

## **Caractérisation de l'évolution microbiologique et physico-chimique de carottes fermentées au cours du temps**

**Auteur :** Vanden Briele, Nathan

**Promoteur(s) :** 6601

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/14922>

---

### *Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

# **Caractérisation de l'évolution microbiologique et physico-chimique de carottes fermentées au cours du temps**

**NATHAN VANDEN BRIELE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022**

**PROMOTRICE: SINDIC MARIANNE**

© Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur

# **Caractérisation de l'évolution microbiologique et physico-chimique de carottes fermentées au cours du temps**

**NATHAN VANDEN BRIELE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022**

**PROMOTRICE: SINDIC MARIANNE**

## Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je souhaite remercier :

Madame Marianne Sindic promotrice de ce travail qui a pris le temps de me guider et me conseiller lors des différentes étapes,

Monsieur Geoffroy Anciaux pour sa vision pratique lors de la phase expérimentale,

L'équipe de Diversiferm, pour le temps et les moyens qu'elle m'a également accordés,

Madame Emilie Jaworski, gérante d'Itinéraire Bis Gourmand, pour son accueil chaleureux ainsi que ses précieuses informations,

L'équipe de Paysans-Artisans qui m'a permis d'utiliser ses locaux et matériels pour la phase expérimentale,

Monsieur Samuele Furfari pour sa relecture du travail,

Tous mes proches pour leurs encouragements durant l'entièreté de mon cursus.

## Abstract

Lactic fermentation is a way of preservation using acidification, obtained through the growth of lactic bacteria. There are more and more craftsmen offering such products, but the underlying mechanisms are not yet fully known. The purpose of this work is to study the storage of fermented products at room temperature and refrigerated in order to study the impact of certain parameters on this storage.

The first experimentation focuses on volume (0,5L – 1,5L), salt content (1% - 5%) and fermentation temperature (18°C – 25°C). The second one takes only time (7,14 and 21 days) and fermentation temperature (4,18 and 25°C) in consideration. Finally, the third experimentation is an aging test of fermented products at 20°C for 1 week, at two salt concentrations (1% – 3%) and stored at two different temperatures (4 and 25°C) for 84 days.

The analyses included microbiology (lactic and enterobacterial bacteria), pH and colorimetry. In addition, a rheological analysis was made during the second experiment and an HPLC analysis (on sugars and organic acids) during the third. Two sensory analyses were conducted in parallel with these experiments. They consisted of a triangular test and a product evaluation. During the first analysis, the products underwent different fermentation temperatures (18°C and 25°C). During the second test, two products were kept at different temperatures (4°C and 25°C) and the last was only fermented at 20°C for one week.

At the end of the experiments, only temperature and time significantly impacted the fermentation. During this, a rapid decrease with significant growth of lactic acid bacteria are first observed. During this same period, the product acidifies more or less quickly, depending on the fermentation/storage temperature.

A higher viscosity was measured during the second experiment. This viscosity is a function of the presence of exopolysaccharides in the medium, produced by certain families of lactic bacteria. The type of these carbohydrates varies depending on the stage of fermentation, following the succession of families of lactic acid bacteria caused by the acidification of the environment.

Finally, sensory analyses revealed that fermented foods were only consumed quarterly by the majority of respondents. Moreover, these products come generally from stores.

. For the triangular test, the jury was unable to distinguish a difference between fermented products at different temperatures (p-value = 0.07). Products preserved at different temperatures were differentiated by the jury (p-value = 0.001 and <0.0001).

In terms of preferences, most of jurors preferred the less acidic product (i.e., fermented at 18°C in the first case and not retained in the second analysis). The reason given is a lack of habit of consumption of such acidic products.

These tests and analyses are a first approach to fermentation. Other studies could be done to supplement these results.

Keywords: lactic acid fermentation, preservation, sensory analysis

## Résumé

La fermentation lactique est un moyen de conservation par acidification, obtenu grâce à la croissance de bactéries lactiques. Les artisans proposant de tels produits sont de plus en plus nombreux, mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore parfaitement connus, notamment durant la conservation. Plusieurs altérations organoleptiques ont été soulignées par ces producteurs. Ce travail a donc pour objectif d'étudier l'impact de plusieurs modalités de conservation de produits fermentés.

La première se concentre sur le volume (0,5L – 1,5L), le taux de sel (1% - 5%) et la température de fermentation (18°C – 25°C). La deuxième reprend uniquement le temps (7,14 et 21 jours) et la température de fermentation (4,18 et 25°C). Enfin, la troisième est un test de vieillissement de produits fermentés à 20°C pendant 1 semaine, à deux concentrations de sel (1% – 3%) et conservés à deux températures différentes (4 et 25°C) pendant 84 jours.

Les analyses menées ont porté sur la microbiologie (bactéries lactiques et entérobactéries), le pH et la colorimétrie. En complément, une analyse rhéologique a été faite durant la deuxième expérience et une analyse HPLC (sur les sucres et acides organiques) au cours de la troisième. Deux analyses sensorielles ont été faites en parallèle de ces expériences. Elles consistaient en un test triangulaire et une évaluation de produits. Lors de la première analyse, les produits ont subi des températures de fermentation différentes (18°C et 25°C). Pendant la deuxième, deux produits avaient été conservés à des températures différentes (4°C et 25°C) et le dernier avait uniquement été fermenté à 20°C pendant une semaine.

À la fin des expérimentations, seuls la température et le temps ont impacté significativement la fermentation. Durant celle-ci, une diminution rapide avec une croissance importante des bactéries lactiques sont d'abord observées. Au cours de cette même période, le produit s'acidifie plus ou moins vite, en fonction de la température de fermentation/conservation.

Une viscosité plus élevée a été mesurée au cours de la deuxième expérimentation. Cette viscosité est fonction de la présence d'exopolysaccharides dans le milieu, produits par certaines familles de bactéries lactiques. Le type de ces glucides varie en fonction du stade de la fermentation, suite à la succession des familles des bactéries lactiques causées par l'acidification du milieu.

Enfin, les analyses sensorielles ont révélé que les aliments fermentés n'étaient consommés qu'une fois par trimestre par la majorité des personnes interrogées. De plus, l'origine des produits consommés provient en grande partie des magasins.

Pour le test triangulaire, il en ressort que le jury n'est pas arrivé à distinguer une différence entre les produits fermentés à des températures différentes (p-valeur = 0,07). Ceux conservés à des températures différentes ont par contre été différenciés par le jury (p-valeur= 0,001 et <0,0001).

En ce qui concerne les préférences, la majorité des jurés a préféré le produit moins acide (c'est-à-dire fermenté à 18°C dans le premier cas et non conservé lors de la deuxième analyse). La raison invoquée est un manque d'habitude de consommation de produits aussi acides.

Ces tests et analyses constituent une première approche de la fermentation. D'autres études pourraient être faites pour compléter ces résultats.

Mots-clés : Fermentation lactique, conservation, analyse sensorielle

## Table des matières

1.	Introduction .....	5
1.1.	Contexte.....	5
1.2.	Stratégie d'approche .....	5
2.	État de l'art .....	6
2.1.	La fermentation.....	6
2.1.1.	Mécanisme général de la fermentation.....	6
2.1.2.	Fermentation lactique .....	8
2.1.3.	Fermentation alcoolique .....	10
2.1.4.	Fermentation acétique .....	11
2.2.	Procédé utilisé pour la fermentation lactique .....	12
2.2.1.	Préparation des légumes .....	13
2.2.2.	Salage .....	14
2.2.3.	Fermentation.....	15
2.2.4.	Conservation.....	15
2.2.5.	Remarque générale .....	16
2.3.	Microbiologie de la fermentation lactique.....	16
2.3.1.	Bactéries lactiques .....	16
2.3.2.	Entérobactéries .....	18
2.3.3.	Bactéries pathogènes .....	19
2.4.	Aspect législatif .....	20
2.5.	Altération des produits fermentés .....	21
3.	Enquête menée auprès des producteurs.....	23
3.1.	Approche globale.....	23
3.2.	Profil des producteurs .....	23
3.1.	Résultat de l'enquête .....	24
4.	Objectifs .....	24
5.	Matériel et Méthodes.....	25
5.1.	Matières premières .....	25
5.2.	Fermentation et préparation des bocaux .....	25
5.2.1.	Méthode de préparation générale .....	25
5.2.2.	Test de répétabilité .....	26
5.2.3.	Expérimentation 1 .....	26
5.2.4.	Expérimentation 2 .....	26
5.2.5.	Test de vieillissement .....	26
5.3.	Méthode d'analyse.....	26
5.3.1.	Microbiologie .....	27

5.3.2.	Mesure de l'acidité .....	27
5.3.3.	Mesure de la colorimétrie.....	27
5.3.4.	Mesure de la viscosité .....	27
5.3.5.	HPLC.....	28
5.3.6.	Analyse sensorielle.....	28
5.3.7.	Traitement des données .....	28
6.	Résultats .....	29
6.1.	Test de répétabilité.....	29
6.1.1.	Microbiologie .....	29
6.1.2.	Acidité .....	29
6.1.3.	Colorimétrie .....	30
6.2.	Expérimentation n°1 .....	30
6.2.1.	Microbiologie .....	30
6.2.2.	Acidité .....	33
6.2.3.	Colorimétrie .....	34
6.3.	Expérimentation n°2 .....	35
6.3.1.	Microbiologie .....	35
6.3.2.	Acidité .....	36
6.3.3.	Colorimétrie .....	37
6.3.4.	Viscosité .....	37
6.4.	Test de vieillissement .....	39
6.4.1.	Microbiologie .....	39
6.4.2.	Acidité .....	40
6.4.3.	Colorimétrie .....	40
6.4.4.	Calcul des concentrations des sucres et acides organiques (par HPLC) .....	42
6.5.	Analyse sensorielle .....	43
6.5.1	Caractérisation du jury .....	43
6.5.2.	Test triangulaire.....	45
6.5.3.	Evaluation des produits .....	46
7.	Discussion .....	47
8.	Conclusion.....	50
	Bibliographie.....	51
	Annexes.....	59

## Liste des figures

FIGURE 1 SCHEMA DES VOIES METABOLIQUES LACTOFERMENTAIRES EXISTANTES [70] .....	9
FIGURE 2 SCHEMA DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE, PAR SACCHAROMYCES CEREVISIAE [81] .....	10
FIGURE 3 SCHEMA DE L'OXYDATION DE L'ETHANOL DANS LA CELLULE [35].....	12
FIGURE 4 EXEMPLE DE DIAGRAMME DE FABRICATION DE PRODUIT LACTOFERMENTE [7].....	13
FIGURE 5 EVOLUTION MOYENNE DES ENTEROBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 (EXPRIME EN LOG10) .....	30
FIGURE 6 EVOLUTION DES ENTEROBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 DANS LES BOCAUX DE 0,5L (EXPRIME EN LOG10) ...	31
FIGURE 7 EVOLUTION DES ENTEROBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 DANS LES BOCAUX DE 1,5L (EXPRIME EN LOG10) ...	31
FIGURE 8 EVOLUTION DES LACTOBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 (EXPRIME EN LOG10) .....	32
FIGURE 9 EVOLUTION DES LACTOBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 DANS LES BOCAUX DE 0,5L (EXPRIME EN LOG10) .....	32
FIGURE 10 EVOLUTION DES LACTOBACTERIES LORS DE L'EXPERIMENTATION N°1 DANS LES BOCAUX DE 1,5L (EXPRIME EN LOG10) ...	32
FIGURE 11 EVOLUTION DE L'ACIDITE DES BOCAUX LACTOFERMENTES DE 0,5L ET 1,5L SELON LES DIFFERENTES MODALITES.....	33
FIGURE 12 EVOLUTION DE L'ACIDITE DES BOCAUX LACTOFERMENTES DE 0,5L SELON LES DIFFERENTES MODALITES .....	33
FIGURE 13 EVOLUTION DE L'ACIDITE DES BOCAUX LACTOFERMENTES DE 1,5L SELON LES DIFFERENTES MODALITES .....	33
FIGURE 14 EVOLUTION MOYENNE DES LACTOBACTERIES AU COURS DU TEMPS SELON LA TEMPERATURE DE FERMENTATION .....	36
FIGURE 15 EVOLUTION DE L'ACIDITE SELON LA TEMPERATURE DE FERMENTATION .....	36
FIGURE 16 ÉVOLUTION DE LA CONTRAINTE DE CISAILLEMENT EN FONCTION DE LA MODALITE DE FERMENTATION.....	37
FIGURE 17 ÉVOLUTION DE LA VISCOSITE EN FONCTION DE LA MODALITE DE FERMENTATION .....	38
FIGURE 18 EVOLUTION DES LACTOBACTERIES SELON LA SALINITE ET LA TEMPERATURE DE CONSERVATION .....	39
FIGURE 19 EVOLUTION DE L'ACIDITE AU COURS DU TEMPS SELON DIFFERENTES MODALITES DE CONSERVATION.....	40
FIGURE 20 POURCENTAGE DE GENRE INTERROGE DURANT L'ANALYSE SENSORIELLE .....	43
FIGURE 21 FREQUENCE DE CONSOMMATION DES PRODUITS FERMENTES DU JURY (%) .....	43
FIGURE 22 HABITUDES DE CONSOMMATION DU JURY (%).....	43
FIGURE 24 HABITUDES DE CONSOMMATION DES HOMMES PARTICIPANTS (%) .....	44
FIGURE 23 FREQUENCE DE CONSOMMATION DES PRODUITS FERMENTES DES HOMMES INTERROGES.....	44
FIGURE 25 FREQUENCE DE CONSOMMATION DES PRODUITS FERMENTES DES FEMMES INTERROGEES .....	44
FIGURE 26 HABITUDES DE CONSOMMATIONS DES FEMMES INTERROGEES (%) .....	44
FIGURE 27 PREFERENCE DE PRODUITS LORS DE LA PREMIERE ANALYSE SENSORIELLE (% DE PERSONNES) .....	46
FIGURE 28 PREFERENCE DE PRODUITS LORS DE LA DEUXIEME ANALYSE SENSORIELLE (% DE PERSONNES).....	46

