College Cork, Ireland
11. Clarke CI, Schober TJ, Arendt EK (2002) The effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and bread quality. *Cereal Chem* 79:640–647
12. Corsetti A, Gobbetti M, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi J (1998) Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J Food Sci* 63:347–351
13. Corsetti A, Gobbetti B, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F, Rossi J (2000) Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem* 48:3044–3051
14. Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Minervini F, Carnevali P, Corsetti A, Gänzle M, Ciati R, Gobbetti M (2006) Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *J Agric Food Chem* 54:9873–9881
15. Katina K, Maina NH, Juvonen R, Flander L, Johansson L, Virkki L, Tenkanen M, Laitila A (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol* 26:734–743
16. Axford DWE, McDermott EE, Redman DG (1979) Note on the sodium dodecyl sulfate test of breadmaking quality: comparison with Pelshenke and Zeleny tests. *Cereal Chem* 56:582–583
17. Takeda K, Matsumura Y, Shimizu M (2001) Emulsifying and surface properties of wheat gluten under acidic conditions. *J Food Sci* 66:393–399
18. Hoseney C (1994) *Principles of cereals science and technology*, 2nd edn. American Association of Cereal Chemists, St. Paul
19. Wehrle K, Grau H, Arendt EK (1997) Effects of lactic acid, acetic acid, and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. *Cereal Chem* 74:739–744
20. Schober TJ, Dockery P, Arendt EK (2003) Model studies for wheat sourdough systems using gluten, lactate buffer and sodium chloride. *Eur Food Res Tech* 217:235–243
21. Hammes WP, Gänzle MG (1998) Sourdough breads and related products. In: Woods BJB (ed) *Microbiology of fermented foods*, vol 1. Blackie Academic/Professional, London, pp 199–216
22. Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavour. *Cereal Chem* 79:45–51
23. Clarke C, Schober T, Dockery P, O'Sullivan K, Arendt EK (2004) Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chem* 81:409–417

24. Thiele C, Grassl S, Gänzle M (2004) Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. *J Agric Food Chem* 52:1307–1314
25. Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J (1995) Interaction between lactic acid bacteria and yeasts in sourdough using a rheofermentometer. *World J Microbiol Biotech* 11:625–630
26. Kieffer R, Stein N (1999) Demixing in wheat doughs-its influence on dough and gluten rheology. *Cereal Chem* 76:688–693
27. Crowley P, Schober T, Clarke C, Arendt E (2002) The effect of storage time on textural and crumb grain characteristics of sourdough wheat bread. *Eur Food Res Tech* 214:489–496
28. Thiele C, Gänzle G, Vogel RF (2003) Fluorescence labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerization during dough processing and sourdough fermentation. *J Agri Food Chem* 51:2745–2752
29. Loponen J, Mikola M, Katina K, Sontag-Strohm T, Salovaara H (2004) Degradation of HMW glutenins during wheat sourdough fermentations. *Cereal Chem* 81:87–90
30. Clarke CI, Schober TJ, Angst E, Arendt EK (2003) Use of response surface methodology to investigate the effects of processing conditions on sourdough wheat bread quality. *Eur Food Res Tech* 217:23–33
31. Vinkx CJA, Delcour JA (1996) Rye (*Secale cereale* L.) arabinoxylans: a critical review. *J Cereal Sci* 24:1–14
32. Boskov Hansen H, Andreassen M, Nielsen M, Larsen L, Knudsen BK, Meyer A, Christensen L, Hansen A (2002) Changes in dietary fibre, phenolic acids and activity of endogenous enzymes during rye bread-making. *Eur Food Res Tech* 214:33–42
33. Brandt MJ (2006) Bedeutung von Rohwarenkompontenten. In: Brandt MJ, Gänzle MG (eds) *Handbuch Sauerteig*. B. Behr's Verlag, Hamburg, pp 41–55
34. Courtin C, Delcour J (2002) Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J Cereal Sci* 35:225–243
35. Gänzle MG, Loponen J, Gobbetti M (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci Tech* 19:513–521
36. Gobbetti M, Smacchi E, Fox P, Stepaniak L, Corsetti A (1996) The sourdough microflora. Cellular localisation and characterization of proteolytic enzymes in lactic acid bacteria. *Lebensm Wissensch Tech* 29:561–569
37. Di Cagno R, de Angelis M, Lavermicocca P, de Vincenzi M, Giovannini C FM, Gobbetti M (2002) Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl Environ Microbiol* 68:623–633
38. Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel RF (2008) Effect of different *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. *Eur Food Res Tech* 226:1495–1502
39. Vermeulen N, Kretzer J, Machalitz H, Vogel RF, Gänzle MG (2006) Influence of redox-reactions catalysed by homo- and heterofermentative lactobacilli on gluten in wheat sourdoughs. *J Cereal Sci* 43:137–143
40. Grosch W, Wieser H (1999) Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *J Cereal Sci* 29:1–16
41. Korakli M, Rossmann A, Gänzle MG, Vogel RF (2001) Sucrose metabolism and exopolysaccharide production in wheat and rye sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Agri Food Chem* 49:5194–5200
42. Korakli M, Gänzle MG, Vogel RF (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol* 92:958–965
43. Tiekink M, Gänzle MG (2005) Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci Tech* 16:79–84
44. Galle S, Schwab C, Arendt EK, Gänzle MG (2011) Structural and rheological characterisation of heteropolysaccharides produced by lactic acid bacteria in wheat and sorghum sourdough. *Food Microbiol* 26:547–553
45. Bounaix MS, Robert H, Gabriel V, Morel S, Remaud-Simeon M, Gabriel B, Fontagne-Faucher C (2010) Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextranase expression. *FEMS Microbiol Lett* 311:18–26
46. Bounaix MS, Gabriel V, Morel S, Robert H, Rabier P, Remaud-Simeon M, Gabriel B,

- Fontagne-Faucher C (2009) Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. *J Agri Food Chem* 57:10889–10897
47. Galle S, Schwab C, Arendt E, Gänzle MG (2010) Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *J Agri Food Chem* 58:5834–5841
48. Schwab C, Mastrangelo M, Corsetti A, Gänzle MG (2008) Formation of oligosaccharides and polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in sorghum sourdoughs. *Cereal Chem* 85:679–684
49. Tieking M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2003) In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:945–952
50. Waldherr FW, Vogel RF (2009) Commercial exploitation of homo-exopolysaccharides in non-dairy food systems. In: Ullrich M (ed) *Bacterial polysaccharides: Current innovations and future trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp 313–330
51. Lacaze G, Wick M, Cappelle S (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiol* 24:155–160
52. Brandt MJ, Roth K, Hammes WP (2003) Effect of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH1729 on dough and bread quality. In: Vyast L, Vrije (eds) *Sourdough from fundamentals to application*, de Universiteit Brussels (VUB), Brussels, Hamburg, p 80
53. Kaditzky S, Vogel R (2008) Optimization of exopolysaccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli. *Eur Food Res Tech* 228:291–299
54. Decock P, Cappelle S (2005) Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Tech* 16:113–120
55. Ross AS, McMaster GJ, David Tomlinson J, Cheetham NWH (1992) Effect of dextrans of differing molecular weights on the rheology of wheat flour doughs and the quality characteristics of pan and arabic breads. *J Sci Food Agri* 60:91–98
56. Galle S, Schwab C, Dal Bello F, Coffey A, Gänzle MG, Arendt EK (2012) Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. *Int J Food Microbiol* (in press), Corrected proof
57. Martínez-Anaya MA (2003) Associations and interactions of micro-organisms in dough fermentations: effects on dough and bread characteristics. In: Kulp K, Lorenz K (eds) *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker, New York, pp 63–195
58. Katina K, Salmenkallio-Marttila M, Partanen R, Forssell P, Autio K (2006) Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *Food Sci Tech* 39:479–491
59. 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 Microbiol* 20:67–75
60. Martínez-Anaya MA, Devesa A, Andreu P, Escrivá C, Collar C (1998) Effects of the combination of starters and enzymes in regulating bread quality and shelf-life. *Food Sci Tech Int* 4:425–435
61. Minervini F, Pinto D, Di Cagno R, De Angelis M, Gobbetti M (2011) Scouting the application of sourdough to frozen dough bread technology. *J Cereal Sci* 54:296–304

## Chapitre 9

# Aspects nutritionnels de la fermentation des céréales par bactéries lactiques et levure

Kati Katina et Kaisa Poutanen

### 9.1 Introduction

La fermentation au levain est surtout connue et étudiée pour ses effets sur la qualité sensorielle et la conservation des produits de boulangerie. L'acidification, l'activation d'enzymes et leurs effets sur la matrice des céréales ainsi que la production de métabolites microbiens induisent des changements dans la matrice de la pâte et du pain, qui influent également sur la qualité nutritionnelle des produits. Cette dernière dépend de la composition et de la structure chimique des aliments fermentés, c'est-à-dire du contenu et de la biodisponibilité des éléments nutritifs et non nutritifs. La fermentation au levain peut modifier tous ces paramètres, comme l'ont montré Poutanen *et al.* [1] et Katina *et al.* [2].

La fermentation au levain est traditionnellement appliquée aux aliments à base de céréales complètes ; c'est un moyen efficace de donner au pain complet un goût agréable. Le pain de seigle en est le meilleur exemple, puisque la plupart des pains de seigle complets sont faits à partir de la fermentation au levain [3]. La fermentation au levain, y compris sous forme de prétraitement des matières premières, redevient actuellement populaire, également pour les produits à base de mélanges de farines et enrichis en fibres alimentaires [4], pour lesquels elle peut aussi modifier les propriétés du complexe de fibres alimentaires. La fermentation a été étudiée pour réduire la réponse glycémique du pain [5, 6] et pour améliorer l'assimilation des minéraux [7]. Le métabolisme microbien durant la fermentation au levain peut aussi produire de nouveaux composés actifs sur le plan nutritionnel, comme des vitamines [8] et des exopolysaccharides potentiellement prébiotiques [9].

Ce chapitre traite des modifications importantes sur le plan nutritionnel dans l'amidon, les protéines, les fibres alimentaires, les vitamines, les minéraux et certains éléments phytochimiques des céréales et examine le potentiel des micro-organismes à produire de nouveaux composés.

---

K. Katina (\*) • K. Poutanen  
VTT Centre de recherche technique de  
Finlande, PB 1000, 02044 VTT Espoo,  
Finlande  
E-mail : kati.katina@vtt.fi

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*  
DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0\_9, © Springer Science+Business Media New York, 2013

## 9.2 Effets sur les biopolymères des céréales

### 9.2.1 L'amidon

Les glucides alimentaires sont la principale source de glucose sanguin. Une hausse du taux de glucides à absorption rapide dans le régime alimentaire entraîne une augmentation rapide du taux de glucose dans le sang (glycémie) et une forte demande d'insuline en phase postprandiale. Les principales sources de glucides dans le régime alimentaire occidental contiennent de l'amidon rapidement assimilable et de nombreux produits riches en amidon, comme les produits de boulangerie, les céréales du petit-déjeuner, les produits à base de pommes de terre et les snacks provoquent des réactions glycémiques fortes. De nombreux éléments semblent prouver que la grande quantité de glucose rapidement disponible dérivé de l'amidon et des sucres libres dans le régime alimentaire moderne [aliments ayant un index glycémique (IG) et un index insulinique (II) élevés] génèrent des concentrations périodiquement élevées de glucose sanguin et d'insuline qui peuvent constituer un facteur de risque pour la santé [10].

La plupart des aliments riches en amidon ont un taux d'humidité bas à moyen ; leur digestion est donc globalement une réaction solide-liquide à deux phases, durant laquelle l'enzyme (en particulier l' $\alpha$ -amylase) doit d'abord diffuser dans la matrice alimentaire solide hydratée, se lier au substrat, puis couper les liaisons glycosidiques des molécules d'amidon [11]. Des facteurs qui affectent la liaison de l' $\alpha$ -amylase aux substrats [par ex. inhibition par les produits des réactions d'hydrolyse comme le maltose et maltotriose] vont ralentir la réaction enzymatique et par conséquent la digestion de l'amidon. D'autres facteurs physiologiques affectent la digestibilité de l'amidon, comme la vidange gastrique, les inhibiteurs d'enzymes et la viscosité du tube digestif [12].

La macrostructure et la microstructure des aliments à base de céréales ont un impact considérable sur la digestibilité de l'amidon, comme l'ont montré Singh *et al.* [13]. Les caractéristiques propres de l'amidon jouent un rôle crucial dans la libération du glucose. Les amidons riches en amylose sont plus résistants à l'amylolyse que les amidons normaux ou cireux. La structure supramoléculaire (amassement de cristallites dans les granules d'amidon), le rapport amylase-amylopectine, la structure fine de l'amylopectine et les caractéristiques de surface des granules d'amidon sont les principaux facteurs intrinsèques qui modifient la digestibilité de l'amidon brut [14]. *In vitro*, les amidons natifs sont hydrolysés très lentement et en minorité par les amylases [15-17]. Quand l'amidon est impliqué dans la transformation des aliments, la gélatinisation de l'amidon, c'est-à-dire l'interruption de la structure cristalline de l'amidon par la chaleur et l'humidité, entraîne généralement une baisse ou une perte de l'aptitude des amidons natifs des céréales à être digérés lentement [18]. L'amidon gélatinisé se retrouve par exemple dans les produits de boulangerie dans un état amorphe complet ou partiel. Ainsi, plus l'amidon est gélatinisé, plus il est digéré rapidement [19]. Dans nombre d'aliments courants riches en amidon, comme le pain blanc, l'amidon est fortement gélatinisé et la structure du produit est très poreuse, ce qui entraîne une dégradation rapide de l'amidon dans l'intestin grêle et une hausse très rapide du taux de glucose dans le sang (IG élevé).

Plusieurs mécanismes peuvent ralentir la digestion de l'amidon gélatinisé [20]. Le premier groupe de facteurs importants est lié à l'état de l'amidon dans la matrice alimentaire. La rétrogradation de l'amidon, c'est-à-dire la réassociation de l'amylose et de l'amylopectine qui forment des doubles hélices et éventuellement des structures cristallines, ralentit la digestibilité. La structure moléculaire de l'amylopectine est aussi un facteur important, dans la mesure où la forte densité de branches a été associée à une digestibilité lente. Réduire le degré de gélatinisation de l'amidon et conserver en partie la structure cristalline de type A des amidons associés est une manière efficace d'augmenter la proportion d'amidon d'absorption lente dans les produits alimentaires. Le second groupe de facteurs comprend l'impact de la mastication sur la structure des aliments, la vitesse de la vidange gastrique, la durée de transit dans l'intestin grêle et les propriétés des enzymes digestives [16].

Il existe peu de moyens de ralentir la digestibilité de l'amidon dans les produits à base de farine de blé, comme le pain, les biscuits et les céréales du petit-déjeuner, si l'on exclut l'ajout d'une grande quantité de grains entiers, en raison de la qualité inférieure des produits et des préférences des consommateurs. D'après une étude récente, le recours à une technologie de pré-fermentation (levain) ou l'ajout de fibres solubles sont les seuls moyens de réduire l'IG du pain de blé [21].

Des études ont montré que la fermentation de la matrice de farine de blé et de seigle par des bactéries lactiques, comme dans le procédé au levain, fait baisser l'IG du pain à l'orge complet [19, 22] et du pain de blé [5, 23-25] et l'II des pains de seigle ayant un taux de fibres alimentaires variable [26]. Plusieurs mécanismes impliqués dans la fermentation au levain contribueraient à la réduction de la digestibilité de l'amidon. La formation d'acides organiques, en particulier d'acide lactique, durant la fermentation paraît être un facteur majeur. Les mécanismes physiologiques expliquant les effets puissants des acides semblent varier. Alors que l'acide lactique ralentit la digestion de l'amidon du pain [22], les acides acétique et propionique semblent au contraire prolonger la vidange gastrique [27]. Les changements chimiques qui ont lieu durant la fermentation au levain sont censés réduire le niveau de gélatinisation de l'amidon [19], ce qui expliquerait en partie la plus faible digestibilité des aliments céréaliers fermentés à base de levain. Il a aussi été démontré que la fermentation au levain favorise la formation d'amidon résistant, dont la digestibilité est plus lente [28].

Au niveau des produits, l'intégrité des tissus, la porosité et la structure de l'amidon sont des caractéristiques importantes qui influent sur la réponse glycémique. Les pains de seigle confectionnés à partir de farine de seigle complète ou blanche avec des teneurs en fibres très différentes ont entraîné une hausse d'insuline moins forte que le pain blanc, pour une portion correspondant à 50 g d'amidon [26]. Les pains étaient confectionnés au levain et avec incorporation dans la pâte d'une proportion préfermentée de 40% du total de farine de seigle. Les résultats ont montré qu'avec tous les pains de seigle, quelle que soit la proportion de son, il fallait moins d'insuline pour réguler le taux de sucre dans le sang qu'avec le pain blanc, pour le même taux d'amidon. Cette influence est probablement due à la structure plus rigide et moins poreuse du pain de seigle et à la présence d'acide organique formé durant la fermentation au levain [29].

D'autres mécanismes peuvent peut-être aussi permettre au levain de réguler l'IG/l'II des produits. Par exemple, la protéolyse qui est dépendante du pH, a généralement lieu durant la fermentation au levain [30], avec production de quantités significatives de peptides et d'acides aminés dans le levain. Il se peut qu'ils jouent un rôle dans la régulation du métabolisme du glucose [31]. En outre, les travaux de Katina *et al.* [32] prouvent que la fermentation au levain augmente le nombre de composés phénoliques libres, ce qui a peut-être aussi un impact sur la baisse de l'IG/l'II [6, 33].

Toutefois, tous les pains au levain n'ont pas automatiquement un IG/II bas [34]. En général, il faut que le levain, et donc le pain, aient un pH plutôt bas pour que l'IG ou l'II diminue ; typiquement 3,5-4 pour les levains et 3,8-5,1 pour les pains au levain [5, 24, 25, 35, 36]. L'efficacité des différents acides pour réduire l'IG n'est pas encore tout à fait élucidée [6] et peut varier en fonction du type de pain. En outre, un pH aussi bas réduit souvent le volume de pain et en augmente la densité, ce qui favorise un IG faible en soi, y compris pour les pains blancs [37]. Par ailleurs, la qualité sensorielle des pains très acides peut les rendre moins acceptables pour le consommateur ; il faudrait donc trouver des moyens de renforcer l'efficacité de la fermentation, tout en maintenant un pH plus élevé. D'autres études sont nécessaires afin d'élucider l'impact direct des métabolites du levain (acides, peptides et exopolysaccharides) sur la digestibilité de l'amidon et l'impact indirect de la fermentation au levain sur les propriétés de la matrice des céréales (densité, libération de composés phénoliques, état des protéines et formation d'amidon résistant), autant de facteurs qui influent sur la digestibilité de l'amidon.

