

La biodiversité des ferments au service de l'innovation alimentaire

▮ Jeudi 25 juin 2015



Ferments et aliments : Une longue histoire riche d'enseignement

Sylvie Lortal

Juin 2015
CIAG Paris

Fermentation = procédé de transformation des matières premières via l' action de microorganismes

Consommation des sucres, production / consommation d' acides organiques, hydrolyse des protéines, des lipides, ...production de métabolites dont composés aromatiques...

Permet un **allongement significatif de la conservation de la matière première et une diversification spectaculaire des goûts et textures = diversification de notre alimentation**

Origine ??? Environ 8 à 10 000 ans

Matières premières

Fruits, grains, feuilles, racines ...
Miel, viande, lait...

Microorganismes

RECYCLER

Hydrolyser en plus petites
molécules

Produire de nouvelles



ALIMENTS
FERMENTES

Eviter flores
d'altération
Ou toxiques

Homme

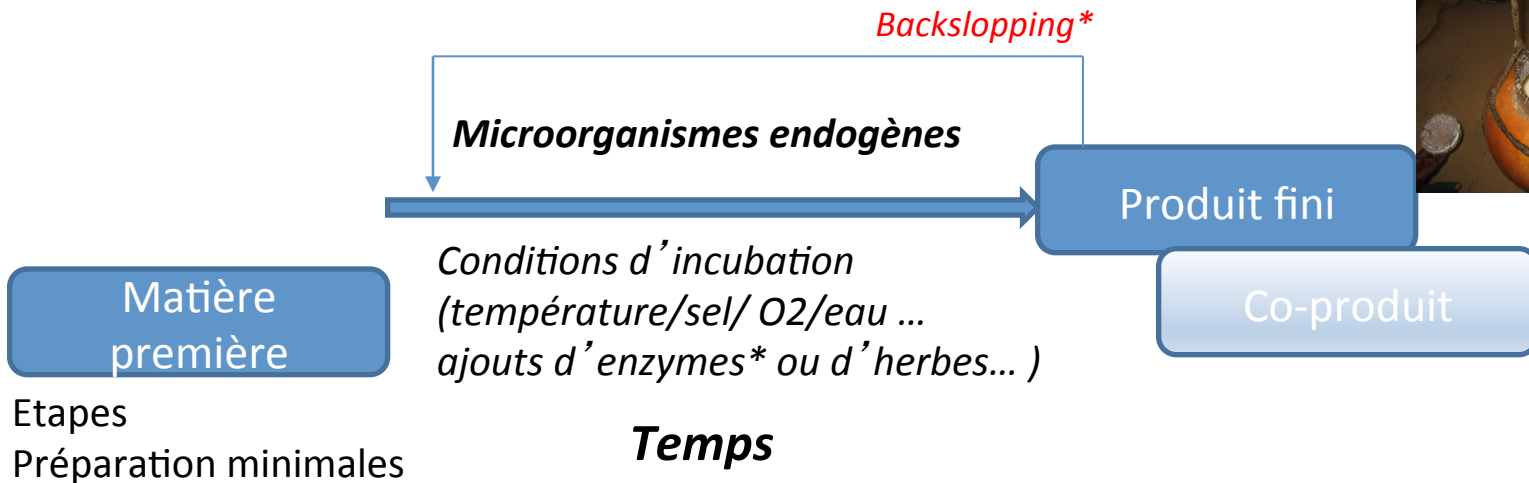
Aliments

Conserver/ sécuriser l'accès à
la nourriture.
à
Température ambiante

Procédé fermentaire originel

Zéro ferment

Equipement simple



Ex : lait fermenté Kefir ou caillé présure ; végétaux fermentés

Variété matières premières fermentescibles



Stables dans le temps
Globalement très sûrs sur le plan sanitaire
Variabilité résultat

La fermentation à zéro ferment

Variability of Bacterial Biofilms of the “Tina” Wood Vats Used in the Ragusano Cheese-Making Process[∇]

G. Licitra,¹ J. C. Ogier,⁴ S. Parayre,³ C. Pediliggieri,¹ T. M. Carnemolla,¹
 H. Falentin,³ M. N. Madec,³ S. Carpino,² and S. Lortal^{3*}

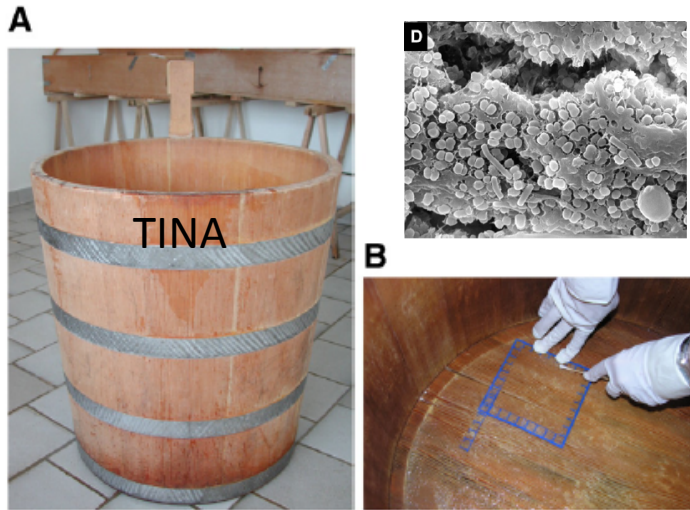
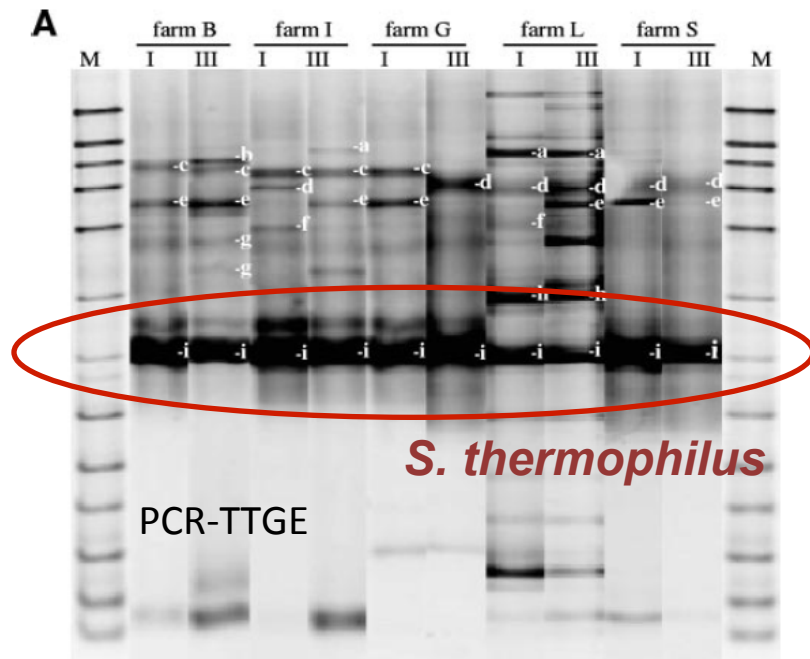