## Liste des tableaux

TABLEAU 1 LISTE DES MICROORGANISMES FERMENTAIRES RETROUVES FREQUEMMENT .....	7
TABLEAU 2 LISTE DES MICROORGANISME, CLASSES SELON LEUR MODE DE FERMENTATION .....	8
TABLEAU 3 MICROORGANISMES FREQUEMMENT RETROUVES DANS LA FERMENTATION ALCOOLIQUE .....	10
TABLEAU 4 LISTE DE QUELQUES FERMENTATIONS EXISTANTES [30] .....	12
TABLEAU 5 PLATS FERMENTES COURAMMENT RETROUVES, AVEC LES INGREDIENTS LES CONSTITUANT ET LES SOUCHES DE BACTERIES LACTIQUES RETROUVEES.....	14
TABLEAU 6 LISTE DES STARTERS COURAMMENT RETROUVES DANS LES GRAINS DE KEFIR [10 ; 78] .....	15
TABLEAU 7 ESPECES DE BACTERIES LACTIQUES RETROUVEES EN FONCTION DES FRUITS ET LEGUMES CONSIDERES [15] .....	17
TABLEAU 8 LISTE DES DIFFERENTES CLASSES DE BACTERIOCINES [77 ;80] .....	18
TABLEAU 9 CCP ET PA TYPIQUES D'UN PROCESSUS DE LACTOFERMENTATION PROPOSE PAR L'AFSCA [65].....	20
TABLEAU 10 ALTERATIONS COMMUNES DES PRODUITS FERMENTES .....	22
TABLEAU 11 PROCEDES ET DIFFICULTES RENCONTREES PAR LES PRODUCTEURS INTERROGES .....	23
TABLEAU 12 RECAPITULATIF DES ANALYSES FAITES PAR EXPERIMENTATION .....	26
TABLEAU 13 CONDITIONS D'INCUBATION SELON LES MICROORGANISMES CONSIDERES [82,83,84].....	27
TABLEAU 14 DENOMBREMENT DES ENTEROBACTERIES POUR LE TEST DE REPETABILITE .....	29
TABLEAU 15 DENOMBREMENT DES LACTOBACTERIES POUR LE TEST DE REPETABILITE .....	29
TABLEAU 16 MESURE DE L'ACIDITE DU TEST DE REPETABILITE.....	29
TABLEAU 17 COLORIMETRIE DES BOCAUX DE REPETABILITE.....	30
TABLEAU 18 MESURE COLORIMETRIQUE MOYENNE DES BOCAUX DE 0,5L DE L'EXPERIMENTATION N°1.....	34
TABLEAU 19 MESURE COLORIMETRIQUE MOYENNE DES BOCAUX DE 1,5L DE L'EXPERIMENTATION N°1.....	34
TABLEAU 20 ENUMERATION DES ENTEROBACTERIES DE L'EXPERIENCE N°2.....	35
TABLEAU 21 EVOLUTION DE LA MOYENNE COLORIMETRIQUE SELON LES TEMPERATURES DE CONSERVATION AU COURS DE LA FERMENTATION .....	37
TABLEAU 22 DENOMBREMENT DES ENTEROBACTERIES LORS DU TEST DE VIEILLISSEMENT .....	39
TABLEAU 23 EVOLUTION DE LA MOYENNE COLORIMETRIQUE SELON LA SALINITE ET LA TEMPERATURE DE CONSERVATION AU COURS DE LA FERMENTATION .....	40
TABLEAU 24 EVOLUTION DES SUCRES ET ACIDES ORGANIQUES DE DIFFERENTS ECHANTILLONS LORS DU TEST DE VIEILLISSEMENT .....	42

TABLEAU 25 REPONSES OBTENUES LORS DU TEST TRIANGULAIRE (PRODUIT FERMENTE A 18°C – PRODUIT FERMENTE A 25°C).....	45
TABLEAU 26 REPONSES DU TEST TRIANGULAIRE (PRODUIT FERMENTE A 20°C - PRODUIT CONSERVE A 4°C).....	45
TABLEAU 27 REPONSES DU TEST TRIANGULAIRE (PRODUIT FERMENTE A 20°C - PRODUIT CONSERVE A 25°C).....	45
TABLEAU 28 REPONSES DU TEST TRIANGULAIRE (PRODUIT CONSERVE A 25°C - PRODUIT CONSERVE A 4°C).....	46

### Liste des abréviations

ADH : Alcohol Dehydrogenase

ALDH : Aldehyde dehydrogenase

CCP: Critical Control Point

EPS: Exopolysaccharides

EPT : Eau peptonnée tamponée

LAB : Lactic Acid Bacteria

PA: Point d'attention

PQQ-ADH : Pyrroquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase

RPM : Revolution Per Minute

# 1. Introduction

## 1.1. Contexte

La fermentation et, plus précisément, la lactofermentation est une méthode de conservation de plus en plus répandue en Belgique. Les raisons principales sont certainement l'augmentation de la durée de vie des produits fermentés, ainsi que l'apport de nombreux avantages nutritionnels, en plus de la simplicité technique requise. Pour répondre aux besoins grandissants des consommateurs, un nombre de plus en plus important d'artisans locaux propose une gamme de produits fermentés dans leurs échoppes. Cependant, même s'il s'agit d'une pratique ancestrale populaire, les procédés techniques mis en œuvre peuvent encore être étudiés et approfondis afin d'améliorer leur compréhension. De plus, les nouveaux producteurs ont parfois des incompréhensions ou des questionnements face aux mécanismes sous-jacents.

Ce travail de fin d'études a été rédigé afin d'apporter une source de connaissances supplémentaires aux artisans désirant se diversifier et/ou améliorer leur activité de production. Cette recherche a été réalisée en partenariat avec DiversiFERM. Il s'agit d'un projet soutenu par la Région wallonne dont la mission est de conseiller et d'accompagner les artisans et producteurs transformateurs agroalimentaires locaux dans leur recherche d'amélioration [0]. Face aux questionnements croissants, l'équipe DiversiFERM était soucieuse de répondre avec précision aux différentes interrogations posées par lesdits artisans.

La législation belge étant encore en cours d'étude sur les produits fermentés, les normes et critères pour ce type de produits ne sont pas encore précisément définis (même si certains guides d'autocontrôle et autres textes de loi permettent d'y voir plus clair). Pour l'instant, seul le règlement (CE) No 1441/2007 est d'application en ce qui concerne les produits fermentés. Ce travail servira surtout à approfondir la compréhension du procédé et à apporter des pistes de solution aux problèmes susceptibles d'être rencontrés par les artisans. Les méthodes et résultats présentés ici devront donc être adaptés au cas plus ou moins spécifiques de chaque producteur.

## 1.2. Stratégie d'approche

Afin de répondre aux interrogations des producteurs, la première étape de ce travail a été de faire état des connaissances actuelles sur le sujet. À cette fin, une recherche bibliographique sur le thème a été faite.

Ensuite, une enquête auprès des producteurs a été menée afin de mettre en évidence les difficultés les plus souvent rencontrées lors de la fabrication et de la conservation. Il en est ressorti que le principal défi rencontré était la nécessité de conservation au frigo, sous peine d'une évolution organoleptique non désirée du produit. Tous ces artisans sont en effet frustrés de devoir conserver leurs produits au frigo alors que la fermentation est avant tout un mode de préservation des aliments.

Pour répondre à leurs attentes, une phase d'expérimentation a suivi cette phase d'enquête. Durant ce stade, plusieurs modalités de fermentation ont été testées afin d'étudier l'évolution d'un produit en fonction de plusieurs paramètres. Les modalités testées étaient la température de fermentation et de conservation, le volume, la salinité et la durée de conservation. La microbiologie, l'acidité, la viscosité et la colorimétrie ont ensuite été analysées pour pouvoir évaluer le produit.

La finalité de ces expériences est de déterminer si un paramètre (ou couple de paramètres) pourrait aider et favoriser la conservation de produits fermentés sans devoir les placer au frigo.

## 2. État de l'art

### 2.1. La fermentation

La fermentation est un procédé de conservation développé depuis plusieurs millénaires et de plus en plus répandu dans nos sociétés actuelles [1,2]. Son principe peut être défini comme étant une réaction enzymatique permettant la transformation de composants organiques tels que le glucose en autres composés (comme de l'acide lactique ou de l'éthanol), suite à la croissance de microorganismes [3]. Elle se déroule en milieu anaérobie et peut être due à la présence de plusieurs familles de microorganismes.

Les organismes responsables de cette réaction peuvent être de l'ordre des bactéries, levures ou moisissures [4]. Notons que toutes les familles de ces microorganismes ne sont pas capables de fermenter et seules certaines, dotées d'un métabolisme particulier, en sont capables [3 ; 5]. En fonction du métabolisme de chaque espèce, différents types de fermentations peuvent être obtenus [6 ; 7]. Le tableau 1 reprend une liste de quelques microorganismes fermentaires typiques ainsi que leur type de fermentation. Les types de fermentation, quant à eux, seront repris plus en détail dans les points suivants.

Indépendamment du type de fermentation considéré, son rôle reste le même : la conservation. Comme indiqué dans le tableau 1, un grand nombre de famille d'aliments peut être conservé par cette méthode. Les légumes, céréales, fruits et autres produits laitiers sont des exemples susceptibles de subir une fermentation et être ainsi conservés durant plusieurs mois [8].

Cependant, l'utilisation de cette méthode sert également à changer le profil organoleptique d'un produit en modifiant la composition des arômes d'un produit [9]. Les arômes apportés seront aussi fonction du type de fermentation et seront abordés dans les points respectifs de chaque fermentation.

#### 2.1.1. Mécanisme général de la fermentation

Même si chaque fermentation possède ses réactions et métabolisme particuliers, chacune a besoin de certains paramètres essentiels pour pouvoir se dérouler [10]. Les paramètres les plus importants à contrôler sont [10] :

- l'oxygène ;
- la température ;
- le temps de fermentation.

Le premier paramètre à gérer dans le cas d'une fermentation sera la quantité d'oxygène présente dans la matrice alimentaire [10]. Comme expliqué au point 2.1, la fermentation est une réaction principalement anaérobie et la présence d'oxygène sera donc délétère pour les microorganismes fermentaires. Dans le cas de *Lactobacillus plantarum*, une accumulation d'oxygène se trouve être toxique pour cet organisme. La raison principale est l'absence d'enzymes (tels que les superoxydes dismutase, catalase et dismutase) permettant de diminuer la concentration d'oxygène [11]. L'oxygène s'accumulant finira donc par former des radicaux (comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou encore -OH) mortels pour cette bactérie.

La température sera importante à considérer dans la cinétique de croissance des microorganismes fermentaires [10]. Dans le cas de la fermentation, la majorité des microorganismes considérés appartiendra à la famille des mésophiles [10]. Leur gamme de croissance sera donc comprise entre 10 et 40°C [10]. Leur optimum se situera plus précisément

aux environs de 25°C [12]. Si la fermentation se déroule en dehors de ces gammes, le produit risque de développer des caractéristiques non désirées.

Tanguler a mené une étude en 2013 sur l'effet de la température sur la fermentation de jus de carottes et y constate que certains paramètres organoleptiques sont impactés par la température de fermentation. Les caractéristiques touchées sont principalement liées aux saveurs du produit telles que la couleur, le goût et l'odeur [13].

Le temps de fermentation est aussi un critère important à respecter. Plus la fermentation est longue, plus les microorganismes pourront métaboliser les différents nutriments (dont le glucose) présents. Il en résultera un produit avec des caractéristiques uniques. Par exemple, dans le cas du kéfir<sup>1</sup>, Lengkey (2014) démontre dans son article parlant de l'effet des starters et du temps de fermentation sur la production d'acide lactique que l'acidité du produit diminuait selon que la concentration en LAB et le temps de fermentation étaient élevés [14].

Les starters peuvent également être une source d'amélioration du produit, notamment en apportant des modifications technologiques inédites [15]. L'utilisation de ferments de la famille des *Lactobacillus* permettront une amélioration de la conservation tout en créant des arômes uniques aux produits végétaux, alors que les *Streptococcus* seront plutôt utilisés dans les viandes (pour des raisons similaires à *Lactobacillus*) [15].