## **9.2.2 Les protéines**

La dégradation des protéines qui a lieu durant la fermentation au levain est l'un des principaux phénomènes qui affectent la qualité du pain au levain, comme l'ont montré Gänzle *et al.* [30]. Il a été démontré que la protéolyse lors d'une fermentation au levain est plus forte que dans les pâtes uniquement à base de levure. En effet, la protéolyse libère alors des petits peptides et des acides aminés libres, essentiels à une croissance microbienne rapide et à l'acidification. Ces composés sont également précurseurs du développement des arômes des produits de boulangerie à pâte levée [38]. En outre, cette activité protéolytique pourrait peut-être servir à réduire certains composés allergènes. Les protéines des céréales sont l'une des causes les plus fréquentes d'allergies alimentaires. Les protéines de blé peuvent provoquer des allergies classiques affectant la peau, le système digestif ou respiratoire, l'anaphylaxie induite par l'exercice physique, ou encore la rhinite ou asthme d'origine professionnelle [36, 39] ; la modification des protéines par la fermentation permettrait de réduire les propriétés allergènes des céréales. Par exemple, De Angelis *et al.* [36] ont prouvé la capacité du mélange probiotique VSL#3 à hydrolyser les allergènes de la farine de blé. Les albumines, globulines et gliadines extraites de la farine de blé, dans des pâtes acidifiées chimiquement ou par des starters, et les protéines totales extraites du pain ont été analysées par immunotransfert avec les sérums de patients allergiques au blé. Plusieurs protéines présentant une capacité de liaisons à l'immunoglobuline E (IgE : médiateur d'allergénicité) persistaient après traitement du pain à la levure de boulangerie à la

pepsine et à la pancréatine. Le signal de toutes ces protéines de liaison d'IgE disparaissait après un traitement supplémentaire au VSL#3. L'utilisation de la souche VSL#3 comme starter pour la fabrication du pain entraînait une dégradation marquée des protéines de blé, y compris certaines protéines de liaison d'IgE. De Angelis *et al.* [36] ont montré que le profil de ces protéines du pain fabriqué avec VSL#3 différait largement de celui du pain à la levure de boulangerie. Les protéines de liaison d'IgE qui persistaient dans le pain à base de VSL#3 étaient complètement dégradées par la pepsine et la pancréatine.

La forte dégradation de la prolamine du blé et du seigle a également ouvert la voie à de nouvelles utilisations de ces céréales, même dans le cadre de régimes sans gluten [23, 40, 41]. Une protéolyse contrôlée dans les pâtes de blé et de seigle a été proposée pour réduire le taux de gluten de sorte que les produits soient tolérés par les patients souffrant de la maladie cœliaque [42]. Si ces levains obtenus par fermentation longue ne peuvent pas être utilisés en l'état pour la production de pain, ils peuvent servir d'améliorants dans des recettes sans gluten. Un essai clinique de soixante jours a montré que des biscuits et gâteaux à base de farine hydrolysée à partir de protéases fongiques et de lactobacilles du levain n'étaient pas toxiques pour les personnes souffrant de la maladie cœliaque [43].

La qualité du pain sans gluten est souvent inférieure à celle des produits conventionnels (au blé) [2]. Toutefois, dégrader les prolamines du blé ou du seigle par une forte protéolyse permet de produire un pain sans gluten de bonne qualité grâce à la technologie du levain [40, 42]. Mais le concept d'élimination complète du gluten est controversé. On considère que le gluten est essentiel pour les produits de boulangerie à base de blé ; son élimination totale du blé et du seigle, quoique possible, pose des difficultés techniques en boulangerie industrielle. L'utilisation de seigle germé dans les levains pourrait permettre d'éviter en partie cette controverse dans la mesure où l'absorption de l'eau et la rétention de gaz dans les pâtes de seigle sont dues aux pentosanes qui ne sont pas affectés par la protéolyse [30]. De Angelis *et al.* [23] ont montré que la fermentation par des bactéries lactiques du levain sélectionnées a permis de réduire l'intolérance à la farine de seigle [44, 45] grâce à l'utilisation de farine de blé et de seigle germés favorisant la protéolyse et la dégradation efficace des prolamines du blé et du seigle.

Récemment, des chercheurs ont prouvé que la fermentation au levain peut favoriser la formation de peptides bioactifs [46-48]. Il s'agit de fragments protéiques spécifiques qui ont des effets positifs sur les fonctions organiques ou des maladies et qui peuvent avoir un impact sur la santé humaine. En général, les peptides bioactifs correspondent à des séquences spécifiques de protéines natives, libérées par hydrolyse par des enzymes digestives, microbiennes et protéolytiques végétales et leur taux augmente généralement durant la fermentation d'aliments. Selon Coda *et al.* [46], qui se sont basés sur des études *in vitro* et *in vivo*, les peptides bioactifs ont présenté un large spectre de fonctions biologiques avec des activités comparables aux opiacées, de type : complexation de minéraux, immuno-modulateurs, antimicrobiennes, antioxydantes, antithrombotiques, hypocholestérolémiques et antihypertensives. La capacité des bactéries lactiques sélectionnées à produire des peptides antioxydants durant la fermentation au levain en utilisant différentes farines de céréales comme substrats a été démontrée [46].

L'activité anti-radriculaire d'extraits solubles de levains en solution saline est considérablement ( $P < 0,05$ ) plus élevée que celle des pâtes acidifiées par ajout chimique. Leur étude identifiait vingt-cinq peptides de 8 à 57 résidus d'acides aminés et presque toutes les séquences partageaient des caractéristiques de composition analogue à celles de peptides antioxydants. Toutes les fractions purifiées présentaient une activité antioxydante *ex vivo* sur des fibroblastes de souris exposés artificiellement à un stress oxydatif. Actuellement, les peptides antioxydants dérivés de protéines alimentaires suscitent un intérêt croissant et de plus en plus d'éléments prouvent que les peptides bioactifs préviennent les stress oxydatifs associés à de nombreuses maladies dégénératives liées au vieillissement (par ex. cancer et artériosclérose) [49].

Rizzello *et al.* [47] ont exploité le potentiel des bactéries lactiques du levain pour libérer la lunasine, un peptide anticarcinogène, durant la fermentation de farines de céréales et de farines non conventionnelles. Ils ont utilisé certaines bactéries lactiques comme starters pour fermenter des farines complètes de blé, de soja, d'orge, d'amarante et de seigle. Leur étude a permis d'identifier la lunasine extraite du levain et de montrer que sa concentration augmentait de deux à quatre fois lors de la fermentation.

Sur un plan pratique, la confection de produits de boulangerie à base de céréales repose actuellement sur un processus fortement accéléré. Les fermentations prolongées au levain, caractérisées par un mélange de bactéries lactiques et de levures acidifiantes et protéolytiques, ont été presque intégralement remplacées par l'utilisation de levure de boulangerie voire de levure chimique ou. Dans ces conditions technologiques, la dégradation des composants des céréales (par ex. protéines) durant la fabrication est très faible, voire inexistante, ce qui donne des produits moins digestes que les produits de boulangerie anciens et traditionnels, à base de levain [41].

### **9.2.3 Les fibres alimentaires**

Les fibres alimentaires sont composées de polysaccharides végétaux et de lignine, résistants à l'hydrolyse par les enzymes digestives de l'homme. Une consommation élevée de fibres alimentaires peut réduire le risque de maladies cardiovasculaires, de diabète, d'hypertension, d'obésité et de troubles gastro-intestinaux [50, 51]. Les produits céréaliers sont une source importante de fibres alimentaires ; comme aliments de base, ils constituent un groupe alimentaire essentiel pour augmenter l'apport en fibres alimentaires, actuellement insuffisant. La fermentation au levain offre deux options principales pour favoriser l'utilisation de produits enrichis en fibres : (1) c'est une technologie de choix pour la fabrication du pain complet, en particulier de seigle et (2) elle peut servir à modifier les composants des céréales riches en fibres, comme le son ou le germe, pour optimiser la fonctionnalité technologique.

Le seigle et le blé complets sont d'excellentes sources de fibres alimentaires. En revanche, une teneur élevée en fibres pose des problèmes technologiques en boulangerie. La fermentation au levain est une étape essentielle du processus de fabrication de produits de boulangerie au seigle complet [2].

Sans levain, la farine de seigle complète ou les mélanges de farines de blé et de seigle sont très difficiles à transformer ; le levain améliore également la qualité globale et la conservation des pains au seigle complet. La fermentation au levain sur base de seigle, en plus d'améliorer le goût et la consistance du pain de seigle, permet la consommation de seigle complet, bien connu pour ses qualités nutritionnelles et ses bienfaits pour la santé. Le levain de son (ou son préfermenté) est un moyen potentiel d'améliorer la qualité des pains riches en fibres [4, 52-54]. L'utilisation de son préfermenté augmente le volume du pain et le moelleux de la mie des pains de blé à teneur élevée en fibres [4, 52, 55] ; le pain contenant 10 % de son fermenté fournit les meilleures propriétés sensorielles du pain [53]. On pense que l'impact de la fermentation est lié au contrôle du microbiote endogène du son, de l'activité endogène de la xylanase et de la solubilisation des arabinoxylanes qui en résulte durant la fermentation du son [4]. L'activité enzymatique et les caractéristiques du gluten de la pâte qui contient du son fermenté vont être modifiées par l'acidité produite durant la fermentation avec, en conséquence, un pH plus bas. La teneur en fibres du son ne varie pas beaucoup durant une fermentation brève, mais peut baisser sensiblement en cas de fermentation prolongée à cause de l'hydrolyse des structures des parois cellulaires (Katina, données non publiées).

L'utilisation d'enzymes ( $\alpha$ -amylase, xylanase, lipase) associée à la fermentation du son par la levure augmente le volume du pain et le rend plus moelleux [55]. Le son fermenté favorise la rétention de dioxyde de carbone de la pâte et l'utilisation d'enzymes renforce cet effet. En outre, l'ajout d'arabinoxylanes et de xylanases insolubles augmente le volume du pain au levain [56]. Les arabinoxylanes sont une source de xylose et d'arabinose, qui accélèrent l'acidification et ont une action positive sur le métabolisme de la microflore du levain. La fermentation au levain améliore la fonctionnalité technologique du son comme ingrédient de boulangerie, mais modifie aussi probablement la qualité des fibres alimentaires. Les effets physiologiques des fibres alimentaires dépendent de caractéristiques chimiques, mais aussi physiques, notamment du degré de polymérisation des polysaccharides, de la présence de chaînes latérales et du degré de réticulation, de la taille des particules et de l'intégrité des parois cellulaires [51]. En raison de la solubilisation des arabinoxylanes, la fermentation au levain peut influencer le profil fermentaire et produire également des oligosaccharides prébiotiques [57]. Elle peut aussi avoir un impact sur la bioaccessibilité des éléments phytochimiques associés au complexe de fibres alimentaires, comme montré ci-après.

Le germe de blé, outre des vitamines et des lipides, contient une quantité importante de fibres alimentaires. Récemment, des chercheurs ont constaté que la fermentation du germe de blé augmente le volume de pain et en diminue la fermeté [58]. L'utilisation de germe de blé comme source de fibres alimentaires pour le pain est encore limitée en raison de sa faible stabilité de conservation. Les fortes activités de la lipase et de la lipoxygénase entraînent une sensibilité à l'oxydation qui provoque la libération d'acides gras libres et ainsi le rancissement des produits de boulangerie. La fermentation au levain a permis de stabiliser et favoriser certaines propriétés nutritionnelles et chimiques du germe de blé. En raison de la fermentation lactique, l'activité de la lipase du germe de blé fermenté du levain est plus réduite que celle du germe de blé cru [58].

## 9.3 Les micronutriments

### 9.3.1 Les vitamines

Les produits céréaliers complets sont une source importante de vitamines, comme la thiamine, la vitamine E et les folates. La fermentation à la levure augmente la teneur en folates durant le processus de pré-fermentation de la farine et du son de blé [32, 59] et du seigle [32, 59, 60], avec une multiplication par deux de la teneur en folates dans la fermentation du seigle [60]. La présence de levure apparaît comme un facteur crucial pour augmenter la production de folates dans le levain de seigle, car les bactéries du levain n'ont qu'un effet limité sur la synthèse des folates [61]. La capacité à produire des folates varie en fonction des souches de levure ; ainsi, une souche qui produit beaucoup de folates pourrait servir d'alternative à l'enrichissement en folates [62, 63]. La teneur en folates des produits céréaliers fermentés peut être également augmentée par l'utilisation de céréales maltées ou germées, comme l'ont montré Jagerstad *et al.* [64]. Par contre, Gujska *et al.* ont fait état d'une baisse de 25 à 38 % de la teneur en folates dans les pains fermentés à partir de levure et de bactéries lactiques. [65].

Il a été observé que le taux de thiamine augmente, surtout en cas de fermentation prolongée à partir de levure de boulangerie [8, 66], mais diminue aussi durant le processus de panification courant [67]. Une fermentation longue sur levure ou levain a permis de maintenir la teneur originelle en vitamine B1 durant la fabrication de pain de blé complet, contrairement à un processus court, qui l'a réduite. La fabrication de pain de blé complet à partir de levure (du pétrissage au produit fini cuit) avec des fermentations longues a entraîné une hausse de 30 % de la riboflavine. La phase de fermentation peut donc favoriser la rétention de vitamines durant le processus de panification. L'utilisation de levure et de levain n'a pas eu d'effet synergique sur le taux de vitamine B [8]. La production de vitamine B2 à partir de certaines souches destinées à enrichir les pâtes et le pain a aussi été mise en évidence récemment par Capozzi *et al.* [68]. Ils ont constaté une hausse considérable de la teneur en vitamine B2 (respectivement deux et trois fois plus pour les pâtes et le pain), ce qui constitue une application biotechnologique alimentaire efficace et pratique pour la production de pâtes et de pain enrichis à la vitamine B2. Cette méthodologie pourrait être élargie à un grand nombre d'aliments, de fourrage et de boissons à base de céréales. Toutefois, la fermentation sur levure ou levain n'augmente pas automatiquement le taux de toutes les vitamines : on observe une baisse du taux de vitamine E durant la préparation du levain et de la pâte [69], ainsi qu'une baisse du taux des tocophérols et tocotriénols durant la fabrication de pain de seigle au levain [60].

### 9.3.2 Les minéraux

Les céréales complètes sont une bonne source de minéraux, comme le calcium, le potassium, le magnésium, le fer, le zinc et le phosphore. Comme le son du grain contient également de l'acide phytique (acide myo-inositol hexaphosphorique), la biodisponibilité des minéraux peut être limitée.

Cela a un impact important, surtout dans les pays en développement, où les carences en fer sont un trouble nutritionnel fréquent, en particulier chez les enfants et les femmes. Les céréales contiennent de 3 à 22 mg d'acide phytique par gramme [70], concentré dans les couches d'aleurone. Le phytate a une forte capacité de chélation et forme des complexes insolubles avec les cations alimentaires, ce qui bloque l'absorption des minéraux. Les phytases sont capables de déphosphoryler les phytates, formant des phosphates non organiques libres et des esters phosphate inositol, qui ont moins d'impact sur la solubilité et la biodisponibilité des minéraux. Il a été prouvé que le fer a une meilleure biodisponibilité chez la souris nourrie de pain au levain plutôt que de pain à pâte directe [71], et que l'absorption du zinc, du magnésium et du fer est plus élevée chez le rat nourri de pain au levain [72].

L'activité phytasique endogène des céréales est accélérée par l'environnement acide produit lors de la fermentation au levain. Les bactéries lactiques et les levures peuvent aussi présenter une activité phytasique. Le pH optimal pour la phytase du blé est 5,0, celui de la levure étant un peu plus bas, environ 3,5 [73]. Une légère baisse du pH à 5,5 durant la fermentation réduit le taux de phytate de la farine de blé complet de 70 % à cause de l'action renforcée de la phytase endogène de la farine [74]. L'activité phytasique endogène de la farine a bien plus d'influence que la phytase microbienne du levain. Aucune activité phytasique majeure n'a été observée dans les cinquante souches de bactéries lactiques isolées des levains [75], même si des études, dans lesquelles l'acide phytique était la seule source de carbone, montrent que des bactéries lactiques du levain sont capables de l'utiliser [76, 77]. Une activité phytasique a été détectée dans les levures de boulangerie commerciales [78] et des activités variables ont été détectées dans les starters de levain traditionnel qui contenaient des levures et des bactéries lactiques [79, 80]. Des souches de levure ayant une forte activité phytasique pourraient aussi être des supports potentiels de phytase dans le tractus gastro-intestinal [81].

L'action de la phytase dépend des conditions de fermentation : granulométrie de la farine, acidité, température, durée et teneur en eau [82, 83]. La fermentation au levain est plus efficace pour solubiliser les minéraux dans les farines de blé complet que dans le son. La granulométrie du son influencerait la solubilisation du calcium et du fer, qui aurait lieu uniquement si le son était finement moulu [7]. La pré-fermentation du son par des bactéries lactiques augmente la dégradation du phytate (jusqu'à 90 %) et augmente ainsi la solubilité du magnésium et du phosphore [84].

Des grains de blé et de seigle enrichis au sélénium ont été utilisés pour faire du pain au levain et ont été étudiés chez des volontaires pour explorer la biodisponibilité du sélénium [85, 86]. L'enrichissement au sélénium a été obtenu en incubant les grains dans une solution de sélénium. La teneur élevée en sélénium dans les matières premières s'est traduite par une teneur élevée dans le pain au levain et chez les personnes ayant consommé ce pain.

### 9.3.3 Les composés phytochimiques

Les composés phytochimiques sont des composés actifs sur le plan biologique dans les grains des céréales, qui semblent être parmi les facteurs contribuant aux propriétés protectrices des aliments à base de céréales complètes [87]. Les couches extérieures des grains, comme le son, contiennent bien plus d'éléments phytochimiques, comme des acides phénoliques, des alkylrésorcinols, des lignanes, des phytostérols, des tocols et des folates, que les couches intérieures [60, 88]. Leur transformation peut augmenter ou diminuer ces taux et modifier la biodisponibilité de ces composés [89] ; une revue de littérature de Bondia-Pons *et al.* porte sur les effets des composés phénoliques du seigle [90].