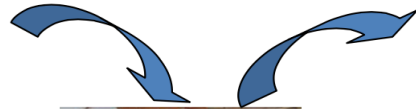
Fig. 1. Tina wood vat characteristics (A) and biofilm sampling (B) (surface of the blue square, 10 cm × 10 cm, five times per Tina).



La fermentation à zéro ferment

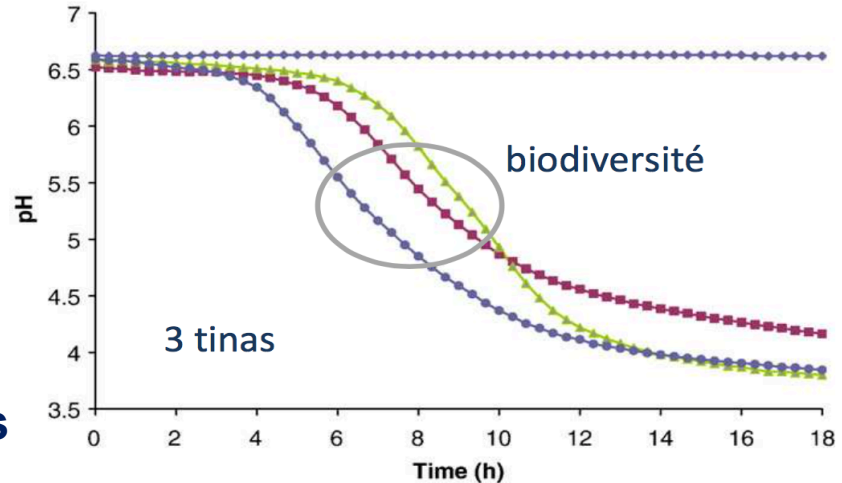
Acidification spontanée 37°C (CINAC)

Lait stérile



Importance ustensiles
dans systèmes traditionnels

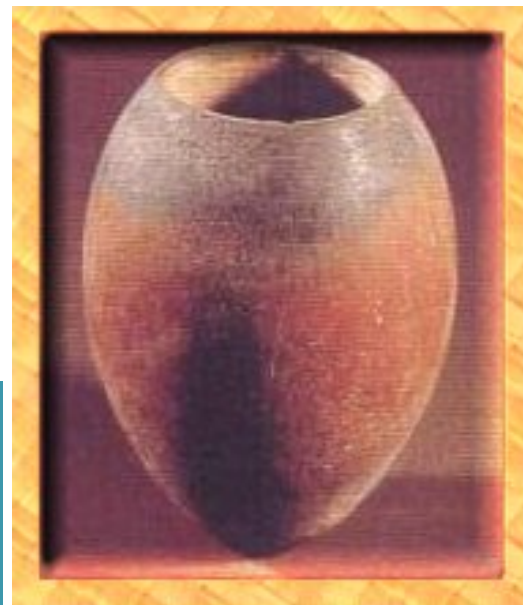
Lait après 10 min de contact /
ensemencement LAB par biofilm surface





Pain et bière omniprésents dans la nourriture en Egypte ancienne

« Pain et bière » est une expression que l'on retrouve gravée en hiéroglyphes dans tous les mastabas.

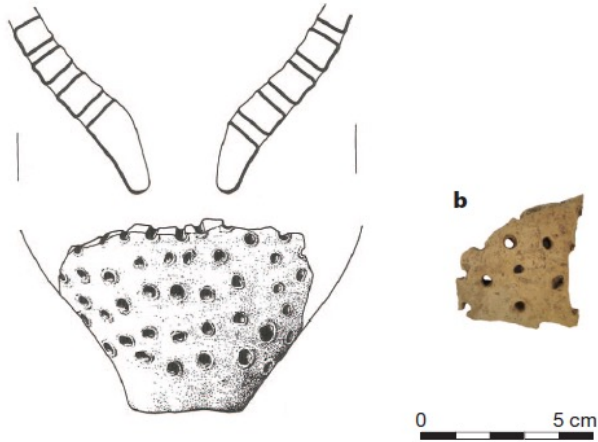


Bière ou **Sikaru** (pain liquide) : boisson extrêmement populaire ; fabrication à partir de patons à peine cuits.
= **Ferments identiques**

Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy *Science* 26 July 1996: - Vol. 273 no. 5274 pp. 488-490 DOI:10.1126/science.

273.5274.488

Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe



Pottery vessel
Lipids analysis

Salque et al., 2013. Nature

Critical step in making milk less perishable, and more digestible for early prehistoric farmers

Soit - 8000 years

Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China

Yimin Yang^{a,b,1}, Anna Shevchenko^{c,1}, Andrea Knaust^c, Idelisi Abuduresule^d, Wenying Li^d,
Xingjun Hu^d, Changsui Wang^{a,*}, Andrej Shevchenko^{c,*}

Journal of Archaeological Science 45 (2014) 178–186



Samples of food of 4000 years



Table 3

The number of peptides matched to proteins from LAB and yeasts by the proteomics analysis of Xiaohe foods.