Tableau 1 Liste des microorganismes fermentaires retrouvés fréquemment

Nom	Espèce	Matière première	Produit obtenu	Source
<i>Lactobacillus</i>	<i>bulgaricus</i>	Lait	Kefir	3
	<i>casei</i>	Lait, pomme	Kefir	3
	<i>lactis</i>	Lait	Kefir, jus de pommes	3; 14
	<i>plantarum</i>	Choux blancs, concombres, pommes	Choucroute, Kimchi, jus de pomme	3; 14; 49
	<i>fermentum</i>	betteraves, haricots		49
	<i>acidophilus</i>	Fruits (pomme, cerises, ananas,...)	Jus de fruits	14
	<i>Sakei</i>	Saucisse	Saucisse fermentée	49
<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	Lait	Lait fermenté	18
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	Lait	yogourt	16
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroids</i>	Choux blancs	Choucroute, Kimchi	17 ; 49
<i>Pediococcus</i>	<i>pentosaceus</i>	Tomates, concombres, choux, haricots	Kimchi, cornichons	49
	<i>cerevisiae</i>	Moutarde	Kimchi	15
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	Pommes de terre, orge, raisins	Vodka, Whisky, Vin, Bière, Pain	2; 16
<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Riz, blé, soja	Sauce soja	7
<i>Carnobacterium</i>	<i>piscicola</i>	Poissons	Poisson fermenté	15

<sup>1</sup> Selon le Larousse, le kéfir est une « boisson fermentée gazeuse, acide et légèrement alcoolisée, d'origine caucasienne, fabriquée à partir du lait de vache, de chèvre, de brebis ou de chamelle (kéfir de lait) ou d'eau sucrée additionnée de fruits (kéfir d'eau ou kéfir de fruits) ».

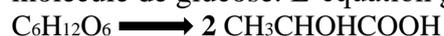
### 2.1.2. Fermentation lactique

Cette fermentation est caractérisée par la production d'acide lactique à partir de glucose [23]. Une des particularités de cette fermentation est l'existence de deux voies métaboliques distinctes permettant la synthèse de lactate (autre nom pour l'acide lactique) [20]. Cette voie est caractéristique des microorganismes considérés et un petit nombre d'entre eux est capable d'utiliser les deux. Le tableau 2 reprend une liste de quelques microorganismes classés en fonction de la voie métabolique empruntée.

Tableau 2 Liste des microorganismes, classés selon leur mode de fermentation

	Source
Homofermentaire	
<i>Lactobacillus brevis</i>	10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10
<i>Weissella</i>	10
<i>Pediococcus</i>	19
Hétérofermentaire	
<i>Enterococcus faecalis</i>	10
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	10
<i>Lactobacillus fermentum</i>	14
<i>Lactococcus lactis</i>	10
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10
<i>Leuconostoc</i>	10
Mixte	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ; 14
<i>Weissella cibaria</i>	10 ; 14
<i>Enterococcus</i>	10 ; 14
<i>Pediococcus</i>	14
<i>Leuconostoc</i>	14

Le premier type de lactofermentation est la voie dite « homofermentaire ». On retrouve des bactéries provenant des familles *Pediococcus* et *Weissella* ainsi que certaines espèces de *Lactobacillus* et de *Leuconostoc* [19 ; 20 ; 21]. Ces bactéries ont la faculté de convertir le glucose en acide lactique, en conditions anaérobiques, grâce à la présence de l'enzyme aldolase [19]. L'avantage de cette voie est la production de 2 molécules de lactate à partir d'une seule molécule de glucose. L'équation générale peut être résumée par [24] :



Glucose                      Acide lactique

Le métabolisme plus complet de cette voie est également représenté en figure 1 [19].

Le deuxième type de fermentation est qualifié d'hétérofermentaire. Il est plutôt associé aux familles des *Lactobacillus* et *Pediococcus* [19 ; 20 ; 21]. Sa particularité réside dans la diversité des produits finis pouvant être obtenus. La voie empruntée est, dans ce cas-ci, la voie du phosphoketolase [19 ; 23]. Celle-ci peut démarrer du xylose, du glucose ainsi que de l'arabinose afin de produire du lactate, du CO<sub>2</sub> avec de l'éthanol ou de l'acide acétique. L'on

remarque sur la figure 1 que l'enzyme Glucose 6-phosphate déshydrogénase est nécessaire si la molécule de départ est le glucose.

Il peut être intéressant de remarquer que certaines familles, comme *Lactobacillus* ou *Pediococcus*, sont capables d'emprunter les deux voies métaboliques précédemment présentées, leur permettant ainsi d'être plus polyvalents quant à la quantité des glucides utilisés.

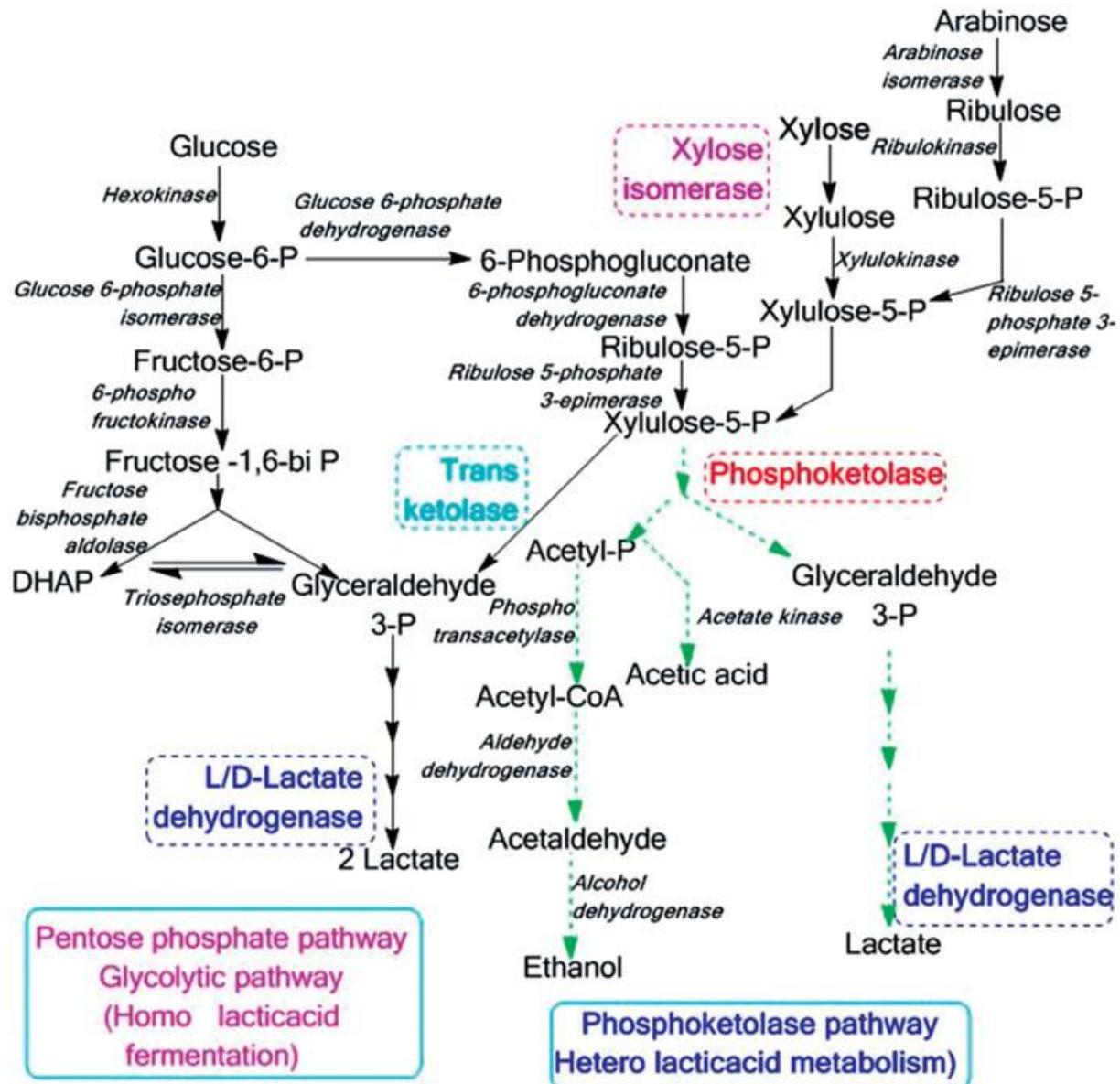


Figure 1 Schéma des voies métaboliques lactofermentaires existantes [70]

La fermentation lactique est particulièrement utilisée avec des fruits ou des légumes comme matières premières [25 ; 26]. En effet, les hydrates de carbone (tels que le glucose, l'amidon ou la cellulose) naturellement et largement présents dans ce type de matières premières favorisent la fermentation [27]. Grâce à celle-ci, le produit peut être conservé plus longtemps [25]. La raison principale de cette amélioration de durée de vie est l'accumulation d'acide lactique dans la matrice alimentaire. Le pH diminuant avec l'accumulation d'acide lactique produit, la croissance d'un grand nombre de pathogènes sera inhibée par ce milieu acide [26].

### 2.1.3. Fermentation alcoolique

Dans le cas de cette deuxième fermentation, la réaction permet d'obtenir de l'éthanol et du CO<sub>2</sub> à partir de glucose, voire de fructose [28]. La figure 2 explique plus en détails les mécanismes sous-jacents de cette fermentation. La réaction chimique résumant ce procédé peut s'écrire comme suit [28] :

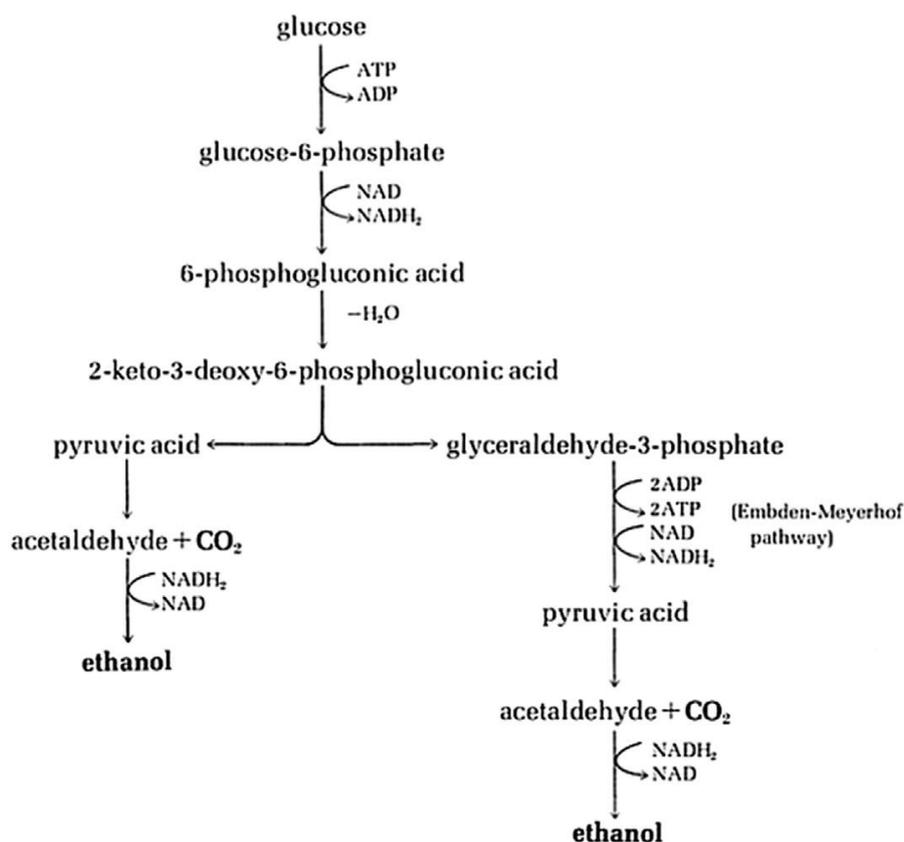
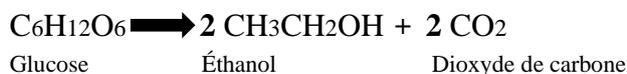


Figure 2 Schéma de la fermentation alcoolique, par *Saccharomyces cerevisiae* [81]

À l'inverse de la fermentation lactique, la fermentation alcoolique est principalement due à l'action de levures, même si quelques bactéries peuvent être responsables de cette réaction. Le tableau 3 reprend les microorganismes les plus représentatifs de ce type de réaction.

Tableau 3 Microorganismes fréquemment retrouvés dans la fermentation alcoolique

Microorganismes	Type	Source
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levure	28
<i>Kloeckera spp.</i>	Levure	28
<i>Hanseniaspora spp.</i>	Levure	28
<i>Candida spp.</i>	Levure	28
<i>Brettanomyces (Dekkera) bruxellensis</i>	Levure	29
<i>Torulasporea spp.</i>	Levure	29
<i>Kluyveromyces spp.</i>	Levure	29
<i>Zymomonas mobilis</i>	Bactérie	28

Dans les faits, on observe qu'un grand nombre de ces organismes fait partie de la famille des levures, notamment pour leur faculté à produire de l'alcool à partir de divers glucides [30]. La levure la plus répandue en fermentation alcoolique est *Saccharomyces cerevisiae*. La raison principale est son aptitude à pouvoir croître en milieu défavorable. Dans ce cas-ci, un milieu défavorable signifie un milieu avec de fortes concentrations d'éthanol et un pH acide [29]. D'autres espèces de levures peuvent cependant être utilisées afin d'apporter une touche d'arômes uniques dans les produits issus de cette fermentation [29]. Malheureusement, cet apport d'arôme est accompagné d'une capacité de production moins efficace. Dans son article parlant de l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae*, Albergaria (2016) explique que *S. cerevisiae* a un taux de croissance supérieur aux autres espèces de levures. Cette différence de taux est fonction des souches de levures considérées. La différence est de, par exemple,  $0,058\text{h}^{-1}$  entre *C.zemplinina* ( $0,027\text{h}^{-1}$ ) et *S.cerevisiae* ( $0,085\text{h}^{-1}$ ) [29].