Des études récentes ont montré que le pain fabriqué à partir d'un mélange de son et de farine de blé, fermenté au levain a un potentiel antioxydant plus élevé que le pain à la farine de blé conventionnelle [91]. Le levain de seigle traditionnel favorise l'activité antioxydante (activité anti-radicaire mesurée au DPPH) dans la fraction de levain de seigle extraite du méthanol, avec une hausse parallèle des composés phénoliques facilement extractibles [60]. En conséquence, la capacité antioxydante des pains de seigle traditionnels au levain est plus élevée que celle du pain blanc, les valeurs les plus élevées ayant été observées dans les pains produits à base de farine complète [67, 92].

La fermentation du son de blé ou de seigle à la levure et en particulier avec ajout d'enzymes dégradant les parois cellulaires, a pu augmenter le taux d'acide férulique libre [4, 32, 93]. L'acide férulique est un composant structural des parois cellulaires, réticulé avec l'arabinoxylane. Étant donné que l'acide férulique est essentiellement lié par covalence aux structures des parois cellulaires, sa bioaccessibilité dans des conditions physiologiques est faible et la biotransformation pourrait être un moyen efficace de l'augmenter. Le pain de blé enrichi au son biotransformé voit augmenter la bioaccessibilité *in vitro* et *in vivo* des composés phénoliques ainsi que celle du métabolite colique, l'acide 3-phenylpropionique, et a exercé des effets anti-inflammatoires *ex-vivo* [93, 94].

## 9.4 Les exopolysaccharides microbiens

Les oligosaccharides alimentaires non digestibles modulent la composition et l'activité du microbiote intestinal et peuvent aussi avoir des effets bénéfiques sur la santé de l'homme, comme l'amélioration du transit intestinal, la prévention de la prolifération de bactéries pathogènes par la stimulation sélective de membres non pathogènes du microbiote intestinal et la hausse de la production des acides gras à chaîne courte (SCFA) [95]. La fermentation intestinale et les bénéfices pour la santé des fructo-oligosaccharides, galacto-oligosaccharides et xylo-oligosaccharides ont été bien documentés par des études chez l'homme et l'animal [96, 97]. Récemment, Ketabi *et al.* ont aussi démontré la stimulation de la croissance des bactéries lactiques de l'intestin chez le rat par les isomalto-oligosaccharides (IMO) [95].

Le lien entre régime alimentaire, microbiote intestinal et nutrition de l'hôte fait actuellement l'objet de recherches intensives et l'intégration des analyses fonctionnelles du microbiote intestinal et des génomes et métagénomes du levain vont peut-être permettre de concevoir des molécules prébiotiques dotées de propriétés fonctionnelles spécifiques [98].

Les microbes peuvent produire divers polysaccharides. Les exopolysaccharides (EPS) sont des biopolymères glucidiques sécrétés par les bactéries, les micro-algues et certaines levures et champignons filamenteux. Ils peuvent protéger les cellules de stress externes, comme la dessiccation et les substances antimicrobiennes, et servir de médiateurs aux interactions des cellules avec les supports et aussi les autres cellules, jouant ainsi un rôle important, par exemple dans la formation de biofilms. Les EPS se divisent en polysaccharides capsulaires, liés de façon plus ou moins étroite aux cellules, et en mucus extracellulaire excrété dans le milieu environnant. La production d'EPS peut généralement être mise en évidence sur un milieu solide et liquide, avec un aspect en colonie visqueux ou filant et une hausse de la viscosité du milieu. La masse des EPS microbiens varie fortement, de ~10 kDa à 1-2 mDa. En fonction de leur composition chimique, l'ensemble des EPS microbiens sont classés en homopolysaccharides (Hops), composés d'un seul type de monosaccharide, et en hétéropolysaccharides (Heps), composés d'au moins deux unités différentes de monosaccharide. En outre, différents constituants inorganiques ou organiques peuvent y être associés. Les complexités possibles des structures des polysaccharides sont presque infinies dans la mesure où, par exemple, même un disaccharide peut avoir huit liaisons différentes [99, 100].

Il a été montré que les lactobacilles des levains de blé et de seigle produisent des EPS [9, 101], en particulier des gluco-oligosaccharides [102] et des fructo-oligosaccharides, qui ont des propriétés prébiotiques [9]. Par exemple, *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590 produit 0,5 à 1 % de lévane (sur base farine) durant une fermentation de vingt-quatre heures dans les pâtes à base de blé ou de seigle [101]. Tieking *et al.* [103] ont étudié la capacité de sept bactéries lactiques fructane-positives ou glucane-positives (*L. sanfranciscensis* LTH 2581 et 2590, *L. frumenti* TMW 1.103, 1.660, 1.669, *L. pontis* TMW 1.675, *L. reuteri* TMW 1.1.06) à produire ces EPS durant la fermentation au levain sur farine de blé, en présence de 12 % de saccharose (sur la base farine). La production des mêmes EPS à hauteur de 0,5-2 g kg<sup>-1</sup> a été mise en évidence pour l'ensemble des souches. Les lévanes de *L. sanfranciscensis* peuvent aussi avoir des effets prébiotiques car ils sont dégradés de façon préférentielle par les bifidobactéries dans le tube digestif [101]. La formation par *L. reuteri* LTH5448 et *Weissella cibaria* 10M, d'oligosaccharides et de polysaccharides ayant un potentiel prébiotique, a également été mise en évidence dans les levains de sorgho [104].

## 9.5 Perspectives

La fermentation au levain est une méthode de transformation alimentaire très ancienne, traditionnellement utilisée pour améliorer la qualité des produits. Ces quinze dernières années, l'utilisation de la fermentation microbienne s'est également avérée efficace pour modifier activement la qualité nutritionnelle des produits céréaliers. En raison des interactions complexes entre le microbiote et la matrice alimentaire dans un levain, la fermentation peut être orientée afin d'obtenir des modifications nutritionnelles multifonctionnelles des milieux et produits fermentés, que ceux soient traditionnels ou innovants.

À l'avenir, la technologie du levain peut permettre d'utiliser et d'améliorer efficacement les produits issus de la transformation alimentaire et non alimentaire, de fournir de nouvelles fonctionnalités aux protéines et de produire des oligosaccharides et des polysaccharides innovants donnant lieu à de nouvelles avancées nutritionnelles, comme, par exemple la substitution des sucres ou des matières grasses. Elle présente également un potentiel pour favoriser et modifier la biodisponibilité de composants alimentaires mineurs ayant une forte activité biologique. Les fermentations nouvelle génération à partir de levure et de bactéries lactiques peuvent donc être considérées comme des process biologiques efficaces pour modifier les céréales ainsi que d'autres matières fermentescibles afin de produire des aliments adaptés aux besoins nutritionnels de l'homme et des animaux.

## Références

1. Poutanen K, Flander F, Katina K (2009) Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol* 26:693–699
2. Katina K, Arendt E, Liukkonen K-H, Autio K, Flander L, Poutanen K (2005) Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends Food Sci Technol* 16(1–3):104–112
3. Valjakka TT, Kerojoki H, Katina K (2003) Chapter 11: Sourdough bread in Finland and Eastern Europe. In: Kulp K, Lorenz K (eds) *Handbook of dough fermentations*. Marcel Dekker Inc, New York, USA
4. Katina K, Juvonen R, Laitila A, Flander L, Nordlund E, Kariluoto S, Piironen V, Poutanen K (2012) Fermented wheat bran as a functional ingredient in baking. *Cereal Chem* 89(2): 126–134
5. 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. *J Cereal Sci* 51(1):152–158
6. Novotni D, Ćurić D, Bituh M, Barić IC, Škevin D, Čukelj N (2011) Glycemic index and phenolics of partially baked frozen bread with sourdough. *Int J Food Sci Nutr* 62(1):26–33
7. Lioger D, Leenhardt F, Demigne C, Remesy C (2007) Sourdough fermentation of wheat fractions rich in fibres before their use in processed food. *J Sci Food Agric* 87:1368–1373
8. Batifoulou F, Verny M-A, Chanliaud E, Rémésy C, Demigne C (2005) Effect of different breadmaking methods on thiamine, riboflavin and pyridoxine contents of wheat bread. *J Cereal Sci* 42:101–108
9. Tiekink M, Gänzle M (2005) Exopolysaccharides from cereals associated lactobacilli. *Trends Food Sci Technol* 16:79–84
10. Barclay AW, Petocz P, McMillan-Price J, Flood VM, Prvan T, Mitchell P, Brand-Miller JC (2008) Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk – a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr* 87:627–637
11. Leloup VM, Colonna P, Ring SG (2004)  $\alpha$ -Amylase adsorption on starch crystallites. *Biotechnol Bioeng* 38:127–134

12. Zhang G, Hamaker B (2009) Slowly digestible starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Crit Rev Food Sci Nutr* 49:852–867
13. Singh J, Dartois A, Kaur L (2010) Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends Food Sci Technol* 21:168–180
14. Oates CG (1997) Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci Technol* 8:375–382
15. Lauro M, Suortti T, Autio K, Linko P, Poutanen K (1993) Accessibility of barley starch granules to  $\alpha$ -amylase during different phases of gelatinization. *J Cereal Sci* 17:125–136
16. Zhang G, Ao Z, Hamaker BR (2008) Nutritional property of endosperm starches from maize mutants: a parabolic relationship between slowly digestible starch and amylopectin fine structure. *J Agric Food Chem* 56:4686–4694
17. Björk I, Granfeldt Y, Liljeberg H, Tovar J, Asp NG (1994) Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates. *Am J Clin Nutr* 59:699S–705S
18. Zhang G, Venkatachalam M, Hamaker BR (2006) Structural basis for the slow digestion property of native cereal starch. *Biomacromolecules* 7:3259–3266
19. Östman E (2003) Fermentation as a means of optimizing the glycaemic index – food mechanisms and metabolic merits with emphasis on lactic acid in cereal products. Ph.D. thesis, Lund University, Department of Applied Nutrition and Food Chemistry
20. Zhang G, Sofyan M, Hamaker BR (2008) Slowly digestible state of starch: mechanism of slow digestion property of gelatinized maize starch. *J Agric Food Chem* 56:4695–4702
21. Fardet A, Leenhardt F, Lioger D, Scalbert A, Rémésy C (2006) Parameters controlling the glycaemic response to breads. *Nutr Res Rev* 19:18–25
22. Liljeberg H, Lönner C, Björck I (1995) Sourdough fermentation or addition of organic acids or corresponding salts to bread improves nutritional properties of starch in healthy humans. *J Nutr* 125:1503–1511
23. De Angelis M, Coda R, Silano M, Minervini F, Rizzello C, Di Cagno R, Vicentini O, De Vincenzi M, Gobbetti M (2006) Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to decrease coeliac intolerance to rye flour. *J Cereal Sci* 43:301–314
24. De Angelis M, Damiano N, Rizzello CG, 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. *Eur Food Res Technol* 229:593–601
25. Maioli M, Pes GM, Sanna M, Cherchi S, Dettori M, Manca E, Farris GA (2008) Sourdough-leavened bread improves postprandial glucose and insulin plasma levels in subjects with impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol* 45:91–96
26. Juntunen K, Laaksonen D, Autio K, Niskanen L, Holst J, Savolainen K, Liukkonen K-H, Poutanen K, Mykkänen H (2003) Structural differences between rye and wheat bread but not total fiber content may explain the lower postprandial insulin response to rye bread. *Am J Clin Nutr* 78:957–964
27. Liljeberg H, Björck I (1998) Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar. *Eur J Clin Nutr* 52:368–371
28. Scazzina F, Del Rio D, Pellegrini N, Brighenti F (2009) Sourdough bread: starch digestibility and postprandial glycemic response. *J Cereal Sci* 49:419–421
29. Autio K, Liukkonen K-H, Juntunen K, Katina K, Laaksonen D, Mykkänen H, Niskanen L, Poutanen K (2003) Food structure and its relation to starch digestibility and glycaemic response. In: Fischer P, Marti I, Windhab EJ (eds) Third international conference of food rheology and structure, Zurich, 10–13 Feb 2003, pp 7–11
30. Gänzle M, Lopenen J, Gobbetti M (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. *Trends Food Sci Technol* 19:513–521
31. Nilsson M, Holst JJ, Björck IME (2007) Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am J Clin Nutr* 85:996–1004
32. Katina K, Laitila A, Juvonen R, Liukkonen K-H, Kariluoto S, Piironen V, Landberg R, Åman P, Poutanen K (2007) Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol* 24:175–186
33. Solomon TPJ, Blannin AK (2007) Effects of short-term cinnamon ingestion on in vivo glucose tolerance. *Diabetes Obes Metab* 9:895–901
34. Hardman Fredensborg M, Perry T, Mann J, Chisholm A, Rose M (2010) Rising methods and leavening agents used in the production of bread do not impact the glycaemic index. *Asia Pac J Clin Nutr* 19:188–194
35. Najjar AM, Parsons PM, Duncan AM, Robinson LE, Yada RY, Graham TE (2009) The acute impact of ingestion of breads of varying composition on blood glucose, insulin and incretins

- following first and second meals. *Br J Nutr* 101:391–398
36. De Angelis M, Rizzello CG, Scala E, De Simone C, Farris GA, Turrini F et al (2007) Probiotic preparation has the capacity to hydrolyze wheat protein responsible for food allergy. *J Food Prot* 70:135–144
  37. Burton P, Lightowler HJ (2006) Influence of bread volume on glycaemic response and satiety. *Br J Nutr* 96:877–882
  38. Rollán G, De Angelis M, Gobbetti M, de Valdez GF (2005) Proteolytic activity and reduction of gliadin-like fractions by sourdough lactobacilli. *J Appl Microbiol* 99:1495–1502
  39. Palosuo K (2003) Update on wheat hypersensitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3:205–209
  40. Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M et al (2004) Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. *Appl Environ Microbiol* 70:1088e1096
  41. Gobbetti M, Rizzello C, Di Cagno R, De Angelis M (2007) Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol* 24:187–196
  42. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I et al (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507
  43. Greco L, Gobbetti M, Auricchio R, Di Mase R, Landolfo F, Paparo F, Di Cagno R, De Angelis M, Rizzello CG, Cassone A, Terrone G, Timpone L, D’Aniello M, Maglio M, Troncone R, Auricchio S (2011) Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9(1):24–29
  44. Loponen J, Kanerva P, Zhang C, Sontag-Strohm T, Salovaara H, Gänzle M (2009) Prolamin hydrolysis and pentosan solubilization in germinated-rye sourdoughs determined by chromatographic and immunological methods. *J Agric Food Chem* 57:746–753
  45. Loponen J, Sontag-Strohm T, Venäläinen J, Salovaara H (2007) Prolamin hydrolysis in wheat sourdoughs with differing proteolytic activities. *J Agric Food Chem* 55:978–984
  46. Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours. *Appl Environ Microbiol* 78(4):1087–1096
  47. Rizzello CG, Nionelli L, Coda R, Gobbetti M (2012) Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutr Cancer* 64:111–120
  48. Rizzello CG, Cassone A, Di Cagno R, Gobbetti M (2008) Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and gamma-aminobutyric acid (GABA) during sourdough fermentation by selected lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem* 56:6936–6943
  49. Adebisi AP, Adebisi AO, Yamashita J, Ogawa T, Muramoto K (2009) Purification and characterization of antioxidative peptides derived from rice bran protein hydrolysates. *Eur Food Res Technol* 228:553–563
  50. Anderson JW, Baird P, Davis RH Jr, Ferreri S, Knudtson M, Karaym A, Waters V, Williams CL (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutr Rev* 67:188–205
  51. Räninen K, Lappi J, Mykkänen H, Poutanen K (2011) Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose. *Nutr Rev* 69:9–21
  52. Salmenkallio-Marttila M, Katina K, Autio K (2001) Effect of bran fermentation on quality and microstructure of high-fiber wheat bread. *Cereal Chem* 78:429–435
  53. Eiman G, Amir M, Alkareem A, Moniem A, Mustafa A (2008) Effect of fermentation and particle size of wheat bran on the antinutritional factors and bread quality. *Pak J Nutr* 7:521–526
  54. Katina K, Liukkonen K-H, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen S-M, Lampi A-M, Pihlaja J-M, Poutanen K (2007) Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J Cereal Sci* 46:348–355
  55. Katina K, Salmenkallio-Marttila M, Partanen R, Forsell P, Autio K (2006) Effects of sourdough and enzymes on staling of high-fibre wheat bread. *LWT- Food Sci Technol* 39:479–491
  56. Corsetti A, Gobbetti B, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F, Rossi J (2000) Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem* 48:3044–3051
  57. Broekart WF, Courtin CM, Verbeke K, van de Wiele T, Verstraete W, Delcort JA (2011) Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Crit Rev Food Sci Nutr* 51:178–194