Protein name	Gene identifier ^a	Organism ^b	M11	M13a	M22a	M22b	M24	M25
LAB proteins								
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi7c336054463	<i>L. kefiranofaciens</i>	7	4	6	5	8	7
Surface layer protein	gi7c336055311	<i>L. kefiranofaciens</i>	3					5
Surface layer protein	gi7c1054802	<i>L. helveticus</i>						2
Phosphopyruvate hydratase	gi7c227893416	<i>Lactobacillus ultunensis</i>	2				2	3
Pyruvate kinase	gi7c336054221	<i>Lactobacillus sp.</i>	2		3	2	2	4
D-lactate dehydrogenase	gi7c104773324	<i>Lactobacillus sp.</i>						2
Fructose-bisphosphate aldolase	gi7c104774377	<i>Lactobacillus sp.</i>						2
ATP-dependent protease	gi7c161508175	<i>Lactobacillus sp.</i>						
Conserved hypothetical protein	gi7c260101505	<i>L. helveticus</i>						
Elongation factor Tu	gi7c124377108	<i>L. kefiranofaciens</i>						
Glutamine synthetase	gi7c336053793	<i>L. kefiranofaciens</i>						
Yeasts proteins								
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	gi7c1245703	<i>K. marxianus</i>	10			6	6	5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1	gi7c116247787	<i>K. marxianus</i>	7	2	5	7	5	5
Pyruvate decarboxylase	gi7c416888	<i>K. marxianus</i>	7					
Enolase 2	gi7c6321968	<i>S. cerevisiae</i>	7		2	3		2
Alcohol dehydrogenase 2	gi7c12229579	<i>K. marxianus</i>	5			3		
70 kDa heat shock protein	gi7c172713	<i>Yeast sp.</i>	4					
Hypothetical protein	gi7c50312181	<i>K. lactis</i>	3		5	3	3	2
Unnamed protein	gi7c2867	<i>K. lactis</i>	3					
Hypothetical protein	gi7c365984825	<i>Naumovozyma sp.</i>			2			
Enolase 1	gi7c260944716	<i>Candida lusitanae</i>						3
Hypothetical protein	gi7c156836648	<i>Yeast sp.</i>						2
40S ribosomal protein S9	gi7c213402101	<i>Yeast sp.</i>						
tsa1p	gi7c401624401	<i>Yeast sp.</i>						
Histone H2b	gi7c6320430	<i>Yeast sp.</i>						2

^a If homologous proteins from multiple species could not be distinguished only one GI is shown.^b *Lactobacillus sp.* and yeast sp. indicate that homologous proteins from various *Lactobacillus* or yeast species were matched.

Première preuve direct
de la fermentation du lait

Grains de kéfir « ferments »

Procédé simple

« bioéconomique » par nature

Et pourtant



Produit fini drastiquement modifié sur le plan biochimique

« pré-digéré » par l'action bien dirigée
des microorganismes



MC Frederic

Tout ça sans avoir même conscience de l'existence des microorganismes



Ferments ?



Co-existence de ces deux types de produits fermentés dans de nombreux pays



Héritage précieux

Savoir faire ancestraux qui perdurent dans nombreuses régions du monde, production petite échelle, avec écosystèmes ou levains plus ou moins contrôlés et variabilité des produits finis

Toutes les principales catégories d'aliments fermentés existent

Industrialisation /urbanisation
Changement d'échelle
Développement hygiène alimentaire

Produits standardisés, plus « technologiques » produits à l'échelle industrielle, avec levains sélectionnés et écosystèmes simplifiés.

1ères traces
Fabrications Al. fermentés

JC

- 8000

1861

1885

1980

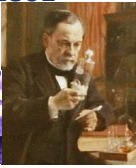
2005

2015

PCR

-omics

« les responsables de la fermentation semblent être de petits corps en forme de filaments »



FERMENTS

Révolutions méthodologiques

Connaissance / sélection ferments

env. 10000 ans

130 ans

25 ans

10 ans...

Empirisme total

Description – Maitrise

Mécanistique puis Méta

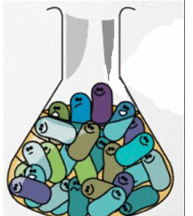
Ferments ?

1880 à 1980



Taxonomie, isolement souches, description phénotypique et beaucoup de biochimie

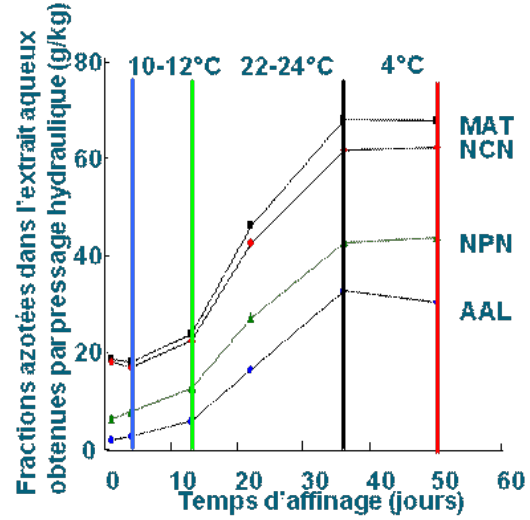
In vitro



Cinétiques dans les aliments fermentés



Ferments
Mélange de souches
indéfini



Leçon 1 : simplifier n' est pas la panacée ...

Souche pure de bactérie lactique (approche des anglosaxons) pour maîtriser acidification, peut conduire à des accidents de fabrication



Découverte des bactériophages

Whitehead, 1935

Recherches intensives
Rotation de souches

Leçon 2 : les propriétés technologiques d'intérêt sont espèces et souches dépendantes