Comme son nom l'indique, la fermentation alcoolique permet notamment de produire de l'alcool [31]. C'est donc un procédé de choix pour la fabrication de tous les aliments et boissons alcoolisées. Les exemples les plus connus sont la bière, le vin ainsi que les autres boissons types eau-de-vie (vodka ...) [28 ; 31]. D'autres applications sont également trouvées comme la production de biocarburant tel que le bioéthanol [32]. Les matières premières à la base de tous ces produits sont assez variables et peuvent regrouper les fruits dans le cas du vin, les céréales pour la bière ainsi que les féculents pour les eaux-de-vie et le bioéthanol [28 ; 31 ; 32]. Outre la modification des matières premières, il est possible de changer la souche utilisée. Comme expliqué ci-dessus, le choix de *S. cerevisiae* sera préféré pour son aspect productif et résistant, alors que les espèces de levures seront plutôt utilisées pour apporter un goût particulier au produit final proposé [29].

#### 2.1.4. Fermentation acétique

Une autre voie couramment rencontrée est la fermentation acétique [33]. C'est également la conséquence directe apparaissant lorsque l'éthanol est laissé en contact avec de l'oxygène. La fermentation acétique est en effet l'oxydation de l'éthanol [34]. La réaction qui a lieu dans la cellule est reprise en figure 3 [35]. Comme il en ressort, l'éthanol est oxydé en acide acétique par deux voies distinctes dans le cytoplasme : La première met en avant la coupe NAD-ADH et NAD-ALDH, alors que la deuxième utilise PQQ-ADH et ALDH. Les deux complexes ADH et ALDH sont couplés à la chaîne de respiration et ont tous deux besoins d'oxygène pour fonctionner [35]. L'oxygène y joue alors un rôle d'accepteur final d'électrons.

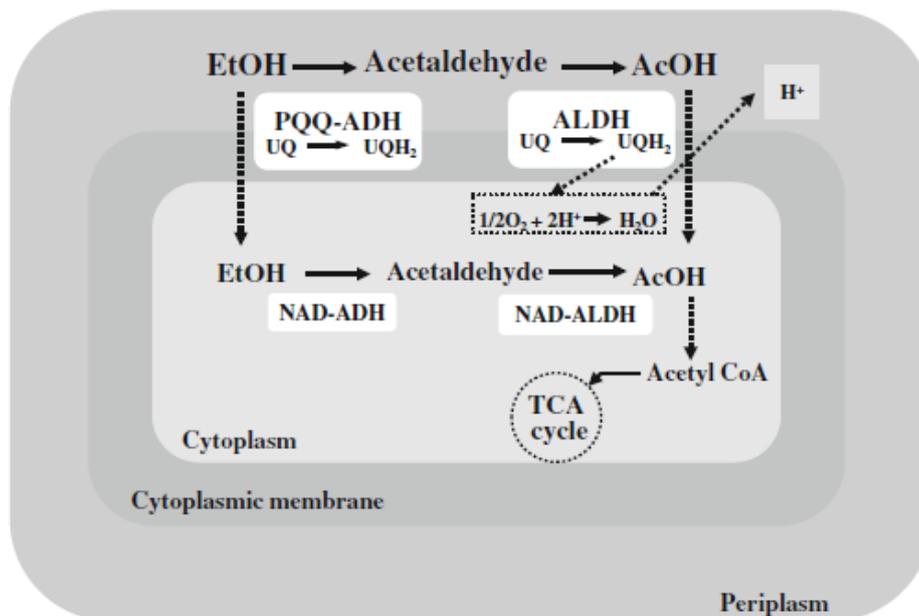


Figure 3 Schéma de l'oxydation de l'éthanol dans la cellule [35]

Deux grandes familles sont souvent citées lors de ces réactions : *Acetobacter spp* et *Gluconobacter spp* [35]. L'application principale de cette voie réside notamment dans la production de vinaigre même si d'autres produits, moins populaires, existent (c'est le cas du Kombucha ou encore de certains kéfirs) [35].

Les trois types de fermentations cités plus haut ne sont qu'une partie des réactions fermentaires existantes. D'autres, plus ou moins connues, se présentent avec leurs particularités et produits finis propres [30].

Afin de garder un certain esprit synthétique, elles ne seront pas abordées dans ce travail, mais simplement citées dans le tableau 4 [30]. L'on se concentrera plus sur la fermentation lactique, celle-ci étant le but premier du présent travail.

Tableau 4 Liste de quelques fermentations existantes [30]

Types de fermentation	Substrat	Produits
Glycéropyruvique	Pyruvate	Éléments dérivés du pyruvate (acétaldéhyde, acide acétique, acide succinique ...)
Propionique	Glucides et lactate	Acide propionique, acide acétique et CO <sub>2</sub>
Butyrique	Glucides, amyloses et pectines	Acide butyrique, Butanol et isopropanol
Butanediol	Pyruvate	Butanediol

## 2.2. Procédé utilisé pour la fermentation lactique

Le principe de la fermentation est assez simple. Il consiste à contrôler la croissance de certaines bactéries (dans ce cas-ci : les LAB) afin d'acidifier un produit choisi comme expliqué au point 2.1.2. Chaque producteur peut adapter son procédé afin de répondre à ce principe. Il peut donc y avoir plusieurs procédés différents proposés pour un même produit, chacun apportant son lot de spécificités propres [36 ; 37]. Un exemple de procédé est proposé en figure 4.

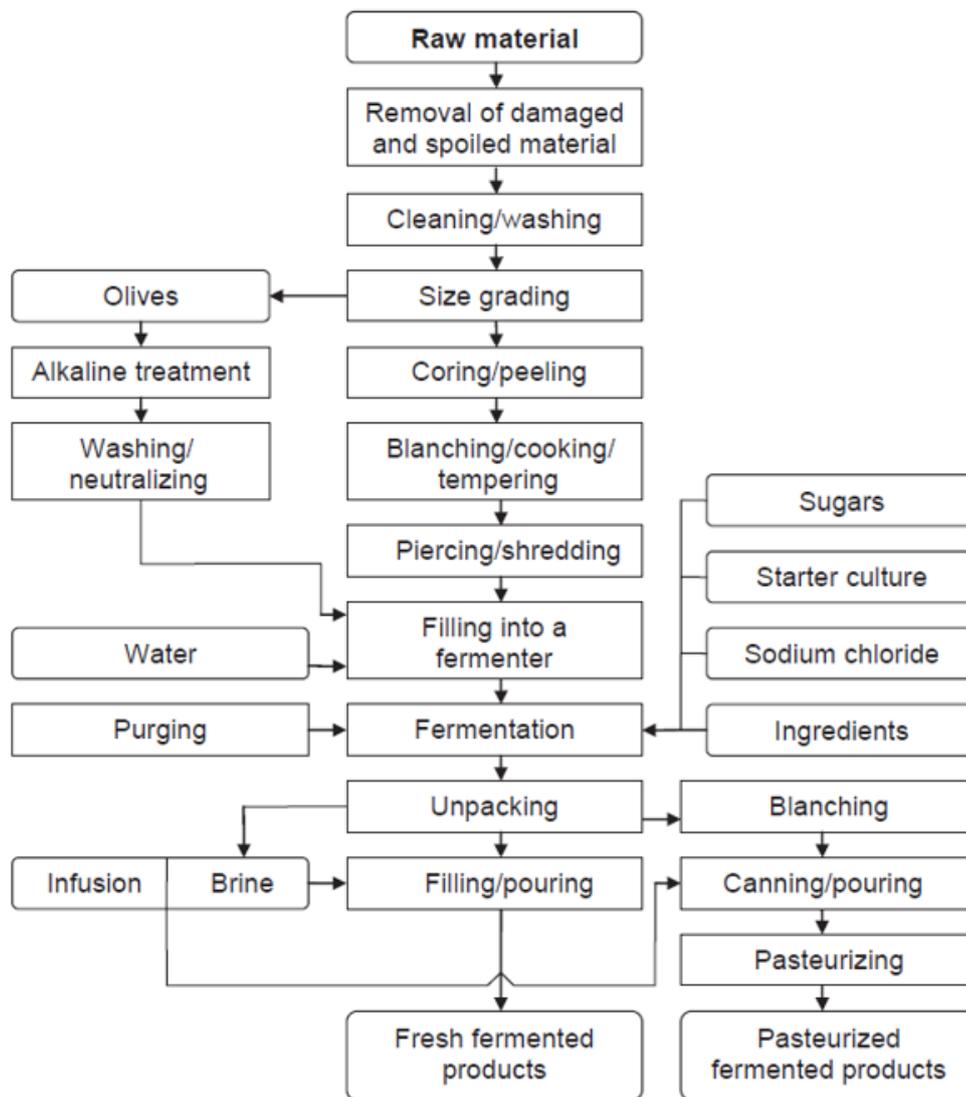


Figure 4 Exemple de diagramme de fabrication de produit lactofermenté [7]

Sur la figure 4 est décrit un procédé typique de fermentation lactique. La colonne du milieu détaille le traitement qu'un légume subit généralement avant d'être fermenté, alors que les colonnes avoisinantes précisent les actions supplémentaires qui peuvent être ajoutées (par exemple : pasteuriser ou ajouter de l'eau, voire d'autres ingrédients comme des épices).

### 2.2.1. Préparation des légumes

Le choix de la variété de produits est la première décision à prendre. En effet, cette matière première sera la base du produit fermenté final [17]. Il peut être intéressant de remarquer que plusieurs types de produits peuvent être fermentés ensemble afin d'obtenir une combinaison de saveurs uniques. C'est notamment le cas du kimchi, qui est un plat composé de plusieurs légumes fermentés ensemble [38].

Il est également important de bien choisir ces produits, étant donné que la population bactérienne sera fonction du/ des produits choisis [17]. Les différents flaveurs et aspects du produit final seront donc, de ce fait, distincts [9 ; 39].

Le tableau 5 reprend une liste de quelques plats fermentés avec les ingrédients qui les constituent et les microorganismes le plus souvent rencontrés.

Tableau 5 Plats fermentés couramment retrouvés, avec les ingrédients les constituant et les souches de bactéries lactiques retrouvées.

Nom	Légumes	Additifs	Bactéries lactique retrouvés	Source
Choucroute	Chou blanc	Sel	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	15
Gundruk	Choux, feuilles de moutardes, feuilles de chou		<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei subsp. casei</i> , <i>Leuc. pseudoplantarum</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>P. pentosaceus</i>	15; 27
Jiang-gua	Concombres,	Sel, sucre, vinaigre, sauce soja	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> , <i>Weissella hellenica</i> , <i>Weissella cibaria</i>	15
Kombucha	Thé		<i>L. kefiranofaciens</i> , <i>Bifidobacteri</i> , <i>Weissella</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	1; 3
Olives			<i>L.plantarum</i>	16; 17
Kimchi	Chou blanc, radis, ... (d'autres légumes peuvent être ajoutés, selon la volonté du producteur/consommateur)	Poivre, ail, oignons, gingembre	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc kimchii</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> , <i>Leuc. pseudomesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus maltaromicus</i> , <i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Weissella kimchii</i> , <i>Weissella koreensis</i>	15; 27
Salgam	Carottes, navets,	Levain, sel, eau	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei subsp. paracasei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i>	27

Dans le cas précis des légumes, une certaine préparation peut être nécessaire avant toute fermentation. Cette préparation peut aider à la fermentation proprement dite (couper les légumes pour améliorer la surface spécifique d'action des microorganismes) ou apporter une transformation visuelle du produit (pour mieux satisfaire les demandes du consommateur, par exemple) [40]. Il faudra cependant veiller à ce que le produit soit bien mis en conditions anaérobies. Pour ce faire, un tassage des légumes préparés (coupés, râpés ...) ainsi que l'ajout d'eau, voire de saumure, est effectué afin d'évacuer les bulles d'air présentes.

### 2.2.2. Salage

L'ajout de sel est aussi une étape clé dans la mise en œuvre du procédé. Le sel interviendra à deux niveaux distincts. Le premier est relatif au développement microbien. Le salage permettra dans un premier temps de ralentir la croissance des microorganismes pathogènes, laissant l'occasion aux bactéries lactiques (plus tolérante aux conditions salines) de se développer sans trop de compétition directe [38 ; 41]. Deuxièmement, ce salage aura aussi un impact sur le goût et la texture du produit [38 ; 41]. Plus la concentration initiale en sel sera élevée, plus le produit sera salé une fois la fermentation terminée. Le tout sera donc de trouver le bon dosage permettant un développement microbien adéquat tout conservant un goût agréable en bouche.

Pour cela, la concentration de sel ajoutée est variable selon les recettes utilisées. Cependant, des quantités trop élevées sont déplaisantes pour la plupart des consommateurs. Pour éviter ce problème, les concentrations courantes de sel se situent entre 1 et 3% de sel [38]. Ce dosage est un bon compromis entre goût et développement microbien.

L'étape du salage peut s'effectuer selon deux méthodes différentes : un salage à sec ou une saumure. La méthode du salage direct consiste à masser le sel avec les ingrédients avant de les mettre en bocaux. De la sorte, l'eau naturellement présente dans les aliments sera extraite et ils pourront être immergés dedans afin de créer un environnement anaérobie salé, idéal pour les bactéries lactiques [38]. Dans le cas où les matières premières doivent être fermentées en gros morceaux (voire en entier), la méthode de la saumure est plus adaptée. Cette méthode consiste simplement à immerger les matières premières dans de l'eau salée [38]. Un salage à sec ne serait pas suffisant pour permettre de dégorger suffisamment d'eau du produit. N'ayant alors ni conditions anaérobies ni conditions salines, les LAB ne se développeront pas et, par conséquent, la fermentation ne se produira pas [38]. Cependant, rien n'empêche d'effectuer une saumure sur des matières premières coupées voire de combiner les deux méthodes pour plus d'efficacité.