58. Rizzello CG, Cassone A, Coda R, Gobbetti M (2011) Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem* 127(3):952–959
59. Kariluoto S, Vahteristo L, Salovaara H, Katina K, Liukkonen K-H, Piironen V (2004) Effect of baking method and fermentation on folate content of rye and wheat breads. *Cereal Chem* 81:134–139
60. Liukkonen K-H, Katina K, Wilhelmson A, Myllymäki O, Lampi A-M, Kariluoto S, Piironen V, Heinonen S-M, Nurmi T, Adlercreutz H, Peltoketo A, Pihlavan J-M, Hietaniemi V, Poutanen K (2003) Process-induced changes on bioactive compounds in whole grain rye. *Proc Nutr Soc* 62:117–122
61. Kariluoto S, Aittamaa M, Korhola M, Salovaara H, Vahteristo L, Piironen V (2006) Effects of yeasts and bacteria on the levels of folates in rye sourdoughs. *Int J Food Microbiol* 106:137–143
62. Hjortmo S, Patring J, Jastrebova J, Andlid T (2008) Biofortification of folates in white wheat bread by selection of yeast strain and process. *Int J Food Microbiol* 127:32–36
63. Hjortmo S, Patring J, Jastrebova J, Andlid T (2005) Inherent biodiversity of folate content and composition in yeasts. *Trends Food Sci Technol* 16:311–316
64. Jägerstad M, Piironen V, Walker C, Ros G, Carnovale E, Holasova M, Nau H (2005) Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. *Trends Food Sci Technol* 16:298–306
65. Gujska E, Michalak J, Klepacka J (2009) Folate stability in two types of rye breads during processing and frozen storage. *Plant Foods Hum Nutr* 64:129–134
66. Ternes W, Freund W (1988) Effects of different doughmaking techniques on thiamin content of bread. *Getreide Mehl Brot* 42:293–297
67. Martinez-Villaluenga C, Michalska A, Frias F, Piskula M-K, Vidal-Valverde C, Zielinski H (2009) Effect of flour extraction rate and baking on thiamine and riboflavin content and antioxidant capacity of traditional rye bread. *J Food Sci* 74:49–55
68. Capozzi V, Menga V, Digesù AM, De Vita P, Van Sinderen D, Cattivelli L, Fares C, Spano G (2011) Biotechnological production of vitamin B<sub>2</sub>-enriched bread and pasta. *J Agric Food Chem* 59:8013–8020
69. Wennermark B, Jägerstad M (1992) Breadmaking and storage of various wheat fractions affect vitamin E. *J Food Sci* 57:1205–1209
70. García-Esteva R, Guerra-Hernández E, García-Vilanova B (1999) Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Res Int* 32:217–221
71. Chaoui A, Faid M, Belahsen R (2006) Making bread with sourdough improves iron bioavailability from reconstituted fortified wheat flour in mice. *J Trace Elem Med Biol* 20:217–220
72. Lopez H, Duclos V, Coudray C, Krespine V, Feillet-Coudray C, Messenger A, Demigné C, Rémesy C (2003) Making bread with sourdough improves mineral bioavailability from reconstituted whole wheat flour in rats. *Nutrition* 19:524–530
73. Türk M, Carlsson N, Sandberg A-S (1996) Reduction of the levels of phytate during whole-meal bread baking: effects of yeast and wheat phytases. *J Cereal Sci* 23:257–264
74. Leenhardt F, Levrat-Verny M-A, Chanliaud E, Remesy C (2005) Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. *J Agric Food Chem* 53:98–102
75. Reale A, Konietzny U, Coppola R, Sorrentino E, Greiner R (2007) The importance of lactic acid bacteria for phytate degradation during cereal dough fermentation. *J Agric Food Chem* 55:2993–2997
76. Shirai K, Revah-Moiseev S, García-Garibay M, Marshall V (1994) Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. *Lett Appl Microbiol* 19:366–369
77. Lopez H, Ouvre A, Bervas E, Guy C, Messenger A, Demigne C, Remesy C (2000) Strains of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs degrade phytic acid and improve calcium and magnesium solubility from whole wheat flours. *J Agric Food Chem* 48:2281–2285
78. Türk M, Sandberg A-S, Carlsson N, Andlid T (2000) Inositol hexaphosphate hydrolysis by baker's yeast. Capacity, kinetics and degradation products. *J Agric Food Chem* 48:100–104
79. Chaoui A, Faid M, Belhcen R (2003) Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. *East Mediterr Health J* 9:141–147
80. Reale A, Mannina L, Tremonte P, Sobolev AP, Succi M, Sorrentino E, Coppola R (2004) Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeast during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. *J Agric Food Chem* 52:6300–6305
81. Haraldsson A-K, Veide J, Andlid T, Larsson Alminger M, Sandberg A-S (2005) Degradation

- of phytate by high phytase *Saccharomyces cerevisiae* during simulated gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 53:5438–5444
82. Harinder K, Tiwana AS, Kaur B (1998) Studies on the baking of whole wheat meals; effect of pH, acids, milling and fermentation on phytic acid degradation. *Adv Food Sci* 20:181–189
83. De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PL, Faccia M, Giovine M, Gobbetti M (2003) Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int J Food Microbiol* 87:259–270
84. Lopez H, Krspine V, Guy C, Messenger A, Demigne C, Remesy C (2001) Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J Agric Food Chem* 49:2657–2662
85. Bryszewska MA, Ambroziak W, Diowski A, Baxter MJ, Langford NJ, Lewis DJ (2005) Changes in the chemical form of selenium observed during the manufacture of a selenium-enriched sourdough bread for use in a human nutrition study. *Food Addit Contam* 22(2):135–140
86. Bryszewska MA, Ambroziak W, Langford NJ, Baxter MJ, Colyer A, Lewis DJ (2007) The effect of consumption of selenium enriched rye/wheat sourdough bread on the body's selenium status. *Plant Foods Hum Nutr* 62:121–126
87. Slavin J (2003) Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proc Nutr Soc* 62:129–134
88. Mattila P, Pihlava J-M, Hellström J (2005) Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *J Agric Food Chem* 53:8290–8295
89. Slavin J, Jacobs D, Marquardt L (2000) Grain processing and nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40:309–326
90. Bondia-Pons I, Aura A-M, Vuorela S, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K (2009) Rye phenolics in nutrition and health. *J Cereal Sci* 49:323–336
91. Rizzello CG, Coda R, Mazzacane F, Minervini D, Gobbetti M (2012) Micronized by-products from debranned durum wheat and sourdough fermentation enhanced the nutritional, textural and sensory features of bread. *Food Res Intern* 46:304–313
92. Michalska A, Ceglinska A, Amarowicz R, Piskula M-K, Szawara-Nowak D, Zielinski H (2007) Antioxidant contents and antioxidative properties of traditional rye breads. *J Agric Food Chem* 55:734–740
93. Mateo Anson N, Selinheimo E, Havenaar R, Aura A-M, Mattila I, Lehtinen P, van den Berg R, Haenen GRMM, Poutanen K, Bast A (2009) Effect of bioprocessing on in vitro bioaccessibility of phenolic acids and their microbial metabolites from wheat bran. *J Agric Food Chem*
94. Mateo Anson N, Aura A-M, Selinheimo E, Mattila I, Poutanen K, van den Berg R, Havenaar R, Bast A, Haenen GR (2011) Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts anti-inflammatory effects ex vivo. *J Nutr* 141(1):137–143
95. Ketabi A, Dieleman LA, Gänzle MG (2011) Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J Appl Microbiol* 110:1297–1306
96. Meyer D, Stasse-Wolthuis M (2009) The bifidogenic effect of inulin and ligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr* 63:1277–1289
97. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF (2010) Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull* 7:1–19
98. Candela M, Fiori J, Dipalo S, Brigidi P (2010) Development of a high-performance affinity chromatography-based method to study the biological interaction between whole microorganisms and target proteins. *Lett Appl Microbiol* 51:678–682
99. De Vuyst L, Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23:153–177
100. Sutherland IW (2001) The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9:222–227
101. Korakli M, Gänzle M, Vogel R (2002) Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J Appl Microbiol* 92:958–965
102. Seo E-C, Nam S-H, Kang H-K, Cho J-Y, Lee H-S, Ryu H-W, Kim D (2007) Synthesis of thermo- and acid-stable novel oligosaccharides by using dextranucrase with high concentration of sucrose. *Enzyme Microb Technol* 40:1117–1123
103. Tiekling M, Korakli M, Ehrmann MA, Gänzle MG, Vogel RF (2003) In situ production of

- exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:945–952
104. 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 Chem* 85:679–684

## Chapitre 10

# Levain et produits sans gluten

Elke K. Arendt et Alice V. Moroni

### 10.1 Introduction : les produits céréaliers sans gluten

La maladie cœliaque est l'une des intolérances alimentaires les plus courantes, avec une prévalence d'1 % dans le monde, un chiffre qui devrait augmenter [1]. Pour les personnes souffrant de cette intolérance, l'unique solution efficace est d'éliminer définitivement toutes les céréales contenant du gluten et les produits à base de ces céréales. Dans le cadre d'un régime sans gluten, tous les produits à base d'orge, de Kamut, d'avoine, de blé et leurs dérivés contenant plus de 20 mg/kg total sont proscrits [2]. La demande de produits sans gluten étant en forte hausse, les spécialistes de la transformation alimentaire et les fabricants sont appelés à satisfaire les exigences croissantes des consommateurs desdits produits [3]. Les personnes souffrant d'une intolérance ou d'une allergie au gluten demandent notamment des produits sans gluten de bonne qualité, avec une consistance et des propriétés sensorielles et nutritionnelles similaires aux produits traditionnels [4, 5]. Néanmoins, la substitution du gluten par d'autres ingrédients non toxiques dans des produits courants, principalement le pain et les pâtes, constitue un obstacle technologique majeur pour l'industrie alimentaire. En effet, le gluten est la protéine qui forme la structure de la farine, responsable des propriétés viscoélastiques uniques (extensibilité, résistance à la déformation, tolérance au pétrissage et capacité de rétention des gaz) de la pâte [6]. Les protéines présentes dans les farines sans gluten n'ont pas ces caractéristiques structurelles fondamentales et, lors du mélange, donnent une pâte molle, semblable à celle d'un gâteau [7].

---

E.K. Arendt (\*)

School of Food Science, Food Technology and Nutrition,  
National University of Ireland, Cork, Irlande

Department of Food and Nutritional Sciences,  
University College Cork, Western Road, Cork, Irlande  
e-mail : e.arendt@ucc.ie

A.V. Moroni

School of Food Science, Food Technology and Nutrition,  
National University of Ireland, Cork, Irlande

National Food Biotechnology Centre, National University of Ireland, Cork, Irlande

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*,  
DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0\_10, © Springer Science+Business Media New York 2013

Les pâtes à pain sans gluten ayant de moins bonnes propriétés rhéologiques que les pâtes traditionnelles, la plupart des produits sans gluten disponibles sur le marché sont caractérisés par une qualité globale médiocre, un manque goût, une consistance et une sensation en bouche désagréables [4, 8]. En outre, étant donné que les produits sans gluten sont essentiellement fabriqués à partir d'amidon et ne sont généralement pas enrichis [9], ils apportent peu de nutriments, comme le folate, les vitamines B, le fer et les fibres alimentaires [10, 11].

Ces dix dernières années, la plupart des recherches universitaires sur les produits sans gluten se sont concentrées sur l'amélioration de la qualité des pains sans gluten pour répondre aux attentes des consommateurs en termes d'aspect, de structure et d'apport nutritionnel du pain. Des avancées récentes ont été obtenues grâce à l'incorporation de grains entiers riches en nutriments dans les formules de pain sans gluten [12-14]. L'attention s'est notamment portée sur les pseudo-céréales, comme l'amarante, le sarrasin et le quinoa, en raison de la qualité de leurs protéines et de leur apport élevé en fibres, minéraux et éléments phytochimiques [15, 16]. L'incorporation de pseudocéréales dans les formules sans gluten a permis d'améliorer sensiblement la qualité de cuisson de la pâte et les apports nutritionnels du pain sans gluten [12, 13, 17, 18]. Toutefois, ces farines « saines » ne sont pas encore généralisées pour la fabrication de produits sans gluten. Par ailleurs, l'incorporation de prébiotiques semble aussi être une solution efficace pour améliorer la teneur en fibres des pains sans gluten produits à partir d'amidon [19].

Les tentatives visant à améliorer la texture du pain sans gluten sont surtout ralenties par l'absence d'essais de panification normalisés des farines sans gluten. Par exemple, une étude récente a montré que la composition physicochimique (teneur en amidon, granulométrie et taux d'amidon endommagé) de la farine d'avoine peut avoir un fort impact sur la panification [20]. Il n'existe toutefois pas de lignes directrices pour évaluer la valeur boulangère des farines sans gluten.

Divers additifs, comme des amidons, des hydrocolloïdes, des protéines non toxiques, des enzymes et leur combinaison, ont été étudiés pour améliorer la structure et la capacité de rétention de gaz des pâtes à pain sans gluten. En raison de leurs propriétés structurantes [21], les hydrocolloïdes ont été largement utilisés pour imiter les propriétés viscoélastiques du gluten [22]. L'hydroxypropyl-méthylcellulose (HPMC), la carboxyméthylcellulose (CMC) ou la méthylcellulose (MC), la farine de graines de caroube, la gomme de guar, le xanthane et les pectines ont été particulièrement efficaces [9, 14, 23, 24, 25]. Globalement, ces recherches montrent que les améliorations de qualité obtenues par rapport à la rétention de gaz, à la texture de la mie, au volume et à la durée de conservation, sont liées à la quantité d'hydrocolloïdes utilisés et à l'interaction entre le type de farine et le type d'hydrocolloïde incorporé.

Des protéines non toxiques peuvent aussi favoriser la formation de la structure des pains sans gluten. Les protéines de lait, de légumes et d'œufs peuvent induire la formation d'une matrice similaire au gluten dans la pâte et ainsi améliorer le volume et la texture de la mie du pain obtenu [14, 18, 26, 27]. Quant aux hydrocolloïdes, les effets positifs des protéines ajoutées dépendent fortement de l'interaction entre le type de farine et la nature des protéines [25]. Toutefois, l'utilisation de protéines structurantes peut poser problème dans la mesure où ces ingrédients peuvent être des allergènes potentiels pour les personnes souffrant de la maladie cœliaque [28].

La transformation enzymatique des farines sans gluten a aussi fait l'objet de nombreuses études. Les enzymes favorisant la réticulation, en particulier, comme la transglutaminase (TGase), la cyclodextrine glycosyltransférase, la glucose oxydase [23, 29, 30, 44] et les protéases [31] améliorent les propriétés viscoélastiques de la pâte et la qualité du pain. La TGase s'est avérée particulièrement efficace pour les pains sans gluten produits à partir de farines de riz et de sarrasin, utilisées seules ou combinées à d'autres ingrédients [32, 33]. Renzetti *et al.* [33] ont notamment montré que le mode d'action et les effets de la TGase sur le comportement pseudoplastique de la pâte et, par conséquent, sur la qualité du pain, varient en fonction des matières premières. La glucose oxydase a également été utilisée comme améliorant pour les pains à base de riz et d'avoine sans gluten [23, 29]. Il est intéressant de constater que l'hydrolyse protéique a amélioré la valeur boulangère de la farine de riz en réduisant la résistance à la déformation de la pâte durant la cuisson [31]. Le fait que les traitements favorisant la structure ne sont pas les seuls moyens d'améliorer la panification à base de farines sans gluten, offre de nouvelles perspectives pour les produits de boulangerie sans gluten [30, 34].

Globalement, même si durant la dernière décennie, la qualité des pains sans gluten a été améliorée, la production de pain sans gluten de qualité supérieure reste difficile. Compte tenu de l'absence d'essais de panification normalisés, du coût élevé des additifs analysés et de la grande variabilité des interactions entre les farines et les additifs, il faut envisager d'autres moyens de produire des pains sans gluten de qualité. Ce chapitre examine les récents progrès réalisés dans l'application du levain comme moyen économique, efficace et naturel d'améliorer la qualité du pain sans gluten.

## 10.2 Pain au levain

Le levain est un mélange de farine et d'eau, fermenté par bactéries lactiques et levures, qui sont ajoutées comme starter ou développées dans la farine en tant que ferment [35, 36]. Durant la fermentation du levain, les bactéries lactiques résidentes sont le principal facteur d'acidification de la pâte et de synthèse des composés aromatiques, des exopolysaccharides, des enzymes et des composés antifongiques [37-39]. L'ajout de levain peut avoir un fort impact sur la qualité du pain, en termes de consistance, de conservation et de profil organoleptique et nutritionnel [5, 40]. Une connaissance approfondie des événements métaboliques et des interactions microbiologiques durant la fermentation du levain est cruciale pour contrôler la fermentation et garantir la qualité constante du pain au levain. Cependant si de nombreuses recherches ont été consacrées aux levains de blé et de seigle, par exemple sur leur composition microbienne et leurs propriétés fonctionnelles et organoleptiques [35], peu d'information sur les levains sans gluten est disponible [41-51]. Malgré leur nombre limité, ces études montrent que les farines sans gluten constituent une source unique de souches nouvelles et que le levain sans gluten peut permettre de modifier les propriétés rhéologiques des pâtes à pain sans gluten et de produire des pains sans gluten de qualité (Tableaux 10.1 et 10.2). Ce chapitre présente les résultats obtenus récemment sur l'application de la fermentation au levain aux farines sans gluten.

**Tableau 10.1** Fermentation du levain sans gluten et effets sur les propriétés des pâtes à pain et des pains sans gluten (SG)

| Substrat/starter                                                                                  | Propriétés du levain                                                                 | Effets sur une pâte SG                    | Effets sur un pain SG                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Farine de sorgo – <i>L. plantarum</i> [48]                                                        | Protéolyse de protéines hydrosolubles                                                | Gel d'amidon plus résistant               | Amélioration du volume de pain et de la structure de la mie                   |
| Farine de sorgo – <i>W. cibaria</i> [52]                                                          | Synthèse de dextrane et GOS                                                          |                                           | Mie plus moelleuse et présence de GOS non digérés                             |
| Farine de sorgo – <i>W. kimchii</i> ou <i>W. cibaria</i> MG1 [41]                                 | Synthèse de dextrane et GOS<br>Production de faibles quantités d'acétate             | Meilleures propriétés viscoélastiques (?) | Amélioration de la structure de la mie et du volume, rassissement retardé (?) |
| Formule composite –<br><i>L. plantarum</i> FST 1.7 [44]                                           | Production de composés antifongiques<br>Activation d'enzymes endogènes               | Meilleure élasticité                      | Durée de conservation plus longue<br>Rassissement retardé                     |
| Sorgo rouge – <i>L. plantarum</i> /<br><i>L. casei</i> ou <i>L. reuteri</i> / <i>L. fermentum</i> | Hydrolyse d'oligosaccharides                                                         |                                           | Meilleure qualité nutritionnelle et sensorielle (?)                           |
| Farine de légumineuse – <i>L. reuteri</i> [53]                                                    | Hydrolyse d'éthers de glycol de composés phénoliques et de glucosides de flavonoïdes |                                           |                                                                               |
| Amarante – <i>L. paralimentarius</i> AL28 ou <i>L. plantarum</i> AL30 [42]                        |                                                                                      | Meilleures propriétés viscoélastiques     |                                                                               |
| (?) effets prévus                                                                                 |                                                                                      |                                           |                                                                               |