Métabolisme carboné

Métabolisme azoté

Hydrolyse de protéines, lipides, production d'arômes

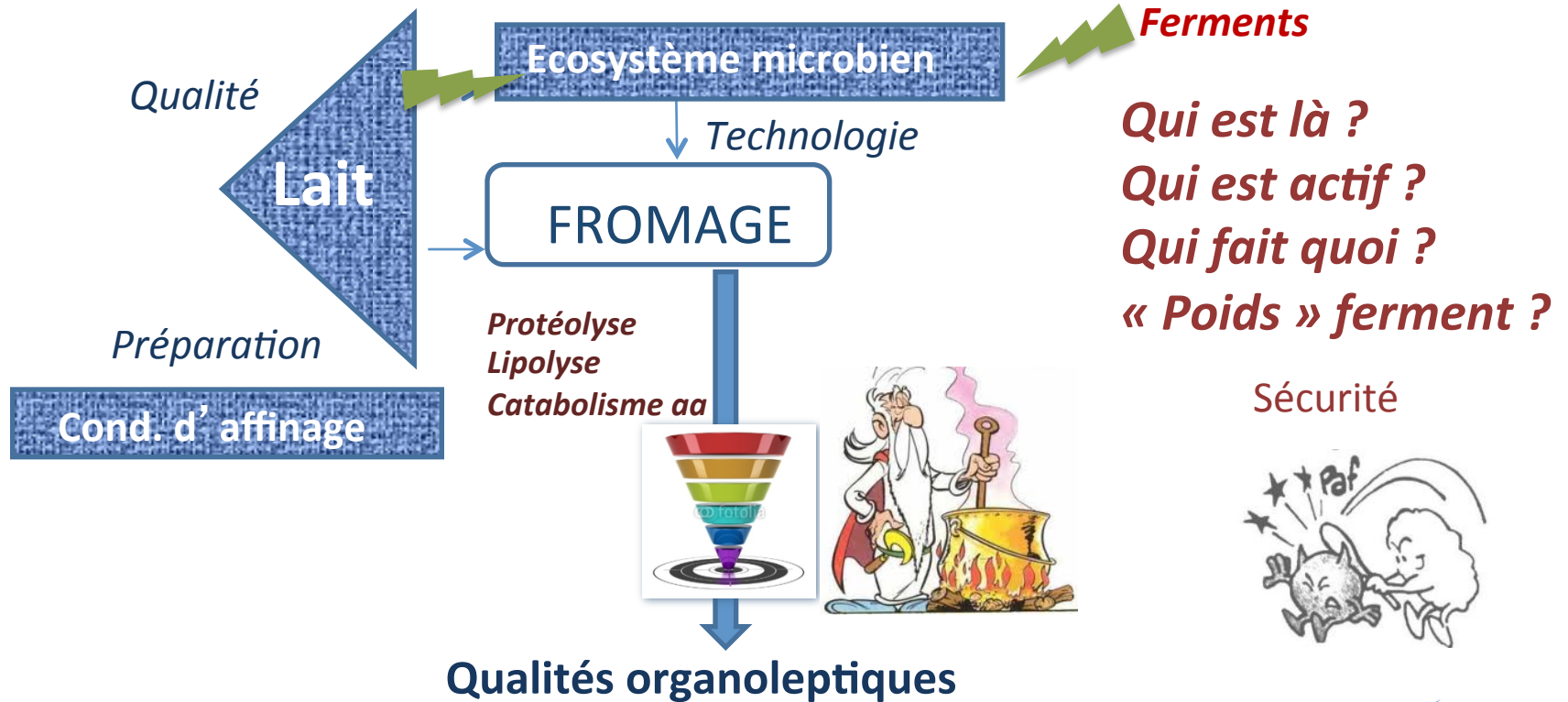
Action antagoniste / pathogènes

.....

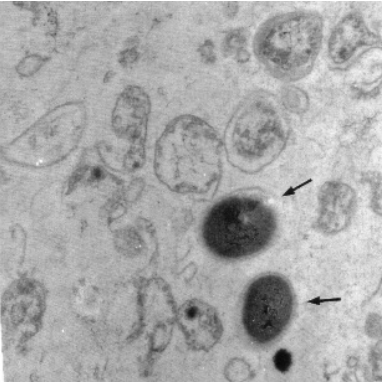
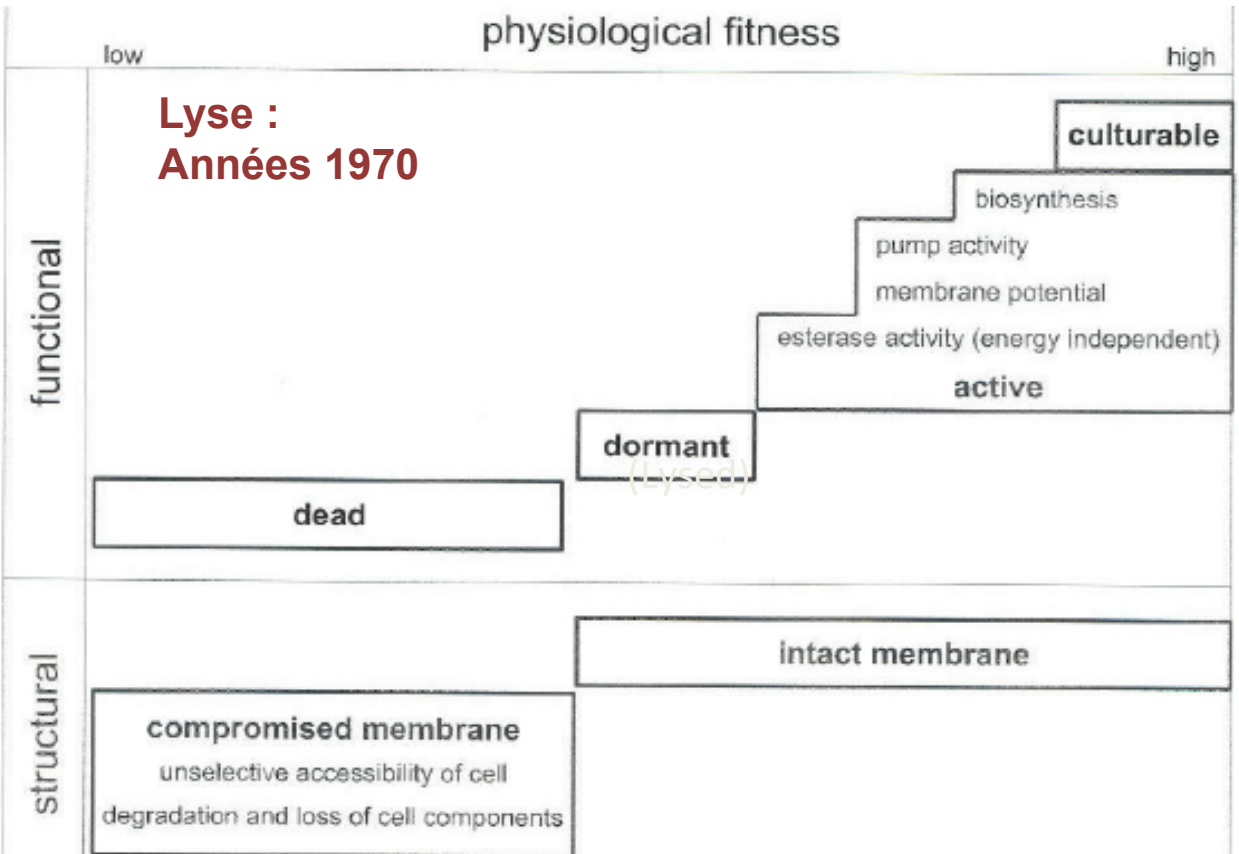
Lawrence et al., 1975