### 2.2.3. Fermentation

Lorsque les matières premières (ainsi que les autres additifs) ont été mises en milieu anaérobie, la fermentation peut démarrer. Pour rappel, la fermentation s'effectue sous l'action de bactéries lactiques.

L'origine de ces bactéries peut être double. Elles peuvent, d'une part, venir du produit lui-même (comme montré dans le tableau 5) ou bien être ajoutées par les producteurs avant la fermentation. La plupart des producteurs se contentent de laisser les bactéries lactiques, naturellement présentes dans les produits, se développer au fil du temps.

Dans le cas de l'addition de bactéries, le terme de "starter" est employé [34]. La nature de ces starters peut être assez variable et être plus ou moins adaptée à un type de produit spécifique [10]. Par exemple, le kéfir (défini plus haut, cfr. page 10) estensemencé avec des starters incorporés dans des « grains de kéfir ». Les populations les plus souvent retrouvées dans ces grains sont un consortium de bactéries acétiques, bactéries lactiques et levures [78]. On retrouve notamment [10 ; 78 ;79] :

Tableau 6 Liste des starters couramment retrouvés dans les grains de kéfir [10 ; 78]

Population	Microorganismes retrouvés	Source
Bactéries acétiques	<i>Acetobacter aceti</i>	10; 78
Bactéries lactiques	<i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>Streptococcus lactis</i> ; <i>Leuconostoc cremoris</i>	10; 78
Levures	<i>Kluyveromyces fragilis</i> ; <i>Kluyveromyces marxianus</i>	10

L'avantage principal de ces starters est d'assurer une croissance plus rapide des LAB par rapport aux autres microorganismes présents (les entérobactéries pour exemple). Ce faisant, leur développement au sein de la matrice alimentaire se produit beaucoup plus rapidement et la baisse de pH observée est également accélérée [14]. Tous ces éléments favorisent, de la sorte, la fermentation et sa réussite.

Une fois les starters ajoutés (ou non), les conditions de fermentations doivent encore être choisies. Deux grandes conditions sont inhérentes à la fermentation : la température et le temps. En effet, comme expliqué précédemment, la gamme de température idéale pour les bactéries lactiques se situe entre 15 et 25°C [42]. Plus la température est élevée, plus la fermentation se produira rapidement, vu que la croissance bactérienne sera plus importante. Par conséquent, le temps de fermentation pourra être diminué lorsque les fermentations se feront à plus haute température. Chaque producteur aura donc ses paramètres propres afin de proposer un produit reflétant son savoir-faire et sa volonté. Une fermentation plus longue peut par exemple apporter un goût plus acide (étant donné l'accumulation d'acide lactique).

### 2.2.4. Conservation

Une fois le temps de fermentation terminé, et si celle-ci s'est bien déroulée, le produit peut rester stable pendant plusieurs mois à température ambiante [8]. Cependant, une fois ouverts, les bocaux doivent être consommés dans les plus brefs délais. En effet, l'ouverture provoquera un ajout d'oxygène dans le milieu, ce qui aura pour effet de tuer et diminuer grandement les populations lactiques [11]. Comme cité dans le point 2.1.1., les LAB sont des organismes principalement anaérobies. Même si leur métabolisme est encore fonctionnel à de faibles quantités d'O<sub>2</sub>, une incorporation trop importante de ce gaz leur est mortelle pour elles.

Une deuxième conséquence notable est l'intégration de moisissures (et autres microorganismes présents dans l'air ambiant) dans le bocal. N'ayant plus de compétition vis-

à-vis des bactéries lactiques (à cause de l'ajout d'oxygène qui accompagne l'ouverture), tous ces microorganismes se développeront plus aisément dans le produit.

Étant donné ces éléments, les produits fermentés ne peuvent pas se conserver indéfiniment une fois ouverts. Une solution mise en œuvre pour essayer de diminuer l'impact de ce phénomène consiste simplement à les placer au frigo ( $T^{\circ} : +/- 4^{\circ}\text{C}$ ). Le temps de conservation au frigo pour de tels produits peut légèrement varier, selon les producteurs interrogés. Ce temps peut varier de quelques jours à deux semaines selon le produit considéré, mais également selon l'utilisation faite du produit (nombre d'ouvertures, hygiène lors de l'ouverture du bocal, ...). Si celui-ci est encore immergé dans une saumure après ouverture, le temps de conservation pourra être plus long. Cela étant, les microorganismes se développeront moins rapidement et le produit lactofermenté pourra être consommé jusqu'à plusieurs jours après ouverture.

#### 2.2.5. Remarque générale

Le procédé repris en figure 4 est une vue générale de la lactofermentation. Il est possible que celle-ci soit modifiée par les producteurs afin de répondre aux demandes des consommateurs. La plupart n'ajoutent pas de starters afin de ne pas altérer la flore naturelle de la matière première. Ils proposent alors un produit fini plus artisanal.

Certaines recettes utilisent la pasteurisation en fin de procédé comme étape complémentaire [43]. L'avantage de cette pasteurisation est de pouvoir augmenter la conservation du produit à température ambiante si le contenant demeure fermé. Malheureusement, l'inconvénient de cette technique est semblable aux traitements thermiques en général, à savoir perte de vitamines et diminution de populations microbiennes (notamment la destruction des lactobactéries présentes au sein du produit). Ces lactobactéries ont été reconnues comme très bénéfiques pour la santé de l'Homme [44; 45; 46]. Leur perte représente donc une diminution des bénéfiques que les produits lactofermentés peuvent apporter. Son utilisation dépendra donc du producteur et de sa conception du produit. Si cette méthode est utilisée, le terme de conserves appertisées est d'application.

### 2.3. Microbiologie de la fermentation lactique

La lactofermentation est donc, avant tout, un important changement dans le microbiome des aliments choisis. Les changements les plus importants se font dans les populations de bactéries lactiques ainsi que dans celles des entérobactéries [47]. Finalement, le but d'une fermentation lactique est de pouvoir favoriser au maximum les lactobactéries en instaurant des conditions qui leur sont le plus favorables dans un délai aussi rapide que possible. Cependant, plusieurs autres populations sont également présentes.

#### 2.3.1. Bactéries lactiques

Les acteurs les plus importants lors de l'incubation sont les bactéries lactiques. Comme dit précédemment, ce sont grâce à ces microorganismes que le sucre sera transformé en acide lactique, ce qui permet la baisse de pH. Deux espèces de bactéries sont largement citées lorsque le terme de « lactofermentation » est évoqué : *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* [48]. Remarquons que d'autres familles peuvent être responsables de la fermentation lactique des aliments, comme illustré dans les tableaux 2 et 5. Pour présenter un angle de vue différent des tableaux précédents, le tableau 6 liste quelques microorganismes lactiques ainsi que les matières premières dans lesquelles ils sont retrouvés. L'on voit que chaque denrée aura en son sein une population plus ou moins typique de bactéries lactiques (deux à trois LAB différentes en général) [49].

Tableau 7 Espèces de bactéries lactiques retrouvées en fonction des fruits et légumes considérés [15]

Lactic acid bacteria species	Source
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Tomatoes, marrows, carrots, cucumbers, eggplants, red-beets, capers, pineapple, plums, kiwi, papaya, fennels, cherries, cabbages
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Capers, papaya, eggplants, cucumbers
<i>Lactobacillus rossiae</i>	Pineapple
<i>Lactobacillus fermentum</i>	French beans, red beets, capers, eggplants, melon pod
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Peppers
<i>Lactobacillus brevis</i>	Tomatoes, capers, eggplants, cabbages, cucumbers, melon pod
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Cabbages, capers
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	White cabbages, carrots, peppers, cucumbers, eggplants, lettuce, cherries
<i>Weissella soli</i>	Carrots
<i>Weissella confusa</i> , <i>Weissella cibaria</i>	Peppers, tomatoes, blackberries, papaya
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	French beans, tomatoes, capers, melon pod
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	French beans, tomatoes, cucumbers, capers, cherries, cabbages

Les LAB d'un même aliment ont parfois tendance à présenter un métabolisme complémentaire [50]. Par exemple, dans le cas de la choucroute, deux bactéries lactiques ont été isolées à des moments différents. Une première phase est d'abord caractérisée par la présence de *Leuconostoc mesenteroides* alors que la deuxième phase est dominée par *Lactobacillus plantarum*. Cela s'explique, notamment, par la plus grande résistance de *L.plantarum* en conditions acides. Ces conditions acides s'installent au fur et à mesure de la fermentation [50]. Ces fermentations successives permettent un enrichissement des différentes odeurs et saveurs dans le produit fini [51]. Typiquement, *Lc.mesenteroides* aura tendance à produire de l'acide acétique (grâce à son métabolisme hétérofermentaire) alors que *Lb.bactillus* sera plutôt apprécié pour sa production d'acide lactique [51].

Ces lactobactéries sont également connues pour être halotolérantes [52]. La présence d'une protéine halotolérante a été mise en avant. Cette protéine est capable de résister à des concentrations de sel allant jusque 25% [52]. Elle est également active à des T° allant jusque 40°C, rendant ainsi possible la fermentation [52]. L'ajout de sel est donc possible sans altérer la croissance des LAB. Au contraire, il empêchera aussi le développement des autres populations bactériennes. Le sel, en plus d'être un élément gustatif intéressant, joue donc un rôle bactériostatique non négligeable au sein du produit.

Enfin, les LAB sont connues pour être des productrices de bactériocine. Cette molécule a été définie par Klaenhammer [53] comme « protéine (ou complexe protéique) ayant une activité bactéricide contre les espèces qui sont habituellement étroitement liées à la bactérie productrice ». La production de cette molécule est donc une barrière supplémentaire empêchant le développement de bactéries délétères lors de la fermentation. Plusieurs types de bactériocines sont produites par les LAB et sont classées en 4 grandes catégories selon leurs propriétés [54].

Tableau 8 Liste des différentes classes de bactériocines [77 ;80]

Catégorie	Particularités
Classe I	Lantibiotiques, bactériocine modifiée post-traduction
Classe II	Petite bactériocine membrane active et résistante à la chaleur
IIa	Bactériocine « anti-listeria »
IIb	Complexe à deux peptides
IIc	Bactériocine « sec-dependant »
IId	Non-classifiée
Classe III	Large bactériocine sensible à la chaleur
Classe IV	Bactériocine complexe, composé de lipides essentielle-carbohydrates-protéines

L'avantage majeur de cette diversité se trouve dans les trois grands modes d'action retrouvés à travers ces peptides [54 ; 56].

Les deux premières classes sont relatives à la perméabilité de la membrane cellulaire. En s'associant à certains récepteurs spécifiques, la bactériocine va pouvoir agrandir les pores naturellement présents dans cette membrane. La conséquence directe de cet élargissement va causer l'effondrement de la force proton-motrice en permettant aux petits composés responsables de circuler librement entre les deux surfaces de la membrane. Cette action est complétée par l'inhibition de la production de peptidoglycane, qui empêchent la membrane de se régénérer [56].

Le troisième mode d'action est basé sur l'hydrolyse des liens peptidiques [56]. Plus précisément, ces bactériocines de troisième classe ont la particularité d'agir sur les liens des peptidoglycane [56]. Le peptidoglycane visé sera différent en fonction du type de bactériocines considérés permettant des actions plus ou moins spécifiques sur lesdites cellules.

*Lactobacillus plantarum* est connu pour produire majoritairement des bactériocines de classe II. Les plus référencés sont la plantaricine S, plantaricine 423 et bactériocine ST194BZ [55 ;78 ;79].

Leur présence lors de la fermentation a tendance à diminuer en fin de croissance bactérienne. En effet, des protéases produites par les LAB vont détruire ces composés [55]. L'acidification et les potentiels traitements thermiques ne suffisent pas à assurer leur destruction [55, 56].

Si une persistance est à noter dans le milieu, aucun impact négatif sur l'Homme n'a encore été prouvé [55]. Sa présence éventuelle ne met donc pas le consommateur en danger. Enfin, ces composés font encore l'objet de recherches plus poussées afin de mieux étudier leur mode d'action et, ainsi, mieux les comprendre [1].

Ce sont donc tous ces éléments qui font des lactobactéries les acteurs principaux de la fermentation. L'acidification et l'ajout de sel couplés à la production de bactériocines permettent ainsi une conservation de produit accrue ainsi que la production de saveurs uniques.

### 2.3.2. Entérobactéries

Les entérobactéries font partie des populations de bactéries souvent retrouvées sur les légumes frais [50]. Cette présence s'explique par le caractère ubiquiste de ces organismes, leur permettant de se déposer facilement à la surface de tels aliments [57]. Suite aux différents changements que la matrice alimentaire subira (cité dans le point 2.3.1.), cette population diminuera fortement au fur et à mesure de la fermentation [58]. L'acidification reste malgré tout le paramètre le plus important à respecter [58]. La raison principale est la sensibilité des Enterobacteriaceae face à ce paramètre.