Tableau 10.2 Microbiote des levains sans gluten et produits traditionnels sans gluten

| Matière première      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Starter (S)                |                                     |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Produit               | Microbiote dominant <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Spontané (Sp) <sup>b</sup> | Référence                           |
| <b>Sorgho</b>         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                                     |
| Kisra du Soudan       | <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> ,<br><i>L. vaginalis</i> , <i>L. helveticus</i> ,<br><i>L. pontis</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>I. orientalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Sp                         | [54-56]                             |
| Khamir du Soudan      | <i>P. pentosaceus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. lactis</i> ,<br><i>L. cellobiosus</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. orvegnsis</i> , <i>R. glutinis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Sp                         | [57]                                |
| Porridge du Botswana  | <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei/paracasei</i> ,<br><i>L. buchneri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. perolens</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Sp                         | Sekwati-Monang, Gänzle, non publiée |
| <b>Riz</b>            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                                     |
| Levain industriel     | <i>L. paracasei</i> , <i>L. paralimentarius</i> ,<br><i>L. perolens</i> , <i>L. spicheri</i> , <i>S. cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Sp                         | [43]                                |
|                       | <i>L. fermentum</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. pontis</i> ,<br><i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | S                          |                                     |
| Levain en laboratoire | <i>L. gallinarum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> ,<br><i>L. fermentum</i> , <i>L. kimchii</i> , <i>L. pontis</i> ,<br><i>I. orientalis</i> , <i>S. cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | S                          | [50]                                |
| <b>Maïs</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                                     |
| Kenkey                | <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>P. pentosaceus</i> ,<br><i>C. krusei</i> , <i>S. cerevisiae</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Sp                         | [58-60]                             |
| Pozol du Mexique      | <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>Streptococcus</i> spp.,<br><i>Leuconostoc</i> spp., <i>Weisella</i> spp.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Sp                         | [61-63]                             |
| Levain en laboratoire | <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> ,<br><i>L. plantarum</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> ,<br><i>L. dextranicum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>C. halbicans</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i>                                                                                                                                                                                                                                                            | Sp                         | [64, 65]                            |
| Levain en laboratoire | <i>L. fermentum</i> , <i>L. paralimentarius</i> ,<br><i>L. helveticus</i> , <i>L. pontis</i> , <i>S. cerevisiae</i> ,<br><i>I. orientalis</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | S                          | [50]                                |
| <b>Teff</b>           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                                     |
| Injera                | <i>P. cerevisiae</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> ,<br><i>L. fermentum</i> , <i>Saccharomyces</i> ,<br><i>Torulopsis</i> , <i>Candida</i> spp.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Sp                         | [66]                                |
| Levain en laboratoire | <i>L. plantarum</i> (S), <i>L. paralimentarius</i> (S),<br><i>L. fermentum</i> (S, Sp), <i>L. sanfranciscensis</i> (S),<br><i>L. frumenti</i> (S), <i>L. pontis</i> (S, Sp),<br><i>L. reuteri</i> (S), <i>L. amylovorus</i> (S),<br><i>L. brevis</i> (S), <i>L. vaginalis</i> (Sp), <i>L. gallinarum</i> (Sp),<br><i>P. acidilactici</i> (S), <i>P. pentosaceus</i> (Sp), <i>Lc. holzapfelii</i> (Sp),<br><i>K. barnetti</i> (S), <i>S. cerevisiae</i> (S, Sp),<br><i>C. glabrata</i> (Sp) | Sp et S                    | [46, 47]                            |

Tableau 10.2 (suite)

| Matière première       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Starter (S)<br>Spontané<br>(Sp) <sup>b</sup> | Référence    |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------|
| Produit                | Microbiote dominant <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                              |              |
| <b>Sarrasin</b>        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                              |              |
| Levains en laboratoire | <i>L. plantarum</i> (S, Sp), <i>L. paralimentarius</i> (S), <i>Lc. argentinum</i> (S), <i>L. sanfranciscensis</i> (S), <i>W. cibaria</i> (S, Sp), <i>L. brevis</i> (S), <i>L. fermentum</i> (S, Sp), <i>L. amylovorus</i> (S), <i>L. helveticus</i> (S), <i>P. pentosaceus</i> (Sp), <i>Lc. holzapfelii</i> (Sp), <i>L. graminis</i> (Sp), <i>L. sakei</i> (Sp), <i>L. vaginalis</i> (Sp), <i>L. crispatus</i> (Sp), <i>L. gallinarum</i> (Sp), <i>K. barnetti</i> (Sp) | Sp et S                                      | [46, 47, 50] |
| <b>Amaranthe</b>       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                              |              |
| Levains en laboratoire | <i>L. plantarum</i> (S, Sp), <i>L. sakei</i> (Sp), <i>L. paralimentarius</i> (S, Sp), <i>L. fermentum</i> (S), <i>L. helveticus</i> (S), <i>L. spicheri</i> (S), <i>P. pentosaceus</i> (Sp), <i>Enterococcus</i> spp (Sp), <i>S. cerevisiae</i> (S), <i>C. glabrata</i> (S)                                                                                                                                                                                             | Sp et S                                      | [49, 50]     |

Adapté de [5]

<sup>a</sup> *I. Issatchenkia*, *L. Lactobacillus*, *Lc. Leuconostoc*, *P. Pediococcus*, *R. Rhodotorula*, *S. Saccharomyces*, *C. Candida*.

<sup>b</sup> La fermentation était amorcée soit par l’ajout de souches starters (S), soit par le biote spontané de la farine (Sp).

### 10.3 Écologie des fermentations sans gluten et développement de starters de levain sans gluten

La diversité des espèces présentes dans les levains de blé et de seigle a fait l’objet de nombreuses recherches avec des approches basées ou non sur les cultures. Les espèces hétérofermentaires du genre *Lactobacillus* sont parmi les plus fréquemment isolées, mais on retrouve également des espèces des genres *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Weissella* dans les levains traditionnels [67]. Il est largement admis que la sélection des biotes compétitifs dans les levains de blé et de seigle dépend essentiellement des paramètres de fermentation [36, 68], alors que le rôle joué par la farine et ses micro-organismes autochtones fait débat [67].

La plupart des études écologiques ont été réalisées sur des levains de blé, de seigle ou d’épeautre, fermentés en laboratoire ou au préalable dans un fournil [69-73]. Globalement, ces recherches montrent que la qualité et la nature de la farine jouent un rôle marginal dans la sélection des espèces compétitives dans les levains traditionnels. Il faut tenir compte ici du fait que le blé, le seigle et l’épeautre sont trois céréales étroitement apparentées et que le fournil semble définir les espèces prédominantes des levains [73].

Une question reste donc en suspens : ce principe pourrait-il être appliqué aux levains non conventionnels ? Des études récentes indiquent une tendance différente pour les farines sans gluten [46, 50]. Vogelmann *et al.* [50] ont étudié l'adaptabilité des différentes souches fermentaires de bactéries lactiques et de levures dans des levains préparés à partir de céréales et pseudo-céréales sans gluten et continuellement rafraîchis. Les auteurs ont conclu que certaines souches fermentaires utilisées ne pouvaient pas survivre à la fermentation et que leur adaptabilité aux levains sans gluten dépendait fortement de la farine choisie. Malheureusement, étant donné le grand nombre de substrats utilisés, les auteurs n'ont pas pu identifier les raisons de cette variabilité. Moroni *et al.* [46] ont récemment étudié le développement des levains de sarrasin et de teff à partir de starters commerciaux. Le substrat utilisé déterminait la persistance de certaines souches fermentaires ; les espèces spontanées, issues de la farine, ou supplantaient les bactéries lactiques et les levures du ferment ou co-donnaient. La composition en sucre unique de certaines farines sans gluten est un facteur clé dans la sélection d'espèces dominantes dans les levains sans gluten [41, 46, 47]. Par exemple, quand *Lactobacillus sanfranciscensis* servait de souche d'ensemencement, elle ne pouvait pas proliférer dans le levain de sorgho en l'absence de maltose au début de la fermentation [41]. En revanche, le taux élevé de glucose dans le levain de sorgho favorisait la croissance et les activités métaboliques de *Weissella* spp. [41]. De même, *Weissella cibaria* s'est avérée très compétitive dans le levain de sarrasin, dans lequel le taux initial en monosaccharide dépassait celui du maltose [46, 47]. En outre, le rapport élevé glucose/maltose favorisait la coexistence de levures et de bactéries lactiques maltose-positives dans les levains de teff [46]. Globalement, ces résultats indiquent que la nature des farines sans gluten utilisées pour les fermentations au levain joue un rôle notable dans la sélection des souches dominantes de bactéries lactiques et de levures. Par ailleurs, ces études montrent clairement que les starters commerciaux tels quels ne permettent pas la production efficace de levain sans gluten. Les principaux critères de sélection pour avoir des starters efficaces sont en fait les suivants : les souches des starters doivent être très bien adaptées au substrat sans gluten, dominer la fermentation et inhiber la croissance de souches contaminantes et/ou autochtones [67].

Les études écologiques sur les levains sans gluten sont essentielles pour développer des levains sans gluten, or il en existe peu jusqu'à présent (Tableau 10.2). La plupart de ces recherches ont porté sur des produits traditionnels, essentiellement produits à partir de maïs, de sorgho et de teff dans les pays tropicaux. Ces produits issus de la fermentation étaient dominés par des bactéries lactiques qui se superposaient souvent avec celles fréquemment isolées dans les levains de blé et de seigle [68]. *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. plantarum*, en particulier, étaient les plus fréquentes (Tableau 10.1). Toutefois, il est difficile d'interpréter les résultats de ces études à cause des techniques inappropriées utilisées pour l'identification des espèces et des conditions non stériles dans lesquelles ont eu lieu les fermentations. Plus récemment, la diversité des espèces dans les levains obtenus en laboratoire et à l'échelle industrielle à partir de différentes céréales et pseudo-céréales sans gluten a fait l'objet de recherches avec des approches basées ou non sur les cultures (Tableau 10.1). Ces levains ont été amorcés avec des starters [43, 46, 50] ou par fermentation spontanée [47, 49, 64, 65].

Comme dans le cas des produits traditionnels, *L. fermentum*, *L. plantarum* ainsi que *L. paralimentarius* étaient présentes dans presque tous les levains sans gluten fermentés spontanément et par starter, à partir de riz, de maïs, de sarrasin, de teff et d'amaranthe (Tableau 10.1).

En revanche, la prédominance des espèces les plus courantes du levain, à savoir *L. sanfranciscensis* et *L. pontis*, dépendait du substrat. Des espèces comme *L. gallinarum*, *L. graminis*, *L. sakei* et *Pediococcus pentosaceus*, qui ne sont pas souvent isolées dans les levains traditionnels, étaient présentes dans divers levains sans gluten, notamment quand la fermentation était spontanée. Les pseudo-céréales sarrasin et amarante se sont avérées de bons substrats pour la croissance de *L. sakei*, *P. pentosaceus* et *L. paralimentarius*, alors que les levains de sarrasin ont induit l'inhibition de la croissance des levures [46, 47, 50, 51]. En conclusion, les études écologiques sur les fermentations sans gluten montrent que les farines sans gluten constituent un réservoir important de nouvelles souches de bactéries lactiques et de levures compétitives qui peuvent servir de starters pour la production de levains sans gluten stables. Dans un deuxième temps, ces souches peuvent être sélectionnées pour leurs propriétés fonctionnelles, comme la production d'EPS et de composés aromatiques et/ou antifongiques et la vitesse d'acidification [5, 72, 74].

## 10.4 La protéolyse comme outil d'amélioration de la valeur boulangère des farines sans gluten

Les événements protéolytiques qui ont lieu durant les fermentations au levain de farines de blé et de seigle ont fait l'objet de recherches exhaustives par Gänzle *et al.* [75]. La dégradation protéique durant la fermentation au levain est l'un des principaux phénomènes qui affectent la qualité globale du pain au levain, en induisant la formation de précurseurs pour les composés aromatiques et en modifiant les propriétés viscoélastiques de la pâte [75]. En raison de l'acidification progressive de la pâte par les bactéries lactiques, les enzymes endogènes sont activées et exercent une protéolyse initiale sur les protéines de la farine. Dans un deuxième temps, les peptides libérés sont hydrolysés en acides aminés par les peptidases intracellulaires des bactéries lactiques, d'une façon spécifique à chaque souche [76]. En général, la plupart des bactéries lactiques du levain ne présentent pas d'activité de protéinase extracellulaire et préfèrent l'absorption de peptides au transport d'acides aminés [77]. Les bactéries lactiques peuvent modifier la structure des produits hydrolysés en augmentant le nombre de dipeptides et d'acides aminés libérés dans le levain [76, 77]. Étant donné que les levures consomment des acides aminés durant leur croissance, l'accumulation d'acides aminés dans le levain peut avoir lieu uniquement à l'arrêt de la croissance des levures [78-80]. Il y a encore peu d'études sur les événements protéolytiques ayant lieu durant la fermentation au levain de farines sans gluten et leurs effets sur la qualité du pain sans gluten. Récemment, la fermentation du levain a été appliquée avec succès pour la production de pain sans gluten à partir de farine de sorgho, d'amidon de pommes de terre et de HPMC ([48] ; Tableau 10.1). Un pain de qualité supérieure n'a pu être produit qu'en remplaçant la farine de sorgho par un levain de sorgho fermenté par la souche d'ensemencement *L. plantarum*.

Pour les auteurs, cette amélioration de la qualité est principalement due aux événements protéolytiques qui ont lieu sur les protéines de sorgho solubles durant la fermentation au levain. Les protéines hydrolysées n'ont pas interféré avec le gel d'amidon lors de la gélatinisation, ce qui a donné un gel d'amidon plus résistant avec de meilleures propriétés structurales.

Une observation en microscopie confocale à balayage laser (MCBL) a montré que la présence de petits peptides dans le pain au levain empêchait la formation d'agrégats protéiques dans la mie lors de la cuisson, tandis que des agrégats étaient formés dans le témoin acidifié chimiquement. Elkhaila *et al.* [81] ont étudié les changements moléculaires et structurels durant la fermentation de farine de sorgho pour la préparation du *kisra*, aliment traditionnel soudanais. Comme l'ont montré la microscopie (MCBL) et optique, la fermentation a engendré l'hydrolyse de protéines hydrosolubles qui forment l'enveloppe extérieure des granules d'amidon. Cela a entraîné la libération de petites granules d'amidon de la matrice et la modification des propriétés collantes de la farine de sorgho. La protéolyse a aussi été étudiée dans le *towga*, aliment fermenté traditionnel de Tanzanie, sans gluten, préparé par fermentation à partir de sorgho, de maïs, de manioc, de mil ou de leur combinaison [82]. Les fermentations spontanées tout comme les fermentations par starter ont induit l'activation de protéinases et, en fonction des conditions de fermentation, une hausse de la teneur de certains acides aminés, comme l'acide glutamique, la proline, l'ornithine, la méthionine et la lysine.

Dans l'ensemble, les événements protéolytiques ayant lieu durant la fermentation au levain peuvent avoir un impact positif sur la valeur boulangère des farines sans gluten. La fermentation au levain pourrait donc remplacer les enzymes protéolytiques dans la formulation de pain sans gluten [30, 31], ce qui permettrait de réduire le coût du pain et de le rendre attrayant pour les consommateurs. Toutefois, des études complémentaires sont nécessaires pour savoir quelles farines sans gluten peuvent bénéficier de la fermentation au levain et identifier le degré de protéolyse nécessaire afin de renforcer leur valeur boulangère.

## **10.5 La protéolyse pour réduire la toxicité de la farine de blé**

Durant la digestion endoluminale, une famille de peptides riches en proline et glutamine est libérée par les prolamines du blé et du seigle. Ces peptides toxiques sont responsables de la réponse auto-immune chez les patients souffrant de la maladie cœliaque [83, 84]. Durant la fermentation au levain de la farine de blé, les gliadines font partie des protéines les plus affectées, même si le degré d'hydrolyse des gliadines monomériques ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadines) est spécifique aux souches [76, 85]. Di Cagno *et al.* [76] ont montré que certaines bactéries lactiques qui présentent des activités protéolytiques pouvaient hydrolyser efficacement le fragment 31-43 d'A-gliadine toxique dans le levain de blé. Ils ont également utilisé les bactéries lactiques protéolytiques pour produire un levain non toxique à partir d'un mélange de farines toxiques et non toxiques, dans lequel le peptide 33-mer, fortement toxique, était complètement hydrolysé [86]. Les pains produits à partir de ce levain étaient de qualité acceptable et leur consommation par des patients souffrant d'intolérance au gluten n'a entraîné aucune altération des valeurs de base.

Le même groupement de bactéries lactiques protéolytiques s'est avéré efficace pour détoxifier la farine de seigle [87] et, associé à *L. sanfranciscensis*, a permis de produire du pain de blé au levain non toxique de qualité acceptable [88]. La fermentation au levain peut aussi être efficace pour éliminer le gluten qui peut se trouver éventuellement comme contaminant dans les farines sans gluten [89].

Une fermentation au levain de blé et de seigle prolongée, utilisant des bactéries lactiques spécifiques, pourrait constituer une technologie innovante pour obtenir des pains de bonne qualité consommables par les personnes souffrant de la maladie cœliaque. Néanmoins, des tests *in vivo* à long terme sont nécessaires pour confirmer l'innocuité de ces produits pour les personnes intolérantes au gluten. En outre, les fabricants devront d'abord faire accepter aux consommateurs l'idée de produits sans gluten mais contenant du blé et/ou du seigle détoxifiés.

## 10.6 Les exopolysaccharides : une alternative économique aux hydrocolloïdes dans les pains sans gluten

Les exopolysaccharides (EPS) produits par des bactéries lactiques sont des bio-épaississants alternatifs qui peuvent servir d'agents viscosifiants, stabilisants, émulsifiants ou gélifiants dans de nombreux produits alimentaires [90]. Les EPS sont généralement classés en deux catégories : les homopolysaccharides (HoPS), polymères de glucose ou de fructose, et les hétéropolysaccharides, qui contiennent des unités (ir)régulières et répétitives [90]. À ce jour, seule l'utilité des HoPS pour la fabrication du pain a été démontrée. Les glucanes et fructanes sont synthétisés respectivement par glucane saccharases ou fructane saccharases extracellulaires, par différentes bactéries lactiques associées au levain. Il a été démontré que *Lactobacillus reuteri*, *L. panis*, *L. pontis*, *L. frumenti* et *L. sanfranciscensis* produisent des fructanes (lévane ou inuline) et des glucanes (dextrane, reutéline ou mutane) [91]. *Leuconostoc* spp. et *Weissella* spp., en particulier, synthétisent une grande variété de dextrans [92, 93]. La structure, la masse molaire et le rendement des HoPS varient en fonction des bactéries lactiques et dépendent également de la concentration en glucides et de la composition de la source [92, 94]. Durant la fermentation au levain, les bactéries lactiques peuvent produire des EPS en grandes quantités, suffisantes pour améliorer les propriétés structurelles de la pâte [95, 96]. La production *in situ* d'EPS en particulier semble être plus efficace que l'ajout externe du même polysaccharide dans la formule du pain [97]. L'ajout de levain fermenté avec des souches produisant des HoPS dans une pâte de blé a eu un impact majeur sur la qualité du pain, avec une mie plus moelleuse et une augmentation du volume [92, 93, 95].