Ferment = levier d'innovation
et de sécurisation – composition optimale ?

Leçon 3 : le ferment agit dans un « système »



Leçon 4 : un ferment n'agit pas que pendant sa croissance - ses enzymes intracellulaires peuvent continuer au-delà



Bunthof C., PhD thesis, 2002

Fig 1. Classification of physiological cell states

Procédés fermentaires industrialisés

Préparation

- Congelés
- Lyophilisés
- Atomisés

Leçon 5 : toutes les souches ne peuvent résister aux étapes de préparation / ferment

Matière première

Ferments et +/-
microorganismes endogènes

Produit fini

Conditions d'incubation
(température/sel/ O2....)

Capteurs
Régulation thermique
Nettoyage

Transport
Conditions stockage

Réduire TEMPS !!!!

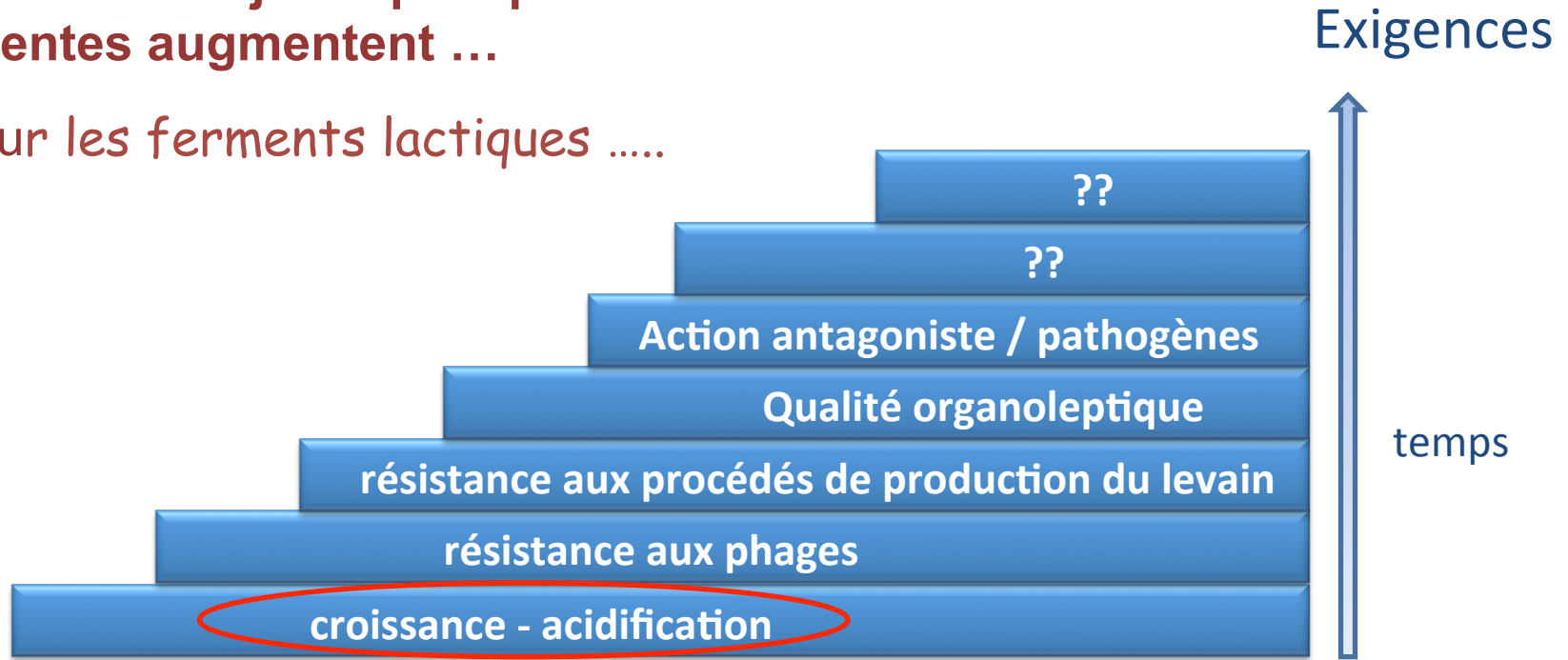
Etapes
Préparation

Fractionnement
Standardisation
Traitement thermique
Elimination flores endogènes**
Autres

Leçon 6 : Ferment complexe et multi espèces. Problèmes des interactions

Des ferments toujours plus performants Les attentes augmentent ...

Ex : pour les ferments lactiques



Les méthodes de sélection restent fastidieuses aboutissant à un nombre restreint de ferments

A partir de 1980 (PCR)

Plasmides, gènes / fonctions, règne « espèces modèles » ...