Étant donné que le pH est en général le paramètre le plus monitoré lors de la fermentation, la présence d'entérobactéries n'est pas souvent ce qui est le plus analysé en fin de processus [50 ; 58]. La raison en est certainement le temps et les moyens nécessaires, souvent onéreux pour les artisans moins développés. Cependant, en cas de doute, les entérobactéries peuvent être intéressantes à analyser afin de compléter les informations fournies par le pH. Les Enterobacteriaceae représentent donc un bon indicateur, en complément de l'acidité, afin de qualifier la fermentation. Il est raisonnable de penser que si aucune entérobactérie n'est détectée ET si le pH est suffisamment acide, la fermentation peut alors être considérée comme réussie et le produit comestible.

### 2.3.3. Bactéries pathogènes

Si on considère maintenant les pathogènes, les plus courants à se développer sont de types anaérobies. Les plus connus sont [1 ; 57 ; 59] :

- *Listeria monocytogenes* ;
- *Salmonella typhimurium* ;
- *E.coli* O<sub>157</sub> :H<sub>7</sub> ;
- *Staphylococcus aureus* ;
- *Pseudomonas fluorescens* ;
- *Bacillus cereus* ;
- *Clostridium botulinum* ; *Clostridium perfringens*.

Parmi cette liste, 3 pathogènes sont susceptibles de provoquer le plus de dommages : *L.monocytogenes* , *E.coli* et *C.botulinum* . Leur présence peut être due à des matières premières déjà contaminées ou à une contamination post-traitement (notamment par manipulation humaine voire utilisation d'eau impropre pour l'étape de lavage) [57]. Heureusement, les changements apportés lors du processus de fermentation permettront d'assurer leur inhibition. Deux grands mécanismes peuvent assurer la protection du produit : l'acidité et les bactériocines. Leur action combinée empêchera la majorité des pathogènes de se développer. Certaines opérations peuvent aussi jouer un rôle dans la préservation des aliments. Un producteur peut par exemple choisir de pasteuriser ses produits afin de compléter les actions précédentes [62].

Dans le cas de *Clostridium botulinum*, l'acidité générée par la fermentation permettra d'inhiber sa croissance. Le développement de *C.botulinum* est inhibé à des pH inférieurs à 4.4 [61], mais les producteurs peuvent entre autres choisir de pasteuriser leurs produits, afin d'ajouter une barrière supplémentaire, notamment vis-à-vis de la toxine botulique qui est thermolabile [61].

Pour *Listeria monocytogenes*, l'action des bactériocines permettra d'éviter sa présence. *L.monocytogenes* est en effet sensible aux bactériocines de classe II, produite par les LAB. Ce composé perméabilise la membrane cytoplasmique de la bactérie via la libération de carboxyfluorescéine. Ce faisant, une déplétion dans l'ATP cytoplasmique est créée ainsi qu'un flux sortant de K<sup>+</sup> et de phosphate provoquant la mort de la cellule [62].

Enfin, la bactérie *E. coli* O<sub>157</sub> :H<sub>7</sub> semble plus résistante aux conditions acides [57 ; 63 ; 64]. Mais dans ce cas-ci aussi, les bactériocines suffisent pour combattre ce pathogène, de la même manière que *L.monocytogenes*.

Dans tous les cas, un suivi méticuleux des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène est à préconiser pour éviter toute contamination du produit. A cette fin, et en cas de problèmes, des manuels (Module Préparation et transformation de fruits et légumes) et des conseils peuvent être prodigués par l'AFSCA [65].

En résumé, même si les produits fermentés peuvent théoriquement être contaminés par plusieurs souches de bactéries pathogènes, ces produits possèdent suffisamment de barrières

pour assurer leur protection. Les barrières majeures responsables de cette stabilité sont l'acidification et les bactériocines. Si la fermentation a bien eu lieu, les produits fermentés peuvent être considérés comme aptes à la consommation sans altérer (négativement) la santé du consommateur.

#### 2.4. Aspect législatif

D'un point de vue légal, les produits fermentés ne font pas l'objet d'un règlement particulier. Les normes d'applications sont malgré tout reprises dans l'annexe I du RÈGLEMENT (CE) N° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques [66]. Cette annexe cite, entre autres, les normes microbiologiques à suivre pour les légumes, fruits et produits à base de légumes et de fruits. On constate notamment que le seul microorganisme repris est *E. coli*. Les autres microorganismes pathogènes n'y sont pas mentionnés et ne font donc pas l'objet d'un quelconque contrôle.

Pour venir en aide aux artisans, un guide d'autocontrôle générique pour le « Business to Consumer » est mis à disposition par l'AFSCA pour leur permettre d'installer leur production dans le meilleur environnement. En complément de ce guide, un module plus spécifique à la préparation et à la transformation de fruits et légumes est également disponible auprès de l'AFSCA [65].

Ce manuel reprend les différents flow-chart ainsi que les CCP et les PA s'y rattachant [65]. Dans le cas des CCP, trois étapes sont considérées comme étant « à risque » :

- La réception ;
- L'entreposage des matières premières ;
- La vente et l'entreposage des produits finis.

Dans ces trois cas, les CCP soulignés par le module sont tous relatifs à la température. Il est donc indispensable de mesurer la température des denrées durant ces phases. Si la température devenait trop élevée, la contamination microbiologique serait trop importante et influencerait sur la santé du consommateur. Outre les températures à respecter, quelques PA sont également d'application. Ceux-ci sont plus nombreux et diversifiés que les CCP, et touchent différentes étapes du processus. Dans le but d'avoir une vue plus globale, le tableau 8 reprend les CCP et PA courants dans les processus de lactofermentation selon le guide d'autocontrôle proposé par l'AFSCA [65].

Tableau 9 CCP et PA typiques d'un processus de lactofermentation proposé par l'AFSCA [65]

Étapes	CCP/PA	Problème
Réception	CCP 1	Température élevée
	PA 1	Emballage non conforme      Contamination croisée      Conservation dépassée
Entreposage	CCP3	Température élevée
Prélavage	PA 23	Contamination physique
Pelage + Épluchage	PA 23	Contamination physique
Lavage	PA 23	Contamination physique
Découpage	PA 23	Contamination physique
Mélange/Saumure	PA 5	Contamination par allergènes
Étiquetage	PA 6	Problème d'étiquetage      Emballage non conforme
Entreposage et vente	CCP 3	Température élevée
	PA 7	Dépassement durée conservation

Pour compléter le règlement et le guide d'autocontrôle précédemment présentés, le Codex Alimentarius a mis aussi à disposition un document « Normes pour les fruits et légumes marinés fermentés (cxs 260-2007) » reprenant les différents critères qui doivent être respectés pour les produits fermentés [67]. Les lignes directrices à respecter y sont reprises afin de guider au mieux les producteurs. Des points comme la classification des lots, l'étiquetage ou encore la présentation générale des produits finis sont abordés. Ce fichier reprend de plus les analyses physico-chimiques qui peuvent être faites sur les produits [67]. Le codex propose notamment l'étude de :

- acide benzoïque ;
- plomb ;
- sorbate ;
- dioxyde de soufre ;
- pH ;
- Poids égoutté.

Le Codex Alimentarius propose deux autres guides complétant les informations. Ces deux guides sont : « Principes généraux d'hygiène alimentaire cxc 1-1969 » et « Code d'usages en matière d'hygiène pour les conserves non acidifiées ou acidifiées, de produits alimentaires naturellement peu acides (cac/rcp 23-1979) ». Ces deux guides ne sont pas applicables dans leur intégralité dans le cas de la fermentation lactique, notamment celui sur les conserves étant donné que ces denrées ont subi un traitement de stérilisation. Il peut néanmoins apporter quelques éclaircissements sur les bonnes manières d'hygiène [67 ; 68 ; 69].

Il est clair, cependant, que les produits obtenus à la suite d'une fermentation (lactique ou autre) peuvent être nombreux. Chacun possède ses caractéristiques et points d'attention propres [65]. Les produits obtenus par ces différentes fermentations auront donc des exigences différentes.

## 2.5. Altération des produits fermentés

Les produits fermentés subissent des changements organoleptiques importants durant le processus de fermentation, les différentes LAB apportant des odeurs, des saveurs et des textures uniques. Toutefois, le produit peut, dans certains cas, montrer quelques altérations organoleptiques. Ces altérations sont considérées comme inappropriées et doivent donc être évitées à tout prix.

Dans un premier temps, les attributs du produit subiront des changements conséquents [70]. Les principaux aspects amenés à être modifiés sont le goût et l'odeur. En effet, plus le processus est long, plus l'accumulation d'acide lactique sera importante et donc, le goût aura tendance à tendre vers des notes acides [71]. Évidemment, en fonction de la recette et des différents ingrédients (ainsi que leur proportion), d'autres notes particulières pourront se développer [72]. Il n'est donc pas impossible de retrouver des produits qui auront un goût plus ou moins acide, avec plus ou moins de notes salées dans une même gamme. Des odeurs tout aussi particulières se développeront en même temps que le changement de goût [72]. De la même manière que la sapidité, les odeurs peuvent varier d'un produit à un autre, toujours en fonction des différents éléments compris dans la recette. Ce sera alors aux producteurs/artisans de trouver la meilleure combinaison de matières premières qui donneront les saveurs les plus recherchées ou, au contraire, uniques.

Ces différentes notes proviennent des microorganismes qui se développeront au cours de la fermentation et chaque bactérie sera, entre autres, caractérisée par les différents arômes qu'elle apportera au cours de la fermentation [51].

Thierry (2015) fait état de certains de ces arômes dans son article parlant des saveurs produites par les LAB durant la fermentation. Cependant, le produit peut, dans certains cas, développer des modifications non voulues ou désagréables pour le consommateur [73].

La plupart des altérations typiques observées dans les produits fermentés sont d'origine microbiologique. Les deux grands facteurs responsables souvent cités sont la température et le sel [74]. Pour exemple, une concentration saline trop élevée aura pour impact d'inhiber la croissance de *L.mesenteroides*, bactérie importante pour la production d'acide acétique. Sans cette molécule dans le produit fini, le goût final sera considéré comme âpre [74]. En outre, la croissance de levures halotolérantes ne sera plus inhibée et la couleur générale du produit pourra varier, suite à une production de pigments [74]. Pour avoir une vue plus globale, le tableau 9 reprend quelques altérations avec les causes et agents responsables de certains produits fermentés.

Tableau 10 Altérations communes des produits fermentés

Altération	Causes	Microorganismes/Familles responsables	Produits touchés	Source
Poche de gaz		<i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Escherichia sp.</i> ; <i>S. cerevisiae</i> ; <i>W. anomalus</i>	Concombres; Olives	21
Ramollissement	Température trop élevée/ Concentration de sel trop basse	<i>Enterobacter</i> ; <i>Flavobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i>	Choucroute	21;78
		<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Ascochyta</i>	Concombres	76
		<i>Bacillus</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Achromobacter</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>	Kimchi; Olives	74
Tâche blanche	Présence de levures	LAB	Olives	77
Pigmentation rosée	Présence d'oxygène trop importante	Levure; LAB; <i>Rhodotorula</i>	Choucroute; Olives	21; 74
Sédimentation blanche	Présence de levures	Levure		21; 79
Goût amer				75

Plusieurs voies peuvent être explorées pour éviter ce genre d'altérations. Plusieurs solutions existent. La première solution qui peut être implantée est le plan HACCP [21]. Le plan HACCP reste un outil fiable afin de connaître les différents points faibles tout au long de la chaîne de production. Certains des points critiques auxquels un producteur se doit d'être attentif sont d'ailleurs repris dans la section « 2.4. Aspect législatif » de ce travail. On y voit, notamment, qu'une partie des recommandations porte sur la gestion des matières premières. Afin d'avoir un produit fini de qualité, les matières premières doivent être aussi propres que possible [77]. Dans un deuxième temps, des starters peuvent être ajoutés afin d'empêcher le développement de la flore altérante. Cependant, comme cité plus haut, beaucoup de producteurs sont réticents à les utiliser pour des raisons d'authenticité [74]. Enfin, les conditions de fermentation doivent permettre un développement optimum des LAB afin d'empêcher le développement d'une flore non désirée [74 ; 21]. Comme dans beaucoup de domaines, ces recommandations restent avant tout préventives, car il est difficile de « récupérer » un produit altéré.

### 3. Enquête menée auprès des producteurs

#### 3.1. Approche globale

Afin de mieux connaître les réalités du terrain, une enquête a été menée auprès de 3 producteurs locaux. Chacun de ces producteurs a accepté de répondre à quelques questions portant sur leur mode de production ainsi que les difficultés auxquelles ils ont déjà été confrontés. Cette enquête se présentait sous forme d'un entretien téléphonique durant lequel des questions relatives à leur activité leur ont été posées. Afin d'avoir un sondage plus diversifié, les profils interrogés étaient différents les uns des autres. Une synthèse des profils, modes opératoires et difficultés rencontrées est reprise dans tableau 11 (dans le point « 3.2. Profil des producteurs »).

Tous ces producteurs partageaient les mêmes visions et objectifs. D'abord, tous veulent favoriser le circuit court. Pour ce faire, l'achat et la vente des produits se font auprès d'agriculteurs locaux et de petits magasins de proximité. Les produits finis varient donc au cours de l'année pour suivre le calendrier de récolte des agriculteurs en question. Ensuite, ces artisans ont une vision « biologique » de leur production, c'est-à-dire que la méthode de production des matières premières est aussi éco-responsable que possible. Enfin, chacun prône une certaine transparence de produit. Pour y arriver, des ateliers sont proposés par certains alors que d'autres préfèrent en informer plus largement le public (voire les deux). Les deux situations peuvent se rencontrer.