Outre les EPS, les glucane saccharases et fructane saccharases peuvent synthétiser respectivement des gluco-oligosaccharides et fructo-oligosaccharides (FOS) [98]. Les FOS ont été associés à des effets prébiotiques [94, 99]. Le lévane produit par *L. sanfranciscensis* LHT2590 a particulièrement stimulé la croissance bifidobactérienne *in vitro* [100]. Dans le levain, *L. reuteri*, *L. acidophilus* et *L.*

*sanfranciscensis* LHT2590 ont montré leur aptitude à produire des FOS 1-kestose aux propriétés prébiotiques [94, 94]. Les souches qui produisent des EPS peuvent donc être utilisées non seulement pour améliorer la valeur boulangère de la farine pour la production de pain, mais aussi pour améliorer la valeur nutritionnelle du pain. Ces caractéristiques font des EPS un substitut idéal des hydrocolloïdes dans les pains sans gluten. Toutefois, à ce jour, seules quelques études [41, 52] ont exploré la formation des EPS dans les levains sans gluten et leur application potentielle pour la fabrication de pain sans gluten.

Schwab *et al.* [52] ont analysé récemment l'applicabilité de *L. reuteri* LHT5448 et *W. cibaria* 10M, qui produisent des EPS, dans les levains sans gluten (Tableau 10.1). Ces deux souches semblent constituer des starters adaptés pour la fermentation au levain à partir de quinoa et de sorgho ; durant la fermentation, elles ont produit respectivement des lévanes/FOS et des dextranes/GOS (galactooligosaccharides). En boulangerie, le levain de sorgho fermenté par *W. cibaria* s'est avéré être le plus efficace. Les pains au sorgho étaient plus moelleux après ajout de ce levain et les isomalto-oligosaccharides présents dans la pâte n'étaient pas digérés par la levure de boulangerie lors de la pousse [52]. Les auteurs en ont conclu que la consommation de 300 g de pain au sorgho sans gluten préparé avec *W. cibaria* 10M correspondrait à l'absorption d'une quantité significative de GOS prébiotiques.

Galle *et al.* [41] ont aussi sélectionné des souches de *Weissella* qui produisent des EPS pour leur potentiel d'ensemencement dans les levains de sorgho et de blé (Tableau 10.1). Quelle que soit la souche, le levain de sorgho présentait plus d'EPS que le levain de blé en raison de la concentration plus élevée de glucose dans la farine sans gluten. La quantité de dextranes notamment, produits par *W. kimchii* et *W. cibaria* MG1, était suffisante pour que le levain puisse remplacer les hydrocolloïdes dans le pain. Dans les deux levains, les souches de *Weissella* ont également produit des oligosaccharides, dont la structure dépendait de la farine choisie. En outre, les deux souches ont libéré du fructose et formé que de petites quantités d'acétate, une caractéristique favorable à la production de pain [101]. Toutes ces études montrent que le levain fermenté par des souches *Weissella* qui produisent des EPS peut remplacer les hydrocolloïdes dans le pain sans gluten. En outre, différents types d'oligosaccharides peuvent être formés dans le levain sans gluten par la manipulation des sources de carbone.

En conclusion, les bactéries lactiques qui forment des EPS peuvent servir à améliorer la valeur boulangère des farines sans gluten. Toutefois, il faut opérer une sélection afin d'identifier les souches qui produisent des EPS et qui peuvent servir de starter dans les levains sans gluten. Par ailleurs, d'autres recherches sont nécessaires pour évaluer l'applicabilité de starters spécifiques pour les pains au levain sans gluten, dans la mesure où le type d'EPS et ses interactions avec la matrice influent fortement sur les propriétés structurales de la pâte [93].

## 10.7 L'hydrolyse de l'amidon pour retarder le rassissement du pain sans gluten

La rétrogradation/recristallisation de l'amidon est l'un des principaux facteurs de rassissement du pain. Durant le stockage, le réseau d'amylopectine présent dans le pain frais se transforme progressivement en réseau semi-cristallin, responsable du durcissement de la mie [102]. Les amylases, en particulier les amylases maltogéniques, et le malt sont généralement utilisés comme agents antirassissement pour le pain [103]. L'ajout de levain au pain de blé peut retarder le rassissement ; les levains avec une ATT (acidité titrable totale) élevée et un pH bas sont aussi utiles à cette fin [104]. Même si la plupart des bactéries lactiques ne présentent pas d'activités amylolytiques, des souches amylolytiques ont été isolées de fermentations de céréales dans des zones tropicales [75, 105, 106].

À cet égard, Corsetti *et al.* [107, 108] ont montré que l'acidification biologique associée aux activités protéolytiques et amylolytiques des souches d'ensemencement sélectionnées retardaient le rassissement du pain de blé au levain.

Le rassissement est l'une des principales difficultés dans la fabrication de produits de boulangerie sans gluten étant donné que la plupart des pains sans gluten sont faits principalement à base d'amidon. Il existe très peu de recherches sur les effets de la fermentation au levain sur l'hydrolyse de l'amidon et le rassissement dans les pains sans gluten. Le maltage et l'ébullition combinés à la fermentation du sorgho ont permis d'obtenir une mie moins dure et moins sèche dans des pains mixtes sorgho-blé [109]. Songré-Ouattara *et al.* [110] ont isolé des souches amylolytiques de *L. plantarum* dans des gruaux de mil et ont réussi à les utiliser comme cultures de départ pour l'hydrolyse de l'amidon. Selon les auteurs, d'autres souches amylolytiques peuvent être isolées du produit traditionnel [110]. Schober *et al.* [48] ont montré que la combinaison d' $\alpha$ -amylase et de levain améliorerait la qualité du pain au sorgho, mais qu'elle n'avait pas d'effet positif sur la vitesse de rassissement. En revanche, l'acidification chimique avait des effets plutôt négatifs sur le volume de pain et augmentait fortement la fermeté du pain durant toute la période de stockage. L'incorporation de levain à un mélange sans gluten s'est également avérée retarder le processus de durcissement, alors que l'acidification chimique augmentait la vitesse de rassissement ([44] ; Tableau 10.1).

Ainsi, en fonction de la farine et des souches d'ensemencement, la fermentation au levain peut servir à contrôler le processus de durcissement des pains sans gluten. Toutefois, le mécanisme de rassissement du pain fait toujours l'objet de recherches et cet événement complexe dans les formules sans gluten reste largement inexploré. D'autres recherches sont donc nécessaires afin de caractériser l'activité des amylases des farines et des amylases bactériennes dans les levains sans gluten. Des études approfondies permettront d'identifier les meilleures conditions de transformation pour retarder le rassissement du pain sans gluten grâce au levain (type et quantité de levain à ajouter et combinaison avec des amylases et/ou malts commerciaux).

## 10.8 Le levain comme outil naturel d'amélioration de la durée de conservation du pain sans gluten

La diffusion des poussières et des spores de moisissure dans les fournils est la principale cause d'altération du pain [111]. C'est un problème majeur pour les fabricants de pain car ce phénomène est synonyme de pertes économiques et de risques sanitaires pour les consommateurs. Les spores les plus couramment responsables de l'altération du pain sont *Aspergillus*, *Cladiosporum*, *Endomyces*, *Fusarium*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium* et *Rhizopus* [111]. Le levain est une manière efficace et naturelle de prolonger la durée de conservation du pain. Les bactéries lactiques associées au levain peuvent produire différentes substances dotées de propriétés antifongiques [112, 113]. Les bactéries lactiques hétérofermentaires libèrent des acides organiques antifongiques, parmi lesquels les acides acétique et propionique sont plus efficaces que l'acide lactique [113].

Un mélange d'acides organiques (caproïque, acétique, formique, propionique, butyrique et *n*-valérique), produits par *L. sanfranciscensis* CB1, sont les principaux facteurs de son activité anti-moisissure contre *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Monilia* [108]. Des souches de *L. plantarum* présentaient une large activité antifongique, l'acide 4-hydroxyphénylacétique et l'acide phénylacétique étant les principaux inhibiteurs produits par les bactéries lactiques du levain [114-116].

Ryan *et al.* [39] ont également montré que l'ajout de levain fermenté par la souche antifongique de *L. plantarum* permettait de réduire le taux de propionate de calcium du pain de blé d'environ 30 %, sans effet négatif sur la durée de conservation. La reutéricycline est un antibiotique de faible masse molaire qui agit contre les bactéries lactiques et les levures à Gram positif, produites dans les concentrations actives par *L. reuteri* [117]. En outre, les souches de *L. reuteri* peuvent produire de la reutérine, une substance antimicrobienne active contre les bactéries, les levures et les champignons (étudié par [118]). Les bactéries lactiques du levain sont aussi efficaces contre la maladie du pain filant imputable à *Bacillus* spp., en raison de la production d'acides organiques et d'autres composés antibactériens non identifiés [119, 120].

La recherche sur l'application du levain pour prolonger la durée de conservation des pains sans gluten en est encore à ses débuts. Récemment, Moore *et al.* [44] ont utilisé un levain (20 %) fermenté par la souche antifongique *L. plantarum* FST 1.7 dans un pain mixte sans gluten (Tableau 10.1). *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 a conservé son activité inhibitrice contre le champignon témoin *Fusarium culmorum* dans le pain sans gluten et a retardé la croissance des moisissures jusqu'à trois jours par rapport au témoin non acidifié. Ainsi, la capacité d'amélioration de la durée de conservation du levain est maintenue dans les pains sans gluten, mais il faudrait mener plus de recherches pour évaluer cette application. Les fermentations sans gluten constituent une source importante de nouvelles souches de bactéries lactiques et leur potentialité comme souches d'ensemencement antifongiques devrait faire l'objet d'études.

## 10.9 La fermentation au levain pour favoriser les bienfaits sur la santé du pain sans gluten

Le levain peut potentiellement augmenter les bienfaits nutritionnels du pain en favorisant la biodisponibilité des minéraux, en réduisant la réponse glycémique et en régulant l'accessibilité des composés bioactifs dans la farine (étudié par [38]).

L'acide phytique (AP) est la principale forme de stockage du phosphore dans les grains et considéré comme un facteur antinutritionnel. L'AP bloque l'absorption des minéraux par des cations alimentaires qui établissent de fortes liaisons pour former des complexes insolubles [121]. Pour les personnes qui souffrent de la maladie cœliaque et de carences en micronutriments, la présence d'AP dans le pain sans gluten est particulièrement néfaste. Les grains des céréales contiennent des phytases qui peuvent augmenter la biodisponibilité des minéraux en induisant la déphosphorylation du phytate pour libérer des éthers de phosphate et d'inositol phosphate inorganiques.

La fermentation du levain favorise l'activité des phytases endogènes en créant des conditions de pH optimales pour leur activation [122, 123]. Lopez *et al.* [123] ont montré que l'hydrolyse du phytate était deux fois plus importante avec la fermentation au levain que la fermentation conventionnelle sur levure dans le pain de blé et de blé complet. En outre, les bactéries lactiques et les levures associées au levain exerçaient une activité de phytase dans les levains traditionnels [124]. De Angelis et son équipe [122] ont montré que la fermentation par *L. sanfranciscensis* CB1 induisait une baisse d'AP de plus de 50 % dans la pâte à pain de blé.

À ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur l'acide phytique dans les levains sans gluten destinés à la production du pain. Toutefois, l'activité de phytase a été caractérisée durant la fermentation de céréales sans gluten. La fermentation induisait une baisse du taux d'acide phytique dans le sorgho et le mil [125]. Deux souches phytase-positives, *L. plantarum* et *L. fermentum*, ont été isolées récemment des produits de fermentation susmentionnés [126].

La fermentation au levain peut aussi augmenter la biodisponibilité de plusieurs nutriments, comme le folate, la thiamine, la vitamine B<sub>1</sub> et les antioxydants dans le pain de blé et de seigle (étudié par [38]). Cependant, un excès de composés bioactifs dans les substrats sans gluten peut réduire les qualités nutritionnelles de la farine sans gluten [53]. Gänzle *et al.* [53] ont appliqué la fermentation au levain à la farine de sorgho rouge et de légumineuses pour réduire respectivement leur taux de polyphénols et d'oligosaccharides (Tableau 10.1). La souche  $\alpha$ -galactosidase-positif *L. reuteri* hydrolysait le raffinose, le stachyose et le verbascose dans la farine de légumineuses. En outre, la fermentation au levain du sorgho rouge avec des combinaisons binaires de bactéries lactiques, à savoir *L. plantarum*/*L. casei* ou *L. reuteri*/*L. fermentum*, induisait une hydrolyse quantitative d'éthers de glycol des composés phénoliques et des glucosides flavonoïdes. La fermentation par bactéries lactiques des farines sans gluten peut donc potentiellement améliorer leurs caractéristiques nutritionnelles et sensorielles [53]. Par ailleurs, comme l'ont montré Galle *et al.* [41] et Schwab *et al.* [52], la fermentation de matières sans gluten par certaines souches produisant des EPS peut engendrer la libération de

quantités significatives de GOS (galacto-oligosaccharides) ayant une activité prébiotique.

Les maigres avantages nutritionnels des pains sans gluten peuvent être améliorés par la fermentation au levain, efficace pour réduire les facteurs antinutritionnels dans la farine sans gluten et pour augmenter la teneur en GOS prébiotiques. Il faudrait cependant plus d'études pour identifier les meilleures combinaisons de farine et de starter et conditions de transformation pour produire un pain sans gluten doté de bonnes propriétés nutritionnelles.

## **10.10 Conclusions**

La production de pain sans gluten de qualité structurelle et nutritionnelle supérieure continue de poser des difficultés aux spécialistes de la transformation alimentaire. La fermentation au levain de blé et de seigle est utilisée pour améliorer la qualité du pain depuis l'Antiquité. Des études récentes ont montré que ses principaux effets positifs sur la qualité du pain sont maintenus quand la fermentation au levain est appliquée aux matières premières sans gluten.

La protéolyse et la production d'EPS durant la fermentation de substrats sans gluten améliorent les propriétés rhéologiques de la pâte à pain et la qualité du pain. En outre, l'ajout de levain peut retarder le processus de rassissement par l'hydrolyse de l'amidon. D'un point de vue nutritionnel, l'application de la technologie du levain entraîne à la fois une hausse de certains composés bioactifs et une baisse des facteurs antinutritionnels dans les farines sans gluten. Toutefois, même si des résultats prometteurs ont été obtenus, l'utilisation du levain dans les produits de boulangerie sans gluten n'en est qu'à ses balbutiements et doit faire l'objet de nouvelles recherches. Par exemple, le potentiel du levain comme vecteur de goût n'a pas encore été étudié pour les levains sans gluten, alors que l'insipidité est l'un des principaux aspects négatifs des pains sans gluten. Face à l'intérêt croissant pour l'utilisation du levain dans les produits de boulangerie sans gluten, les recherches sur l'écologie des fermentations sans gluten se multiplient. Elles devraient permettre de sélectionner de nouveaux starters pour produire des levains sans gluten dotés de propriétés spécifiques afin d'obtenir les améliorations de qualité souhaitées dans les pains au levain.

Avec des données plus complètes, la production industrielle de starters sans gluten et de pains au levain sans gluten deviendra probablement une réalité sur le marché des produits sans gluten.

## Références

1. Catassi C, Fasano A (2008) Celiac disease. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *Gluten-free cereals products and beverages*. Academic Press (Elsevier), London, pp 1–22
2. Deutsch H (2009) Gluten-free diet and food legislation. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *The science of gluten free foods and beverages*. AACC International, St Paul
3. Bogue J, Sorenson D (2008) The marketing of gluten free products. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *Gluten free cereal products and beverages*. Academic Press (Elsevier), London, pp 393–408
4. Gallagher E, Gormley TR, Arendt EK (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci Technol* 15:143–152
5. Moroni AV, Dal Bello F, Arendt EK (2009) Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiol* 26:676–684
6. Don C, Lichtendonk WJ, Plijter JJ, Hamer RJ (2003) Glutenin macropolymer: a gel formed by glutenin particles. *J Cereal Sci* 37:1–7
7. Arendt EK, Morrissey A, Moore MM, Dal Bello F (2008) Gluten-free breads. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *Gluten-free cereal products and beverages*. Academic Press (Elsevier), London, pp 289–319
8. Gallagher E, Gormley TR, Arendt EK (2003) Crust and crumb characteristics of gluten free breads. *J Food Eng* 56:153–161
9. Ahlborn GJ, Pike OA, Hendrix SB, Hess WM, Huber CS (2005) Sensory, mechanical, and microscopic evaluation of staling in low-protein and gluten-free breads. *Cereal Chem* 82:328–335
10. Thompson T (2000) Folate, iron, and dietary fiber contents of the gluten-free diet. *J Am Diet Assoc* 100:1389–1396
11. Yazynina E, Johansson M, Jägerstad M, Jastrebova J (2008) Low folate content in gluten-free cereal products and their main ingredients. *Food Chem* 111:236–242
12. Alvarez-Jubete L, Holse M, Hansen A, Arendt EK, Gallagher E (2009) Impact of baking on vitamin E content of pseudocereals amaranth, quinoa, and buckwheat. *Cereal Chem* 86:511–515
13. Kiskini A, Argiri K, Kalogeropoulos M, Komaitis M, Kostaropoulos A, Mandala I, Kapsokefalou M (2007) Sensory characteristics and iron dialyzability of gluten-free bread fortified with iron. *Food Chem* 102:309–316
14. Moore MM, Schober TJ, Dockery P, Arendt EK (2004) Textural comparisons of gluten-free and wheat-based doughs, batters, and breads. *Cereal Chem* 81:567
15. Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E (2010) Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients. *Trends Food Sci Technol* 21:106–113
16. Schoenlechner R, Siebenhandl S, Berghofer E (2008) Pseudocereals. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *Gluten-free cereal products and beverages*. Academic Press (Elsevier), London
17. Alvarez-Jubete L, Auty M, Arendt E, Gallagher E (2010) Baking properties and microstructure of pseudocereal flours in gluten-free bread formulations. *Eur Food Res Technol* 230:437–445
18. Mariotti M, Lucisano M, Pagani A, Ng MPKW (2009) The role of corn starch, amaranth flour, pea isolate, and Psyllium flour on the rheological properties and the ultrastructure of gluten-free doughs. *Food Res Int* 42:963–975
19. Korus J, Grzelak K, Achremowicz K, Sabat R (2006) Influence of prebiotic additions on the quality of gluten-free bread and on the content of inulin and fructooligosaccharides. *Food Sci Technol Int* 12:489–495
20. Hüttner EK, Dal Bello FD, Arendt EK (2010) Rheological properties and bread making performance of commercial wholegrain oat flours. *J Cereal Sci* 62:65–71
21. BeMiller JN (2008) Hydrocolloids. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) *Gluten-free cereal products and beverages*. Academic Press (Elsevier), London, pp 203–215
22. Lazaridou A, Duta D, Papageorgiou M, Belc N, Biliaderis CG (2007) Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. *J Food Eng* 79:1033–1047
23. Gujral HS, Rosell CM (2004) Improvement of the breadmaking quality of rice flour