Taxonomie moléculaire - Typage et suivi de souches ferments !! .

et surtout à partir du séquençage du génome entier de *L. lactis*
(Bolotin et al., 2001)

La plupart le sont aujourd' hui

« Pangenomics – an avenue to improved industrial starters cultures ... »

Garrigues et al., 2013. Current Opinion in Biotechnology

Apports décisifs dans la compréhension

Variabilité au sein de l' espèce (Génétique et fonctionnelle) = Richesse

Stratégies adaptatives (en lien avec les procédés, l' environnement)

Réponses aux stresses, régulation, comportement, fonctions,

Evolution des génomes (Ecotype, Niche)

Mécanismes, transfert/perte de gènes, domestication des souches/espèces

Présence de gènes de résistance aux antibiotiques

Interactions microbiennes et chaines trophiques

Impact biodiversité μ en présence sur richesse organoleptique

Nouvelles applications

Ingénierie métabolique, usine cellulaire, biologie de synthèse

Leçon n°7 : l' accès au génome d' un ferment n' explique pas tout

Lien génotype – Phénotype plus complexe qu' escompté

25-30 % gènesfonctions ? ...

Prédiction de l' expression *in situ* ?

Et leçon n°8 : nécessité de renforcer les aspects réglementaires concernant les ferments

Dernière évolution depuis < 10 ans

Les Omics

Les MétaOmics

Interactions
In situ



In
Vitro

Extraction

DNA

RNA

Protéines

Métabolites

Génome
(Pan)

Transcriptome

Protéome

Métabolome

Phylobiome

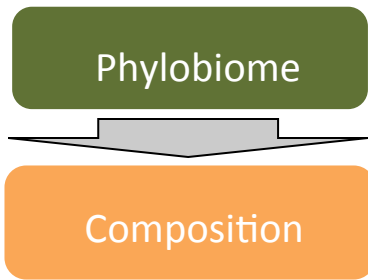
Métagénome

Méta-
transcriptome

Méta-
Protéome

Métabolome

ECOLOGIE et ECOSYSTEME



Cell

Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity

Benjamin E. Wolfe,^{1,2} Julie E. Button,^{1,2} Marcela Santarelli,^{1,3} and Rachel J. Dutton^{1,*}

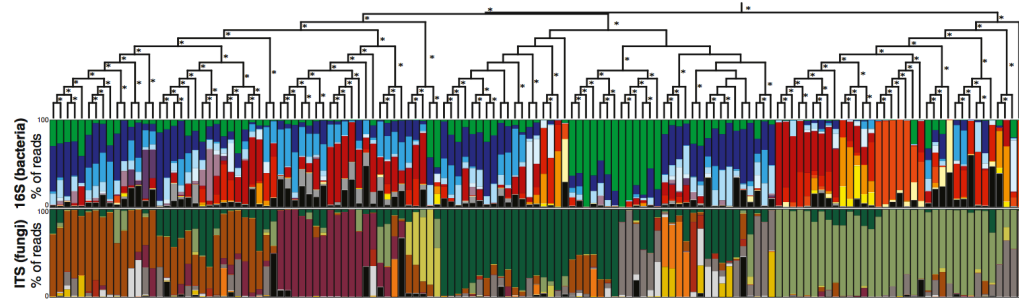
¹FAS Center for Systems Biology, Harvard University, Cambridge, MA 02138, USA

²Co-first author

³Present address: Department of Food Science, University of Parma, Parma 43124, Italy

*Correspondence: rdutton@cgr.harvard.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>



Bacteria

- Firmicutes
 - Staphylococcus
 - Brevibacterium
 - Corynebacterium
 - Brachybacterium
- Actinobacteria
 - Arthrobacter
 - Nocardioopsis
 - Yaniella

- Proteobacteria
 - Halomonas
 - Psychrobacter
 - Pseudomonas
 - Pseudoalteromonas
 - Vibrio
 - Hafnia/Serratia
 - Sphingobacterium
- Bacteroidetes
 - Taxa < 1% ave. abund.

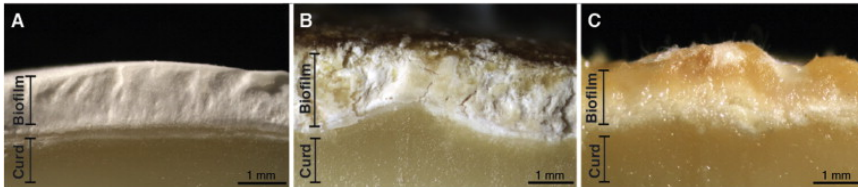
Fungi

- Saccharomycetales
 - Debaryomyces
 - Galactomyces
 - Candida
- Microascales
 - Scopulariopsis
- Hypocreales
 - Fusarium
 - Acremonium
- Eurotiales
 - Penicillium
 - Aspergillus
- Oryngiales
 - Sporendonema
 - Chrysosporium
- Taxa < 1% ave. abund.

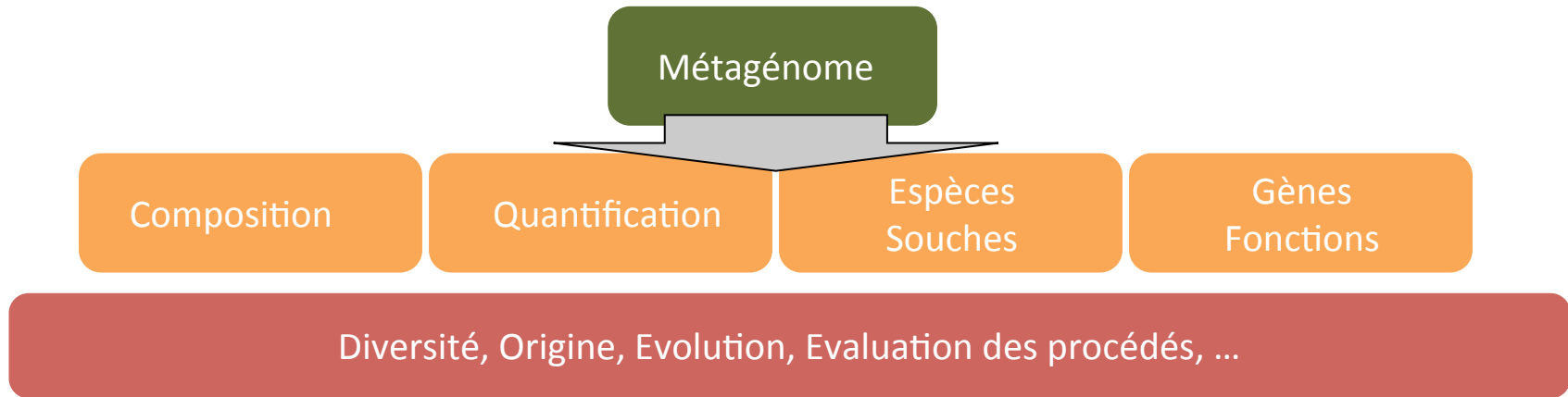
**14 genres bactériens dominants
(10 levures)**