#### 3.2. Profil des producteurs

Tableau 11 Procédés et difficultés rencontrées par les producteurs interrogés

Producteurs	Producteur 1	Producteur 2	Producteur 3
<b>Produits proposés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bocaux de fruits et légumes fermentés</li> <li>- Kimchi</li> <li>- Pickles</li> <li>- Ginger ale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bocaux de légumes fermentés</li> <li>- Jus de légumes</li> <li>- Boissons fermentées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Saumures</li> <li>- Légumes fermentés</li> </ul>
<b>Mode opératoire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1° : Préparation de la saumure</li> <li>2° : Lavage, épluchage, coupage des matières premières</li> <li>3° : Ajout d'épices dans les bocaux</li> <li>4° : Ajout des matières premières dans les bocaux</li> <li>5° : Ajout de la saumure</li> <li>6° : Tassage</li> <li>7° : Fermeture des bocaux</li> <li>8° : Fermentation durant une à deux semaines</li> <li>9° : Mise au frais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1° : Préparation des légumes</li> <li>2° : Massage des légumes avec le sel</li> <li>3° : Ajout d'épices</li> <li>4° : Fermentation dans une jarre pendant 4 à 6 semaines</li> <li>5° : Reconditionnement en petits bocaux</li> <li>6° : Stockage au réfrigérateur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1° : ° : Préparation des légumes</li> <li>2° : Massage des légumes avec le sel</li> <li>3° : Ajout d'épices</li> <li>4° : Fermentation en bocal de 3-5L pendant 1 à 2 semaines</li> <li>5° : Conditionnement en petits bocaux (200-400g)</li> <li>6° : Stockage au réfrigérateur</li> </ul>

<b>Difficultés rencontrées</b>	- Débordement de certains produits - Moisissures en surfaces	- Changement de couleur	- Développement de mousse blanche en surface - Débordement de certains produits
<b>Particularités</b>	- Certification « bio » pour certains produits, en cours pour le reste - Pas d'utilisation de starter	- Certification « bio » - Pas d'utilisation de starter	- Débute dans la production de légumes fermentés

### 3.1. Résultat de l'enquête

L'entretien téléphonique au cours duquel diverses questions ont été posées aux participants a révélé les difficultés auxquelles faisaient face les artisans interrogés. Les questions plus précisément posées sont disponibles en annexe 1.

Le principal problème rencontré par ces producteurs se situe au niveau de la conservation. Si le produit n'est pas mis au frigo, il aura, selon eux, tendance à se détériorer visuellement au cours du temps. L'explication réside dans la fermentation qui se poursuivra, entraînant une évolution du produit. Or, un des avantages des produits fermentés est censé se trouver dans leur conservation plus facile, qui ne nécessite aucun apport d'énergie externe. Le but de ce travail sera donc de trouver des pistes permettant d'améliorer cet aspect.

Pour ce faire, plusieurs modalités d'une recette typique de carottes râpées fermentées seront testées afin de reproduire les conditions mises en œuvre lors des processus utilisés par ces artisans. Ensuite, une analyse microbiologique, physico-chimique et sensorielle sera menée sur ces produits afin de mettre en exergue un problème potentiel. Si une piste est trouvée, elle pourra être explorée dans le but d'apporter de l'aide aux producteurs soucieux d'améliorer leur processus de fabrication.

## 4. Objectifs

L'objectif commun de tous ces producteurs est de proposer un produit qui puisse se conserver longtemps à température ambiante. Cependant l'altération naturelle du produit s'effectue inexorablement. Une solution susceptible de favoriser la conservation serait de jouer sur différents paramètres de fermentation.

Le but des expérimentations menées sera donc de répondre notamment à la problématique (ainsi qu'à l'hypothèse) suivante :

<b>Problématique</b>	Les produits lactofermentés doivent se conserver au frigo après production afin de ralentir les altérations du produit.
<b>Hypothèse</b>	La conservation peut être améliorée en favorisant la croissance des LAB présentes via l'adaptation de certains paramètres de production.
<b>Protocole</b>	Expérimentation n°0 : Test de répétabilité Expérimentation n°1 : Étude de l'impact de différents paramètres de fermentation Expérimentation n°2 : Impact du temps et de la température sur la fermentation Expérimentation n°3 : Test de vieillissement
<b>Analyses</b>	- Lactobactéries - Entérobactéries - Acidité - Colorimétrie - HPLC - Viscosité - Analyse sensorielle

Ce travail aura donc pour premier objectif d'aider les producteurs en répondant à certaines de leurs questions relatives au procédé de fabrication. Il doit également permettre une meilleure compréhension des phénomènes sous-jacents à la fermentation. Trois expérimentations ont été menées afin d'étudier l'impact de divers paramètres sur les produits fermentés.

Dans un premier temps, une première expérience aura pour but de déterminer si le volume, le sel et la température de fermentation jouent un rôle marqué dans la durée de conservation de produits lactofermentés.

Ensuite, l'objectif de la deuxième expérience est de caractériser l'impact de plusieurs modalités de temps et de température sur la fermentation.

Enfin, la finalité du test de vieillissement est de pouvoir caractériser l'évolution des produits au cours du temps et ainsi déterminer le temps de conservation « maximal » du produit (avec un degré d'altération organoleptique acceptable).

## 5. Matériel et Méthodes

Afin de rester aussi synthétique que possible, une liste plus précise du matériel utilisé (ainsi que la quantité des consommables) est renseignée en annexe 3.

### 5.1. Matières premières

En ce qui concerne le légume travaillé durant les expériences, la carotte a été choisie en raison de sa disponibilité tout au long de l'année.

Le sel utilisé est de type gros grains et non raffiné afin de ne pas inhiber la croissance des microorganismes lors de la fermentation.

L'eau ajoutée pour la saumure est de l'eau en bouteille.

Enfin, les bocaux choisis sont en verre hermétiques pour favoriser les conditions anaérobies.

### 5.2. Fermentation et préparation des bocaux

Pour plus de clarté, ce point sera divisé en plusieurs sous-points. Le premier de ceux-ci abordera la méthode de préparation générale (commune à tous les essais). Les suivants exposeront les modalités appliquées plus spécifiquement. Une représentation graphique des expériences est disponible en annexe 4 et l'explication plus détaillée des choix, en annexe 5.

#### 5.2.1. Méthode de préparation générale

La saumure est préparée en mélangeant et dissolvant complètement le sel dans l'eau. Il faut faire attention de respecter les différentes concentrations de saumure (1%, 3% ou 5% selon l'expérimentation).

Les carottes sont ensuite lavées à l'eau froide avant d'être pelées et râpées.

Elles sont ensuite massées avec 1, 3 ou 5% de sel selon la modalité de l'expérimentation testée, jusqu'à pénétration totale du sel.

Une fois terminés, les bocaux sont remplis avec les carottes (environ 450gr pour les bocaux de 0,5L et 1,400gr pour les bocaux de 1,5L) avant d'être bien tassés afin de les recouvrir de leur jus. La saumure est ajoutée pour immerger complètement les carottes avant de placer les bocaux à fermenter en respectant scrupuleusement la température et le temps requis pour chaque expérimentation. Enfin, les bocaux sont placés en conditions de conservations (différentes selon l'expérience considérée).

Les bocaux des premières expérimentations (0 à 2) ont été réalisés dans les locaux de l'université de Gembloux Agro Bio-tech. Les bocaux de l'expérimentation n°3 ont, par contre,

été faits au sein de l'atelier de production de Paysans-Artisans, situé dans le zoning de Rhisnes, afin de profiter d'un environnement plus professionnel lors de la production.

#### 5.2.2. Test de répétabilité

Le test de répétabilité a pour but d'écarter la méthode de travail comme source de variabilité. Trois bocaux de 0,5L à 1% de sel fermenté à 25°C pendant une semaine ont été produits à cet effet. Les analyses ont porté sur les LAB, entérobactéries, pH et colorimétrie.

#### 5.2.3. Expérimentation 1

Dans ce cas-ci, trois paramètres importants de fermentation ont été testés, à raison de deux modalités chacun :

- Le volume : 0,5L – 1,5L ;
- La concentration de sel : 1% - 5% ;
- La température de fermentation : 18°C – 25°C ;
- Temps de fermentation : une semaine ;
- Conservation : Température ambiante pendant deux semaines.

Les analyses faites durant cette expérimentation ont été les LAB, les entérobactéries, l'acidité et la colorimétrie.

#### 5.2.4. Expérimentation 2

Trois modalités de temps et de température ont été testées au cours de la deuxième expérience :

- Volume : 0,5L ;
- Salinité : 1% ;
- Temps de fermentation : 7 – 14 – 21 jours ;
- Température de fermentation : 4°C – 18°C – 25°C.

Les analyses ont porté sur les LAB, les entérobactéries, l'acidité, la colorimétrie et viscosité.

#### 5.2.5. Test de vieillissement

Le dernier test mis en place se concentre sur les conditions de conservations suivantes :

- Volume : 0,5L
- Salinité : 1% - 3%
- Fermentation : 7 jours à 20°C
- Température de conservation : 4°C – 25°C
- Durée de conservation : 0 – 28 – 56 – 84 jours

Les LAB, entérobactéries, pH et colorimétrie ont été analysés au terme de chaque durée de conservation. L'analyse des sucres et des acides organiques a aussi été faite afin de voir leur évolution au cours du temps. En complément de ces informations, une analyse sensorielle a été établie pour recueillir l'avis des consommateurs quant à la durée de conservation.

### 5.3. Méthode d'analyse

*Tableau 12 Récapitulatif des analyses faites par expérimentation*

<b>Expérimentation</b>	<b>Analyses</b>
Test de répétabilité	LAB, Entérobactéries, pH, colorimétrie
Expérience 1	LAB, Entérobactéries, pH, colorimétrie
Expérience 2	LAB, Entérobactéries, pH, colorimétrie, viscosité
Test de vieillissement	LAB, Entérobactéries, pH, colorimétrie, HPLC

### 5.3.1. Microbiologie

La dilution mère est préparée en mélangeant 10 grammes d'échantillons avec 90 grammes d'eau peptonée tamponnée avant d'être homogénéisée au stomacher pendant 2 minutes. Les dilutions successives sont ensuite préparées jusque  $10^{-4}$  en mélangeant 2ml de la dilution précédente dans 18ml d'EPT. Les Petrifilm sontensemencés en déposant 1 ml de la dilution au centre de la gélose avant de la répartir sur toute la surface [82,83,84]. Enfin, ils sont incubés selon les caractéristiques propres à chaque microorganisme :

Tableau 13 Conditions d'incubation selon les microorganismes considérés [82,83,84]

Type de Petrifilm	Temps	Température
Lactobactéries	48h	30°C
Entérobactéries	24h	38°C

Le dénombrement a été effectué en suivant le manuel d'utilisation prodigué par 3M [82,83,84]. L'aspect des différentes colonies sur gélose est montré en annexe 6.

Le choix de la dilution maximale a été fait en se basant sur les résultats obtenus lors du test de répétabilité (la dilution  $10^{-4}$  étant la première dilution permettant une approximation des LAB).

3 Petrifilm par bocal a été nécessaire, afin d'ensemencer chaque dilution.

### 5.3.2. Mesure de l'acidité

L'acidité des différents échantillons est analysée grâce à un pH-mètre.

Avant toute manipulation, l'appareil a dû être calibré en utilisant les solutions tampons à pH 7.00 et pH 4.00.

L'analyse est ensuite menée sur environ 20 ml de saumure, à raison de trois prises de mesures. Deux échantillons par bocal ont été prélevés. La mesure finale conservée est une moyenne de ces 6 prises de mesures.

### 5.3.3. Mesure de la colorimétrie

La couleur des échantillons a été mesurée grâce à un colorimètre calibré avec les tuiles fournies. L'analyse a ensuite été faite sur environ 20 ml d'échantillon légèrement tassé et recouvert d'une tuile en céramique (afin d'empêcher qu'une lumière parasite externe n'interfère).

Afin d'avoir une mesure aussi fidèle que possible, 3 prises de mesures par échantillon ont été faites et les paramètres  $[L^* a^*b^*]$  ont été notés.

### 5.3.4. Mesure de la viscosité

Centrifuger environ 15 ml de saumure à 4000 RPM (~1717g) pendant 5 minutes. Une deuxième centrifugation peut être effectuée si des particules sont restées en suspension.

L'analyse de la viscosité a été faite sur quelques millilitres de saumure Les paramètres sauvegardés pour la mesure de la viscosité sont les suivantes :

- Vitesse : 1/s ;
- Nombre de points par mesures : 200 ;
- Pression ;
- Intervalle de temps : 1000 secs ;
- Mesure de points : 5/secondes.

Les résultats enregistrés via cette méthode sont la contrainte de cisaillement ainsi que la viscosité normale.

#### 5.3.5. HPLC

Centrifuger environ 10 ml de saumure à 4500RPM (~2173g) pendant 5 minutes. Si la solution est encore trop trouble, une deuxième centrifugation peut être effectuée. Par la suite, diluer 10x chaque échantillon dans de l'eau distillée et les filtrer avec une seringue d'1ml munie d'un filtre de 45µm.

Les conditions d'HPLC utilisées sont les suivantes :

- Éluant : acide sulfurique (5mM) ;
- Débit : 0,5 ml/min ;
- Température : 30°C

Enfin, des droites d'étalonnage ont été faites afin de quantifier les différents composants. Ces droites se trouvent à l'annexe 9.