- by glucose oxidase. *Food Res Int* 37:75–81
24. McCarthy DF, Gallagher E, Gormley TR, Schober TJ, Arendt EK (2005) Application of response surface methodology in the development of gluten-free bread. *Cereal Chem* 82:609–615
25. Schober TJ, Messerschmidt M, Bean SR, Park S-H, Arendt EK (2005) Gluten-free bread from sorghum: quality differences among hybrids. *Cereal Chem* 82:394–404
26. Gallagher E, Kunkel A, Gormley TR, Arendt EK (2003) The effect of dairy and rice powder addition on loaf and crumb characteristics, and on shelf life (intermediate and long term) of gluten-free breads stored in a modified atmosphere. *Eur Food Res Technol* 218:44–48
27. Nunes M, Ryan L, Arendt E (2009) Effect of low lactose dairy powder addition on the properties of gluten-free batters and bread quality. *Eur Food Res Technol* 229:31–41
28. Ojetti V, Nucera G, Migneco A, Gabrielli M, Lauritano C, Danese S, Assunta Zocco MA, Nista EC, Cammarota G, de Lorenzo A, Gasbarrini G, Gasbarrini A (2005) High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. *Digestion* 71:106–110
29. Gujral HS, Guardiola I, Carbonell JV, Rosell CM (2003) Effect of cyclodextrinase on dough rheology and bread quality from rice flour. *J Agric Food Chem* 51:3814–3818
30. Renzetti S, Courtin CM, Delcour JA, Arendt EK (2010) Oxidative and proteolytic enzyme preparations as promising improvers for oat bread formulations: rheological, biochemical and microstructural background. *Food Chem* 119:1465–1473
31. Renzetti S, Arendt EK (2009) Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: from textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *J Cereal Sci* 48:33–45
32. Gujral HS, Rosell CM (2004) Improvement of the breadmaking quality of rice flour by glucose oxidase. *Food Res Int* 37:75–81
33. Renzetti S, Dal BF, Arendt EK (2008) Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *J Cereal Sci* 48:33–45
34. Schober TJ, Bean SR, Boyle DL, Park SH (2008) Improved viscoelastic zein-starch doughs for leavened gluten-free breads: their rheology and microstructure. *J Cereal Sci* 48:755–767
35. De Vuyst L, Vancanneyt M (2007) Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiol* 24:120–127
36. Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH, Vogelmann SA (2005) Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol* 16:4–11
37. Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel RF (2007) Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiol* 24:128–138
38. Poutanen K, Flander L, Katina K (2009) Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiol* 26:693–699
39. Ryan LAM, Dal BF, Arendt EK (2008) The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread. *Int J Food Microbiol* 125:274–278
40. Arendt EK, Ryan LAM, Dal Bello F (2007) Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* 24:165–174
41. Galle S, Schwab C, Arendt E, Gänzle M (2010) Exopolysaccharide-forming *Weissella* strains as starter cultures for sorghum and wheat sourdoughs. *J Agric Food Chem* 58:5834–5841
42. Houben A, Goetz H, Mitzscherling M, Becker T (2010) Modification of the rheological behaviour of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) dough. *J Cereal Sci* 51:350–356
43. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2004) Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 27:151–159
44. Moore M, Dal BF, Arendt E (2008) Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *Eur Food Res Technol* 226:1309–1316
45. Moore MM, Juga B, Schober TJ, Arendt EK (2007) Effect of lactic acid bacteria on properties of gluten-free sourdoughs, batters, and quality and ultrastructure of gluten-free bread. *Cereal Chem* 84:357–364
46. Moroni AV, Arendt EK, Dal Bello F (2010a) Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts

- in spontaneously fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Micro* 28, 497–502
47. Moroni AV, Arendt EK, Morrissey JP, Dal Bello F (2010b) Development of buckwheat and teff sourdoughs with the use of commercial starters. In *J food Microb* 142:142–148
  48. Schober TJ, Bean SR, Boyle DL (2007) Gluten-free sorghum bread improved by sourdough fermentation: biochemical, rheological, and microstructural background. *J Agric Food Chem* 55:5137–5146
  49. Sterr Y, Weiss A, Schmidt H (2009) Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. *Int J Food Microbiol* 136:75–82
  50. Vogelmann SA, Seitter M, Singer U, Brandt MJ, 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. *Int J Food Microbiol* 130:205–212
  51. Weiss A, Bertsch D, Struett S, Sterr Y, Schmidt H (2009) Isolierung und Charakterisierung potentieller Starterkulturen aus Amaranth-, Buchweizen- und Hirse- Sauerteigen. *Getreidetechnologie* 63:68–75
  52. 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 Chem* 85:679–684
  53. Gänzle MG, Schieber A, Svensson L, Teixeira J, McNeill V (2010) Formation and modification of bioactive compounds in gluten free sourdoughs. In: Second international symposium on gluten-free cereal products and beverages, Tampere, pp 89–90
  54. Hamad SH, Böcker G, Vogel RD, Hammes WP (1992) Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kiswa production. *Appl Microbiol Biotechnol* 37:728–731
  55. Hamad SH, Dieng MC, Ehrmann MA, Vogel R (1997) Characterisation of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *J Appl Microbiol* 83:764–770
  56. Mohammed SI, Steenson LR, Kirleis AW (1991) Isolation and characterization of microorganisms associated with the traditional sorghum fermentation for production of Sudanese kiswa. *Appl Environ Microbiol* 57:2529–2533
  57. Gasse MAA (1999) Study of the microorganisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Giza region, Saudi Arabia. *J Appl Microbiol* 86:221–225
  58. Hayford AE, Petersen A, Vogensen FK, Jakobsen M (1999) Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl Environ Microbiol* 65:3213–3221
  59. Jespersen L, Halm M, Kpodo K, Jakobsen M (1994) Significance of yeasts and moulds occurring in maize dough fermentation for “kenkey” production. *Int J Food Microbiol* 24:239–248
  60. Olsen A, Halm M, Jakobsen M (1995) The antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermented maize (kenkey) and their interactions during fermentation. *J Appl Bacteriol* 79:506–512
  61. Ampe F, ben Omar N, Moizan C, Wachter C, Guyot JP (1999) Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl Environ Microbiol* 65:5464–5473
  62. Ben Omar N, Ampe F (2000) Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Appl Environ Microbiol* 66:3664–3673
  63. Escalante A, Wachter C, Farrés A (2001) Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int J Food Microbiol* 64:21–31
  64. Edema MO, Sanni AI (2008) Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiol* 25:616–625
  65. Sanni AI, Onilude AA, Fatungase MO (1998) Production of sour-maize bread using starter cultures. *World J Microbiol Biotechnol* 14:101–106
  66. Ashenafi M (2006) A review on the microbiology of indigenous fermented food and beverages in Ethiopia. *Ethiop J Microbiol Sci* 5:189–245
  67. De Vuyst L, Vrancken G, Ravyts F, Rimaux T, Weckx S (2009) Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food*

- Microbiol 26:666–675
68. Gänzle M, Schwab C (2009) Exploitation of the metabolic potential of lactic acid bacteria for improved quality of gluten-free bread. In: Arendt EK, Dal Bello F (eds) The science of gluten-free food and beverages. AACC International, St Paul
69. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 69:475–482
70. Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 69:7453–7461
71. Rosenquist H, Hansen A (2000) The microbial stability of two bakery sourdoughs made from conventionally and organically grown rye. Food Microbiol 17:241–250
72. 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. Appl Environ Microbiol 75:1099–1109
73. 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. Appl Environ Microbiol 74:2414–2423
74. Holzapfel WH (2002) Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. Int J Food Microbiol 75:197–212
75. Gänzle MG, Loponen J, Gobbetti M (2008) Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. Trends Food Sci Tech 19:513–521
76. 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 pro-tein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. Appl Environ Microbiol 68:623–633
77. Thiele C, Gaenzle MG, Vogel RF (2003) Fluorescence labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerization during dough processing and sourdough fermentation. J Agric Food Chem 51:2745–2752
78. Gobbetti M, Simonetti MS, Rossi J, Cossignani L, Corsetti A, Damiani P (1994) Free D- and L-amino acid evolution during sourdough fermentation and baking. J Food Sci 59:881–884
79. Spicher G, Nierle W (1988) Proteolytic activity of sourdough bacteria. Appl Microbiol Biotechnol 28:487–492
80. Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF (2002) Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. Cereal Chem 79:45–51
81. Elkhaila A, Bernhardt R, Bonomi F, Iametti S, Pagani M, Zardi M (2006) Fermentation modifies protein/protein and protein/starch interactions in sorghum dough. Eur Food Res Technol 222:559–564
82. Mugula JK, Nnko SAM, Narvhus JA, Sørhaug T (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. Int J Food Microbiol 80:187–199
83. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS (2000) In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. Nat Med 6:337–342
84. Kendall M, Schneider R, Cox PS, Hawkins CF (1972) Gluten subfractions in coeliac disease. Lancet 18:1065–1067
85. Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F, Vogel R (2008) Effects of different *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. Eur Food Res Technol 226:1495–1502
86. Di Cagno R, De Angelis M, Auricchio S, Greco L, Clarke C, De Vincenzi M, Giovannini C, D'Archivio M, Landolfo F, Parrilli G, Minervini F, Arendt E, Gobbetti M (2004) Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Appl Environ Microbiol 70:1088–1096
87. De Angelis M, Coda R, Silano M, Minervini F, Rizzello CG, Di Cagno R, Vicentini O, De Vincenzi M, Gobbetti M (2006) Fermentation by selected sourdough lactic acid bacteria to

- decrease coeliac intolerance to rye flour. *J Cereal Sci* 43:301–314
88. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507
89. Giuliani GM, Benedusi A, Di Cagno R, De Angelis M, Luisi A, Gobbetti M (2006) Miscela di batteri lattici per la preparazione di prodotti da forno senza glutine, RM2006A000369
90. De Vuyst L, Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23:153–177
91. Tiekink M, Gänzle MG (2005) Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. *Trends Food Sci Technol* 16:79–84
92. Di Cagno R, De Angelis M, Limitone A, Minervini F, Carnevali P, Corsetti A, Gaenzle M, Ciati R, Gobbetti M (2006) Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *J Agric Food Chem* 54:9873–9881
93. Lacaze G, Wick M, Cappelle S (2007) Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiol* 24:155–160
94. Korakli M, Pavlovic M, Ganzle MG, Vogel RF (2003) Exopolysaccharide and kestose production by *Lactobacillus sanfranciscensis* LTH2590. *Appl Environ Microbiol* 69:2073–2079
95. Katina K, Maina NH, Juvonen R, Flander L, Johansson L, Virkki L, Tenkanen M, Laitila A (2009) In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. *Food Microbiol* 26:734–743
96. Tiekink M, Korakli M, Ehrmann MA, Ganzle MG, Vogel RF (2003) In situ production of exopolysaccharides during sourdough fermentation by cereal and intestinal isolates of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 69:945–952
97. Brandt MJ, Roth K, Hammes WP (2003) Effect of an exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* LHT 1729 on dough and bread quality. In: De Vuyst L (ed) Sourdough from fundamentals to application. Vrije Universiteit Brussels (VUB), IMDO, Brussels, p 80
98. Monsan P, Bozonnet S, Albenne C, Joucla G, Willemot RM, Remaud-Siméon M (2001) Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 11:675–685
99. Cummings JH, Macfarlane GT, Englyst HN (2001) Prebiotic digestion and fermentation. *Am J Clin Nutr* 73:415S–420S
100. Dal Bello F, Walter J, Hertel C, Hammes WP (2001) In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *Syst Appl Microbiol* 24:232–237
101. Kaditzky S, Vogel R (2008) Optimization of exopolysaccharide yields in sourdoughs fermented by lactobacilli. *Eur Food Res Technol* 228:291–299
102. Goesaert H, Slade L, Levine H, Delcour JA (2009) Amylases and bread firming – an integrated view. *J Cereal Sci* 50:345–352
103. Goesaert H, Gebruers K, Courtin CM, Brijs K, Delcour J (2006) Enzymes in breadmaking. In: Hui YH (ed) Bakery products. Science and technology. Blackwell Publishing, Ames, pp 337–364
104. Barber B, Ortola C, Barber S, Fernandez F (1992) Storage of packaged white bread. III: Effects of sourdough and addition of acids on bread characteristics. *Z Lebensm Unters Forsch* 194:442–449
105. Sanni AI, Morlon-Guyot J, Guyot JP (2002) New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. *Int J Food Microbiol* 72:53–62
106. Tou EH, Mouquet-Rivier C, Rochette I, Traoré AS, Trèche S, Guyot JP (2007) Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chem* 100:935–943
107. Corsetti A, Gobbetti M, De Marco B, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi J (2000) Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem* 48:3044–3051
108. Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J, Damiani P (1998) Antimould activity of sourdough lactic

- acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:253–256
109. Hugo LF, Rooney LW, Taylor JRN (2003) Fermented sorghum as a functional ingredient in composite breads. *Cereal Chem* 80:495–499
110. Songré-Ouattara LT, Mouquet-Rivier C, Icard-Vernière C, Rochette I, Diawara B, Guyot JP (2009) Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *Int J Food Microbiol* 130:258–264
111. Legan JD (1993) Mould spoilage of bread. *Int Biodeter Biodegr* 32:33–53
112. Messens W, De Vuyst L (2002) Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. *Int J Food Microbiol* 72:31–43
113. Schnürer J, Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* 16:70–78
114. Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Ström K, Sjögren J, van Sinderen D, Schnürer J, Arendt EK (2007) Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci* 45:309–318
115. Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A (2003) Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl Environ Microbiol* 69:634–640
116. Ryan LAM, Dal Bello F, Czerny M, Koehler P, Arendt EK (2009) Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 57:1060–1064
117. Gänzle MG, Holtzel A, Walter J, Jung G, Hammes WP (2000) Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Appl Environ Microbiol* 66:4325–4333
118. Gänzle MG (2004) Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:326–332
119. Katina K, Sauri M, Alakomi HL, Mattila-Sandholm T (2002) Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *Lebensm Wiss Technol* 35:38–45
120. Valerio F, De Bellis P, Lonigro SL, Visconti A, Lavermicocca P (2008) Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. *Int J Food Microbiol* 122:328–332
121. Bohn L, Meyer A, Rasmussen S (2008) Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* 9:165–191
122. De Angelis M, Gallo G, Corbo MR, McSweeney PLH, Faccia M, Giovine M, Gobbetti M (2003) Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Int J Food Microbiol* 87:259–270
123. Lopez HW, Krespine V, Guy C, Messenger A, Demigne C, Remesy C (2001) Prolonged fermentation of whole wheat sourdough reduces phytate level and increases soluble magnesium. *J Agric Food Chem* 49:2657–2662
124. Reale A, Mannina L, Tremonte P, Sobolev AP, Succi M, Sorrentino E, Coppola R (2004) Phytate degradation by lactic acid bacteria and yeasts during the wholemeal dough fermentation: a 31P NMR study. *J Agric Food Chem* 52:6300–6305
125. Osman MA (2004) Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation. *Food Chem* 88:129–134
126. Songre-Outtara LT, Mouquet-Rivier C, Icard-Verniere C, Rochette I, Diawara B, Guyot JP (2009) Potential of amylolytic lactic acid bacteria to replace the use of malt for partial starch hydrolysis to produce African fermented pearl millet gruel fortified with groundnut. *Int J Food Microbiol* 130:217–229

## Chapitre 12

# Perspectives

Michael Gänzle et Marco Gobbetti

### 12.1 Écologie microbienne du levain

La caractérisation du microbiote d'un grand nombre de levains artisanaux et industriels a permis de mieux comprendre l'écologie microbienne des levains et d'identifier plus d'une douzaine de nouvelles espèces ([1-3], Chap. 5). L'origine du microbiote des levains reste, elle, incertaine. La contamination environnementale semble jouer un rôle pour les levures isolées dans le levain [4]. En revanche, les bactéries lactiques des levains stabilisés sont sensiblement différentes de celles des levains jeunes obtenus par fermentation spontanée ou de celles des matières premières céréalieres. Ces dernières ne semblent donc pas être une source significative de la plupart des lactobacilles associés au levain. En outre, les levains rafraîchis restent la seule source connue de plusieurs espèces de *Lactobacillus*. Des modifications importantes dans le microbiote des levains ont été observées durant une fermentation de longue durée à échelle artisanale [4]. Dans d'autres cas, le microbiote des levains est resté stable sur le plan des souches lors d'une fermentation de plusieurs décennies. Le séquençage du génome de *Lactobacillus sanfranciscensis* a fourni récemment un aperçu inédit de l'évolution microbienne dans l'environnement du levain. Un séquençage du génome entier de deux souches isolées du même levain industriel avant et après un rafraîchi continu sur dix-huit ans a montré que le génome n'avait subi que des changements minimes au cours de cette période [5]. Il est donc peu probable que l'utilisation du levain par l'homme permette l'évolution d'espèces microbiennes spécialisées ou de lignées d'espèces de *Lactobacillus* adaptées au levain.

---

M. Gänzle (\*)

Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta,  
Edmonton, Canada  
mgaenzle@ualberta.ca

M. Gobbetti

Department of Soil, Plant and Food Science, University of Bari Aldo Moro, Bari, Italie

M. Gobbetti et M. Gänzle (éds.), *Handbook on Sourdough Biotechnology*,  
DOI 10.1007/978-1-4614-5425-0\_12, © Springer Science+Business Media New York 2013

Le microbiote du levain et le microbiote lactique des intestins de l'homme et des animaux présentent des similitudes remarquables, ce qui signifie que les lactobacilles de l'intestin sont une source potentielle de souches adaptées au levain [1]. La disponibilité du substrat de la partie supérieure de l'intestin grêle des mammifères qui consomment des aliments à base de céréales, principal site de colonisation par les lactobacilles chez les porcs, la volaille et les rongeurs [6], est très similaire au levain. Le saccharose et le maltose sont les principales sources de carbone et le métabolisme des glucides par saccharose phosphorylase ou lévane saccharase et maltose phosphorylase, contribue à la capacité d'adaptation des lactobacilles à cet écosystème. L'origine intestinale des souches du levain a été récemment prouvée pour *L. reuteri*, à la fois symbionte de l'intestin et membre stable du microbiote de levains [1, 7]. Plusieurs lignées de *L. reuteri* ont évolué jusqu'à devenir spécifiques à leurs hôtes respectifs, à savoir les humains, les porcs, la volaille ou les rongeurs [7]. Une analyse par séquençage multilocus (MLST) et une analyse des caractéristiques génétiques et physiologiques spécifiques aux hôtes ont assigné cinq isolats de *L. reuteri* de levains rafraîchis à des lignées spécifiques aux humains ou aux rongeurs. Une hybridation génomique comparative a montré que l'isolat de levain *L. reuteri* LTH2584 est très proche sur le plan génétique de l'isolat des rongeurs *L. reuteri* 100-23. Ces résultats combinés prouvent que les isolats de levain de *L. reuteri* qui ont subsisté dans un levain rafraîchi sur plus de cinquante mille générations, étaient issus à l'origine d'un microbiote intestinal [8]. De même, *L. rossiae*, *L. pontis* et *L. fermentum* ont été décrits comme les membres stables d'un microbiote intestinal et du levain [9], les isolats du levain de ces espèces sont donc peut-être aussi issus de des intestins d'animaux.