60% ne sont pas dans les ferments ajoutés

**Origine environnementale
(e.g. Psychrobacter, Pseudoalteromonas)**



137 fromages, 10 pays



ANR FOOD-Microbiome (P. Renault)

40 fromages
français
(cœur/surface)

- ❖ Biodiversité large due à des souches non inoculées
- ❖ Groupes microbiens dominants mais faiblement caractérisés
- ❖ Quantification de population sous dominante (1/100000)
- ❖ Présence de séquences non assignées (30%)
Groupe microbiens encore inconnus ?

Métabolome

Reflet de l'activité de l'écosystème

Lien génotype/phénotype, Interactions
(microorganismes, matrice)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro



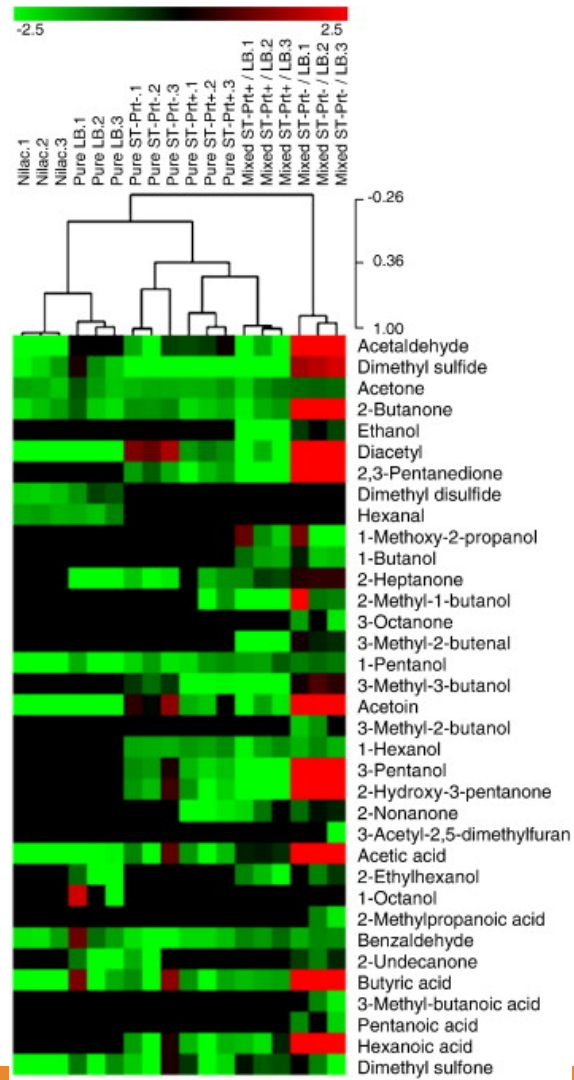
Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt

Sarn Settachaimongkon ^{a,b,1}, M.J. Robert Nout ^b, Elsa C. Antunes Fernandes ^a, Kasper A. Hettinga ^a, Jacques M. Vervoort ^c, Toon C.M. van Hooijdonk ^a, Marcel H. Zwietering ^b, Eddy J. Smid ^b, Hein J.F. van Valenberg ^{a,*}

^a Dairy Science and Technology Group, Chair of Food Quality and Design, Wageningen University, P.O. Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

^b Laboratory of Food Microbiology, Wageningen University, P.O. Box 17, 6700 AA Wageningen, The Netherlands

^c Laboratory of Biochemistry, Wageningen University, P.O. Box 8128, 6700 ET Wageningen, The Netherlands



Conclusions et enjeux pour demain / ferments

Mêmes questions revisitées avec outils de plus en plus puissants

**Aujourd' hui possible de connaître à fond μ ajouté ferment / aliment et d' aborder le système dans son ensemble
« *in situ* » - illustrations aujourd' hui**

**Déséquilibre d' investissement : poids des modèles ! Autres espèces = gisement d' innovation pour les ferments de demain
Enjeux de réglementation/ espèces et souches importants**

Conception dirigée et raisonnée de consortia microbien en vue de fonctionnalités ciblées et nouvelles / accompagner évol société

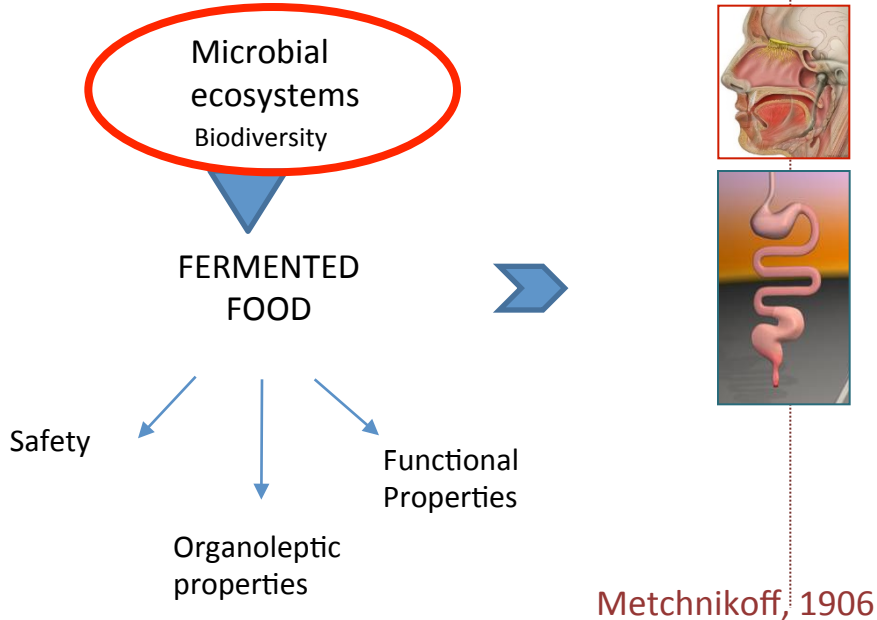
Enjeux techniques

- **Intégration de tous les –omics et modélisation du fonctionnement d' un écosystème - Descendre au niveau souche en NGS pour revisiter les procédés fermentaires ET notamment les pratiques traditionnelles**
- **Développer sur la base d' un fingerprint microbien rapide le suivi « on line » des procédés fermentaires ? Et des flux microbiens ?
« Réconcilier » les μ endogènes et les ferments exogènes ?**
- **Lever verrou de la compréhension-prédiction des interactions entre microorganismes, au sein et avec la matrice alimentaire**
- **L' aliment fermenté : somme de signaux moléculaires à explorer
Ex. peptides bioactifs & Co.; énormément de biochimie reste à faire**

Quid des aspects nutritionnel / consommateur ?

Leçon n°9: se rappeler que nous les mangeons

Contrôle technologique ok



Valeur nutritionnelle ?

Beneficial

By themselves (alive or cell wall.- immune system)

By their unique metabolites (acides organiques, vitamines K, B,C...amino acids..)

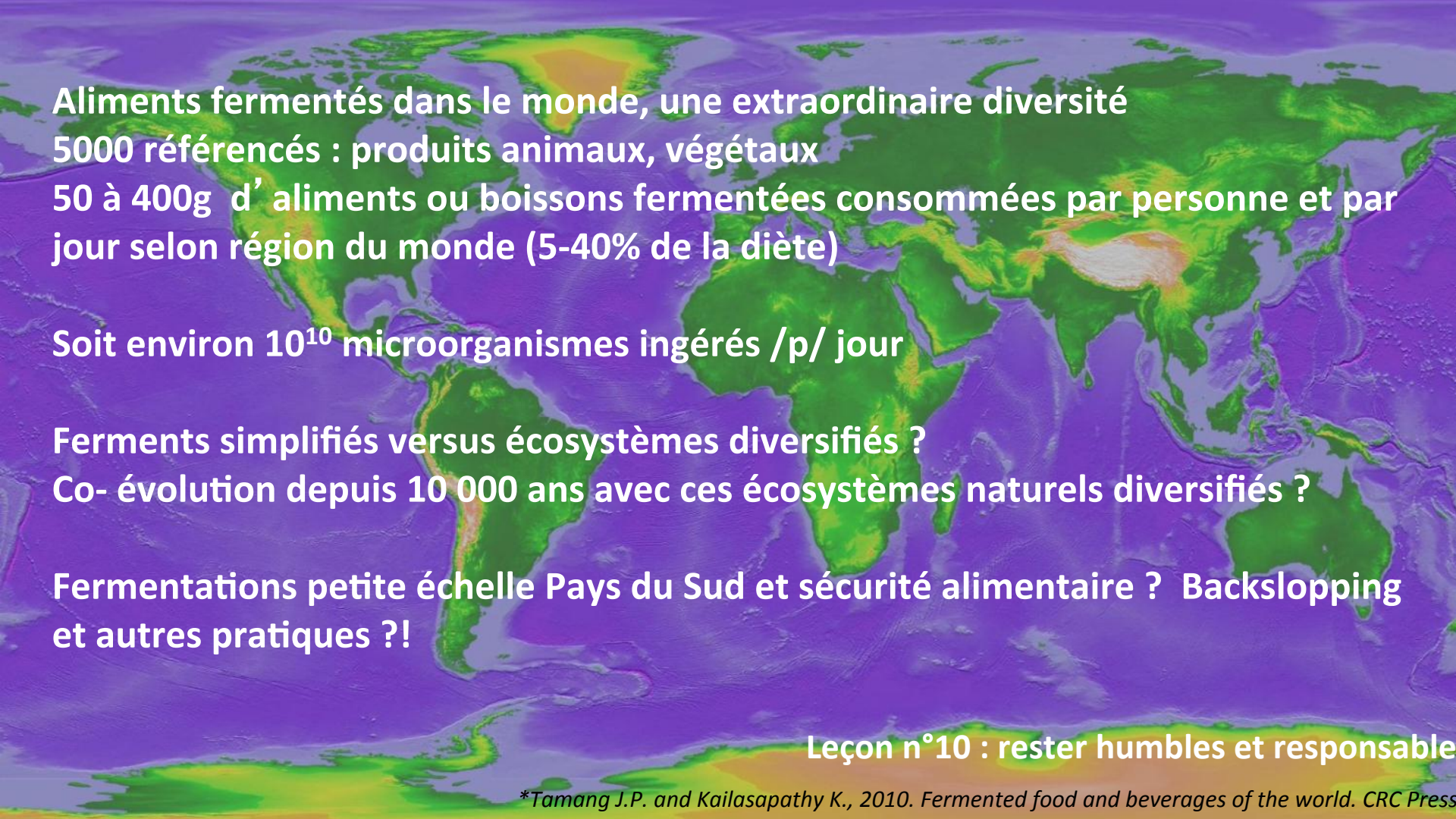
GUT
MICROBIOTA



HUMAN
WELL BEING
HEALTH

Beneficial

By their action on the raw material (bioactive peptides, detoxification (manioc) , reduce allergenicity, increase digestibility, mineral bioavailability)



Aliments fermentés dans le monde, une extraordinaire diversité
5000 référencés : produits animaux, végétaux
50 à 400g d'aliments ou boissons fermentées consommées par personne et par
jour selon région du monde (5-40% de la diète)

Soit environ 10^{10} microorganismes ingérés /p/ jour

Ferments simplifiés versus écosystèmes diversifiés ?

Co-évolution depuis 10 000 ans avec ces écosystèmes naturels diversifiés ?

Fermentations petite échelle Pays du Sud et sécurité alimentaire ? Backslopping
et autres pratiques ?!

Leçon n°10 : rester humbles et responsable

**Tamang J.P. and Kailasapathy K., 2010. Fermented food and beverages of the world. CRC Press*