La ressemblance entre le microbiote intestinal et celui des levains permet d'élaborer des produits céréaliers probiotiques qui utilisent des lactobacilles probiotiques comme starter. Le « Vellie », son d'avoine fermenté par des lactobacilles probiotiques, offre un modèle conceptuel pour ce type de produits [10]. S'il est peu probable que des lactobacilles de type mésophiles proviennent des intestins de mammifères, *L. sanfranciscensis* a cependant été isolé des intestins des mouches des fruits [11], ce qui pourrait constituer un réservoir répandu pour l'espèce.

Les levains de blé et de seigle présentent un microbiote similaire ; leur composition et leur activité dépendent essentiellement des conditions de transformation (voir Chap. 5). Le levain de blé dur, couramment utilisé pour la fabrication de pain dans le sud de l'Italie, semble favoriser les bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires en raison du taux élevé de maltose, de saccharose et d'acides aminés [12]. De plus, les matières premières utilisées en Afrique et en Asie du Sud pour la fermentation de céréales sont principalement le sorgo, le mil, le maïs, le riz et le teff [13]. Les bactéries lactiques dominantes dans ces substrats de fermentation ne coïncident qu'en partie seulement avec les levains de blé et de seigle [14, 15]. La température ambiante plus élevée dans les zones tropicales favorise les microbiotes thermophiles. Les facteurs dérivés des substrats, comme la disponibilité des glucides et la présence de composés phénoliques antimicrobiens contribuent également à l'établissement de microbiotes divergents et spécifiques aux substrats.

Toutefois, l'effet spécifique des matières premières sur l'écologie microbienne du levain n'est pas encore tout à fait élucidé. L'industrialisation de la production alimentaire dans les pays en développement devrait aboutir à un processus de fermentation plus normalisé et à la production de starters (voir par ex. [16]), comparables à ce qu'a connu le secteur de la boulangerie en Europe ces dernières décennies. Cette évolution devrait également permettre de mieux comprendre l'écologie microbienne de la fermentation des céréales dans les régions tropicales.

## **12.2 Levain et qualité des produits**

Les connaissances actuelles sur l'effet du métabolisme des glucides, la production d'exopolysaccharides et la conversion d'acides aminés permettent la sélection ciblée de starters pour améliorer la qualité du pain (voir Chap. 7). La disponibilité des séquences génomiques des lactobacilles adaptés au levain [7, 17, 18], en plus de mieux comprendre l'écologie microbienne des levains, facilite l'élucidation d'autres voies métaboliques de conversion des acides aminés, lipides et composés phénoliques et de leur effet sur la qualité du pain. La mise au point d'outils liés à la génomique comparative, les analyses protéomiques et transcriptomiques et le développement de nouveaux outils pour la réorganisation métabolique des bactéries lactiques du levain contribuent à expliquer l'effet de chacune des voies métaboliques sur la qualité du pain [7, 8, 18]. Une analyse plus approfondie de l'effet des caractéristiques métaboliques spécifiques aux souches sur la qualité des produits, associée à une baisse des coûts liés aux analyses génomiques des starters, devrait faciliter la sélection de souches *in silico* en complétant l'évaluation des cultures en situation d'application.

## **12.3 Levain et nutrition**

La comparaison entre les produits de boulangerie faits à partir de levure de boulangerie ou de poudre à lever (levure chimique), d'une part, et de levain, d'autre part, montre clairement que le pain au levain est plus digeste et que ses minéraux ont une meilleure biodisponibilité en raison de la dégradation substantielle des composants des céréales (par ex. protéines et phytate) durant la fermentation [19]. C'est déjà en soi un argument incontestable en faveur de l'utilisation du levain. Toutefois, les politiques publiques et le secteur du développement des produits industriels dans les pays développés n'ont plus pour premier objet de répondre aux besoins nutritionnels de base en augmentant la biodisponibilité de macronutriments et micronutriments. Les politiques publiques ou la R & D en formulation d'aliments fonctionnels visent plus à prévenir ou réduire les maladies chroniques qui ont une forte prévalence dans ces pays. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, le diabète, la maladie cœliaque, ainsi que les maladies cardiovasculaires, l'obésité et le syndrome métabolique font partie de ces maladies chroniques fortement liées au régime alimentaire.

En conséquence, la formulation de produits alimentaires fonctionnels est devenue un aspect important du développement des produits industriels et de la diversification des produits. Il s'agit notamment de produits sans gluten, de produits ayant une teneur réduite en sodium ou plus riches en fibres et d'aliments enrichis en antioxydants et en composés bioactifs.

Les produits à base de farine de blé, comme le pain, les biscuits et les céréales du petit-déjeuner, sont caractérisés par un indice glycémique et un indice insulémique assez élevés. La fermentation au levain ou l'ajout de fibres solubles sont les outils les plus prometteurs pour diminuer la digestibilité de l'amidon et, par conséquent, les valeurs de l'indice glycémique et de l'indice insulémique. Cet effet est imputable à différents mécanismes qui doivent faire l'objet de recherches plus approfondies [20, 21]. La fermentation au levain est une biotechnologie indispensable pour la fabrication de pain complet, en particulier de pain de seigle et pourrait servir à modifier les composants des céréales riches en fibres, comme le son et le germe pour en optimiser la fonctionnalité technologique.

Ces dix dernières années, plusieurs études [22-26] ont montré que des protéases fongiques ou du malt associés au levain peuvent induire l'hydrolyse complète du gluten dans des fermentations de longue durée. Comme l'ont prouvé récemment deux épreuves *in vivo*, la farine de blé fermentée par certains lactobacilles du levain et des protéases fongiques est tolérée par les personnes souffrant de la maladie cœliaque en phase de rémission. La fermentation au levain améliore également l'acceptabilité sensorielle des produits naturellement sans gluten et pourrait prévenir la contamination croisée modérée par le gluten.

Le métabolisme microbien durant la fermentation au levain peut aussi favoriser la synthèse, la libération et/ou la biodisponibilité d'un certain nombre de composés fonctionnels comme les vitamines, les composés phytochimiques, les exopolysaccharides prébiotiques et les peptides bioactifs. A titre d'exemple, les peptides antioxydants, comme la lunasine, sont libérés par les protéines des céréales durant la fermentation au levain. Ces peptides pourraient avoir une activité préventive prometteuse contre les stress oxydatifs associés aux maladies dégénératives liées au vieillissement (cancer, artériosclérose) [27].

En conclusion, l'utilisation du levain est devenue au fil des ans, un outil important du développement de produits de boulangerie fonctionnels (voir Chap. 10 et 11). Nous comprenons de mieux en mieux le lien complexe entre régime alimentaire et maladies chroniques. Ces connaissances permettent d'exploiter la formation ou la modification de composés bioactifs durant la fermentation au levain afin d'ouvrir plus de possibilités d'élaboration de produits au levain dotés de fonctions nutritionnelles spécifiques.

## **12.4 Utilisation artisanale et industrielle du levain**

Dans les pays européens, on estime que de 30 à 50 % du pain est produit à partir de levain ou de produits au levain. En Amérique du Nord, le levain représente un segment modeste du marché des améliorants de panification, mais qui connaît une croissance rapide.

L'utilisation traditionnelle du levain comme ferment en boulangerie artisanale se maintient dans les petites et moyennes boulangeries spécialisées. Les spécialités régionales, en particulier, comme le Panettone, le Pumpernickel ou le pain au levain de San Francisco, continuent d'utiliser le levain comme ferment. En revanche, pour une majorité d'applications industrielles, l'objectif technologique du levain a changé, passant du rôle traditionnel de ferment à celui d'agent acidifiant ou d'améliorant (voir Chap. 1). Cette évolution est sous-tendue par les efforts de l'industrie pour produire des aliments sans additifs (Produits 'clean label').

L'utilisation du levain permet de produire du pain à partir de farine et d'eau et éventuellement de levure et de sel, et ainsi de remplacer de nombreux autres ingrédients visant à améliorer la qualité du pain et à prolonger sa durée de conservation. En outre, le recours à un levain entretenu sur le site de production peut représenter des économies substantielles. Des ingrédients comme le malt, les émulsifiants, les hydrocolloïdes ou les enzymes sont remplacés par l'expertise et l'équipement nécessaires à la fermentation au levain. Mais peu de boulangeries industrielles maîtrisent la fermentation du levain automatisée et à grande échelle. L'un des principaux freins est le manque de disponibilité en équipements nécessaires au contrôle de la fermentation pour utiliser le levain comme ferment. L'équipement pour la fermentation industrielle du levain est généralement prévu pour des fermentations (semi) automatisées conformément aux procédures traditionnelles et est donc incompatible avec la production de pain continue à grande échelle [28]. En conséquence, la fermentation avec levain est de plus en plus souvent confiée à des fournisseurs spécialisés [29]. La mise en œuvre de levain dans les boulangeries peut faire appel à des préparations stabilisées, généralement déshydratées, qui se conservent dans le temps. Cette seconde gamme de produits au levain, parallèle aux fermentations traditionnelles, permet d'innover et ainsi de proposer des produits qui répondent aux besoins spécifiques des clients – avec, par exemple, des levains de levure actifs prêts à l'emploi, des levains déshydratés riches en exopolysaccharides ou en composés aromatiques dérivés de la réaction de Maillard et des starters sélectionnés pour des caractéristiques métaboliques spécifiques permettant d'améliorer la qualité du pain. (Note des traducteurs : on se situe ici dans un contexte international de l'utilisation et de la définition du levain)

Il est intéressant de constater que les starters lyophilisés pour l'inoculation directe de la pâte à pain n'ont pas trouvé d'écho commercial étendu en boulangerie, contrairement à l'utilisation prédominante des starters dans les fermentations des produits carnés et laitiers. Les cultures lyophilisées ne peuvent développer l'activité métabolique nécessaire dans les méthodes directes et nécessitent donc une revitalisation avec une pâte préfermentée ou un levain de levure avant utilisation. Le rafraîchi 'maison' avec réactivation occasionnelle du microbiote à l'aide de starters lyophilisés à base de céréales est ainsi privilégié par de nombreuses boulangeries.

L'utilisation croissante du levain comme améliorant de panification peut aussi permettre d'inclure des microorganismes et des matières premières non conventionnels de ce milieu. La fermentation continue du levain favorise invariablement les microbiotes composés de bactéries lactiques et de levures. La production industrielle d'améliorants, elle, peut être amorcée par d'autres organismes de qualité alimentaire qui prolifèrent dans les substrats céréaliers et peuvent conserver leur prédominance pendant une ou plusieurs étapes de la fermentation.

Les bifidobactéries [30], les bactéries propioniques [31], les moisissures et bactéries acétiques [32] peuvent se développer dans les substrats céréaliers et ont été utilisés lors d'essais expérimentaux de fermentations céréalières. En outre, les fermentations de céréales traditionnelles pratiquées en Afrique, en Asie et en Amérique latine pour la production de pain cuit à la vapeur, de boissons, de porridges, de vinaigre ou de condiments, constituent un réservoir d'agents de fermentation bien adaptés aux à ces substrats. Le potentiel métabolique de ces organismes diffère largement des bactéries lactiques du levain et leur utilisation offre de nouvelles fonctionnalités pour les produits de boulangerie.

## Références

1. Vogel RF, Knorr R, Müller MRA, Steudel U, Gänzle MG, Ehrmann MA (1999) Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:403–411
2. Meroth CB, Walter J, Hertel C, Brandt MJ, Hammes WP (2003) Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 69:475–482
3. De Vuyst L, Neysens P (2005) The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci Technol* 16:43–56
4. Minervini F, Lattanzi A, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M (2012) Artisan bakery or laboratory propagated sourdoughs: influence on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Appl Environ Microbiol*. doi:10.1128/AEM.00572-12
5. Ehrmann MA, Behr J, Böcker G, Vogel RF (2011) The genome of *L. sanfranciscensis* after 18 years of continuous propagation. In: Abstract, presented at the 10th symposium on lactic acid bacteria, Egmond aan Zee. Accessed via [www.lab10.org](http://www.lab10.org) on 20 June 2012
6. Walter J (2008) Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 74:4985–4996
7. Frese SA, Benson AK, Tannock GW, Loach DM, Kim J, Zhang M, Oh PL, Heng NC, Patil PB, Juge N, Mackenzie DA, Pearson PM, Lapidus A, Dalin E, Tice H, Goltsman E, Land M, Hauser L, Ivanova N, Kyrpides NC, Walter J (2011) The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. *PLoS Genet* 7:e1001314
8. Su MSW, Oh PL, Walter J, Gänzle MG (2012) Phylogenetic, genetic, and physiological analysis of sourdough isolates of *Lactobacillus reuteri*: food fermenting strains are of intestinal origin. *Appl Environ Microbiol* 78:6777–6780.
9. Hammes WP, Hertel C (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes* 4:320–403
10. Salovaara HO (2006) Cereal-based alternatives to dairy snacks of yogurt-type. Paper presented at World Grain Summit: foods and beverages, San Francisco, 17–20 Sept 2006. <http://www.aaccnet.org/meetings/Documents/Pre2009Abstracts/2006Abstracts/S-68.htm>
11. Groenewald WH, Van Reenen CA, Todorov SD, Du Troit M, Witthuhn RC, Holzapfel WH, Dicks LMT (2006) Identification of lactic acid bacteria from vinegar flies based on phenotypic and genotypic characteristics. *Am J Enol Vitic* 57:519–525
12. Minervini F, Di Cagno R, Lattanzi A, De Angelis M, Antonielli L, Cardinali G, Cappelle S,

- Gobbetti M (2012) Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Appl Environ Microbiol* 78:1251–1264
13. Nout MJ (2009) Rich nutrition from the poorest - Cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiol* 26:685–692
14. Vogelmann SA, Seitter M, Singer U, Brandt MJ, Hertel C (2009) Adaptability of lactic acid bacteria and yeast to sourdoughs prepared from cereals, pseudo-cereals and cassava and the use of competitive strains as starter cultures. *Int J Food Microbiol* 130:205–212
15. Sekwati-Monang B, Gänzle MG (2011) Microbiological and chemical characterisation of ting, a sorghum-based sourdough product from Botswana. *Int J Food Microbiol* 150:115–121
16. Keeratipibul S, Luangsakul N, Otsuka S, Hatano Y, Tanasupawat S (2010) Application of the Chinese Steamed bun starter dough (CSB-SD) in breadmaking. *J Food Sci* 75:596–604
17. Liu M, Nauta A, Francke C, Siezen RJ (2008) Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 74:4590–4600
18. Vogel RF, Pavlovic M, Ehrmann MA, Wiezer A, Liesegang H, Offschanka S, Voget S, Angelov A, Böcker G, Liebl W (2011) Genomic analysis reveals *Lactobacillus sanfranciscensis* as stable element in traditional sourdoughs. *Microbiol Cell Fact* 10(Suppl 1):S6
19. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cagno R (2005) Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci Technol* 16:57–69
20. De Angelis M, Damiano N, Rizzello CG, 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. *Eur Food Res Technol* 229:593–601
21. Maioli M, Pes GM, Sanna M, Cherchi S, Dettori M, Manca E, Farris GA (2008) Sourdough-leavened bread improves postprandial glucose and insulin plasma levels in subjects with impaired glucose tolerance. *Acta Diabetologica* 45:91–96
22. 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. *Appl Environ Microbiol* 68:623–633
23. Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C, Gobbetti M (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507
24. Di Cagno R, Barbato M, Di Camillo C, Rizzello CG, De Angelis M, Giuliani G, De Vincenzi M, Gobbetti M, Cucchiara S (2010) Gluten-free sourdough wheat baked goods appear safe for young celiac patients: a pilot study. *J Ped Gastroent Nutr* 51:777–783
25. Greco L, Gobbetti M, Auricchio R, Di Mase R, Landolfo F, Paparo F, Di Cagno R, De Angelis M, Rizzello CG, Cassone A, Terrone G, Timpone L, D’Aniello M, Maglio M, Troncone R, Auricchio S (2011) Safety for patients with celiac disease of baked goods made of wheat flour hydrolyzed during food processing. *Clin Gastroenterol Pathol* 9:24–29
26. De Angelis M, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, Di Cagno R, Francavilla R, Gobbetti M (2010) Gluten-free pasta made of *Triticum turgidum* L. var. *durum*: mechanisms of epitopes hydrolysis by peptidases of sourdough lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 75:508–518
27. Coda R, Rizzello CG, Pinto D, Gobbetti M (2012) Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during sourdough fermentation of cereal flours M. *Appl Environ Microbiol* 4:1087–1096
28. Böcker G (2006) Grundsätze von Anlagen für Sauerteig. In: Brandt MJ, Gänzle MG (eds) *Handbuch Sauerteig*, 6th edn. Behr’s Verlag, Hamburg, pp 329–352
29. Brandt MJ (2007) Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiol* 24:161–164
30. Sanz-Penella JM, Laparra JM, Sanz Y, Haros M (2012) Assessment of iron bioavailability in whole wheat bread by addition of phytase-producing bifidobacteria. *J Agric Food Chem* 60:3190–3195
31. Kariluoto S, Edelmann M, Herranen M, Lampi AM, Shmelev A, Salovaara H, Korhola M, Piironen V (2010) Production of folate by bacteria isolated from oat bran. *Int J Food*

32. Haruta S, Ueno S, Egawa I, Hashiguchi K, Fujii A, Nagano M, Ishii M, Igarashi Y (2006) Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 109:79–87