#### 5.3.6. Analyse sensorielle

Deux analyses sensorielles ont été menées sur un panel naïf de consommateurs afin de déterminer ses préférences face à des modalités de fermentations diverses.

Lors de la première analyse, un panel naïf de 63 personnes a été recruté sur internet pour l'analyse sensorielle. Deux échantillons de carottes râpées fermentées respectivement à 18°C et 25°C (tous deux à 1% de sel) ont été évalués sur base de deux tests distincts : un test triangulaire et un test d'évaluation-comparaison

Dans le test triangulaire, il a été demandé de mettre en avant l'échantillon différent parmi les trois proposés. En ce qui concerne le deuxième test, le jury a été prié d'évaluer les deux échantillons sur différents critères et de choisir celui qu'ils préféreraient. Les critères évalués choisis étaient :

- Couleur ;
- Texture ;
- Acidité.

En complément de ces tests, des questions basées plutôt sur un aspect sociologique leur ont également été soumises pour se faire une idée des habitudes de consommations relatives aux produits fermentés.

La deuxième analyse avait pour but d'apprécier l'évolution organoleptique de produits conservés à 4°C et 25°C pendant 84 jours, comparé à un témoin (uniquement fermenté pendant une semaine). Trois tests triangulaires ont été mis en place :

- Echantillon conservé à 4°C – Témoin
- Echantillon conservé à 25°C – Témoin
- Echantillon conservé à 4°C - Echantillon conservé à 25°C

Ensuite, l'appréciation du jury face aux différents échantillons (reprenant les mêmes critères que précédemment) a été évaluée.

La numérotation des échantillons a été faite avec le programme Excel, de manière à permettre une dégustation à l'aveugle des différents échantillons.

#### 5.3.7. Traitement des données

Le logiciel utilisé pour le traitement statistique des différents résultats a été SAS 9.4.

En fonction des expérimentations, une analyse de la variance à 2 ou 3 critères de classification a été faite. Les tableaux d'analyse de la variance (ainsi que les p-valeurs associées) sont repris en annexe 7.

## 6. Résultats

### 6.1. Test de répétabilité

Les résultats de répétabilité sont indiqués ci-dessous, ils portent sur la microbiologie (LAB et entéro), le pH et la colorimétrie.

#### 6.1.1. Microbiologie

##### 6.1.1.1. Entérobactéries

Le tableau 14 reprend le nombre d'entérobactéries dénombré.

Tableau 14 Dénombrement des entérobactéries pour le test de répétabilité

Bocal	Prise échantillon	Dilution -2	Dilution -3	Dilution-4
1	1	<15	<15	<15
	2	<15	<15	<15
	3	<15	<15	<15
2	1	<15	<15	<15
	2	<15	<15	<15
	3	<15	<15	<15
3	1	<15	<15	<15
	2	<15	<15	<15
	3	<15	<15	<15

Aucune différence n'apparaît entre les bocaux analysés. Le nombre d'entérobactéries s'est rapidement stabilisé.

##### 6.1.1.2. Lactobactéries

Le tableau 15 dénombre les lactobactéries durant le test de répétabilité.

Tableau 15 Dénombrement des lactobactéries pour le test de répétabilité

Bocal	Prise d'échantillon	Dilution -2	Dilution -3	Dilution -4
1	1	<15	<15	1500
	2	<15	<15	1515
	3	<15	<15	1590
2	1	<15	<15	1530
	2	<15	<15	1470
	3	<15	<15	1455
3	1	<15	<15	1695
	2	<15	<15	1305
	3	<15	<15	1605

Les résultats des dénombrements sont assez semblables entre eux. Seule la deuxième prise d'échantillons du 3<sup>ème</sup> bocal avait un niveau de LAB légèrement (1305 au lieu de la valeur moyenne de 1518 observée).

#### 6.1.2. Acidité

Les mesures de pH sont reprises dans le tableau 16.

Tableau 16 Mesure de l'acidité du test de répétabilité

Bocal	Prise d'échantillon	Prise de mesure 1	Prise de mesure 2	Prise de mesure 3	Moyenne
1	1	3,794	3,791	3,787	3,797
	2	3,809	3,802	3,801	
2	1	3,802	3,809	3,803	3,803
	2	3,803	3,802	3,801	
3	1	3,8	3,791	3,788	3,789
	2	3,787	3,785	3,785	

Les moyennes (calculées sur base des 3 prises de mesures des 2 échantillons de chaque bocal) ne présentent pas de différences significatives entre elles.

### 6.1.3. Colorimétrie

Enfin, la colorimétrie est reprise au tableau 17

Tableau 17 Colorimétrie des bocaux de répétabilité

Bocal	Prise de mesure	L*	a*	b*
1	1	47,88	39,80	47,67
	2	48,21	39,49	46,60
	3	48,15	39,71	46,89
	Moyenne	48,08	39,67	47,05
2	1	48,63	37,64	43,51
	2	48,90	38,15	44,64
	3	48,22	38,53	45,39
	Moyenne	48,58	38,11	44,51
3	1	48,23	38,68	45,21
	2	47,57	38,78	45,46
	3	47,82	38,90	46,85
	Moyenne	47,87	38,79	45,84

Aucune grande variation n'est pas non plus soulignée entre les prises de mesures durant le test de répétabilité.

## 6.2. Expérimentation n°1

Les résultats de la première expérimentation apparaissent dans les points ci-dessous. Les analyses relatives sont identiques à ceux du test de répétabilité (microbiologie, pH et colorimétrie).

### 6.2.1. Microbiologie

#### 6.2.1.1. Entérobactéries

Les figures 5 à 7 reprennent le dénombrement des entérobactéries.

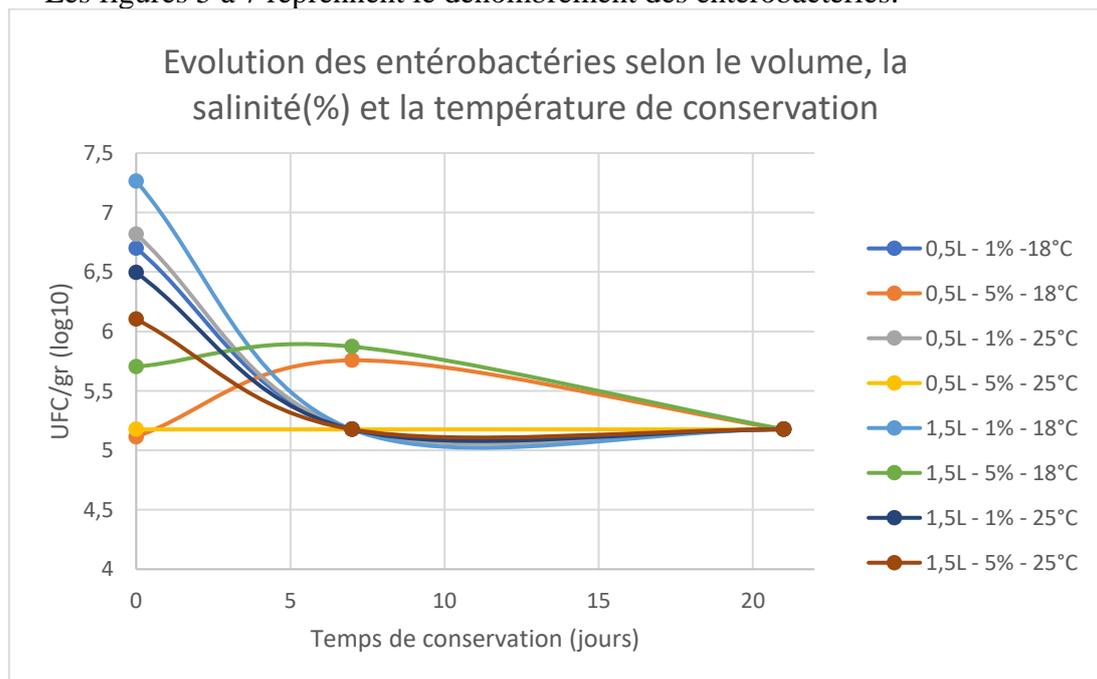


Figure 5 Evolution moyenne des entérobactéries lors de l'expérimentation n°1 (exprimé en log10)

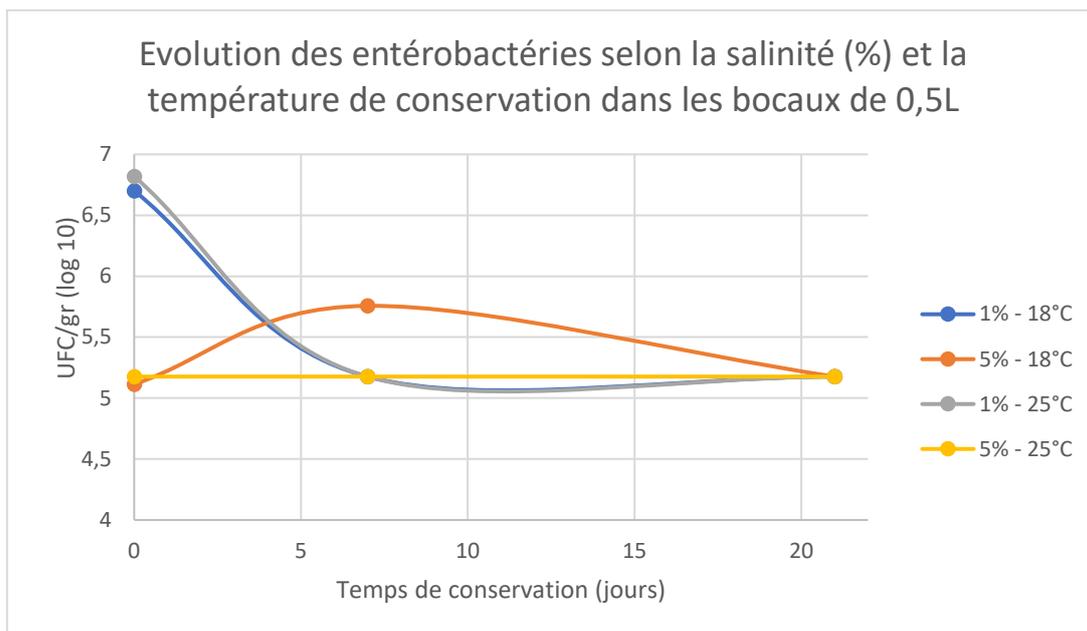


Figure 6 Evolution des entérobactéries lors de l'expérimentation n°1 dans les bocaux de 0,5L (exprimé en log10)

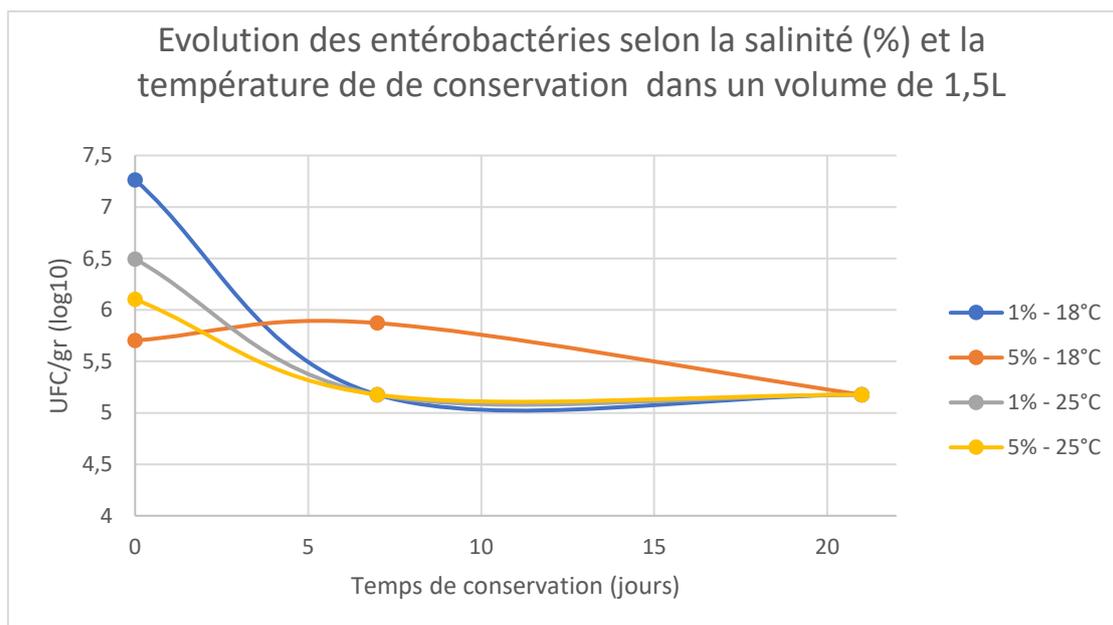


Figure 7 Evolution des entérobactéries lors de l'expérimentation n°1 dans les bocaux de 1,5L (exprimé en log10)

La figure 5 reprend l'évolution globale des entérobactéries de l'expérience n°1. Afin d'être plus lisible, les figures 6 et 7 montrent l'évolution distincte au sein des deux volumes. On peut constater que malgré un nombre variable de colonies en début de conservation, le nombre d'entérobactéries se stabilise rapidement pour atteindre la même concentration en fin de conservation (21 jours). Seule la modalité « 5%-18°C » a mis plus de temps à se stabiliser ; elle présente une légère augmentation d'entérobactéries avant une diminution plus marquée.

### 6.2.1.2. Lactobactéries

L'évolution des lactobactéries est reprise dans les figures 8 à 10, en fonction des différents volumes choisis.

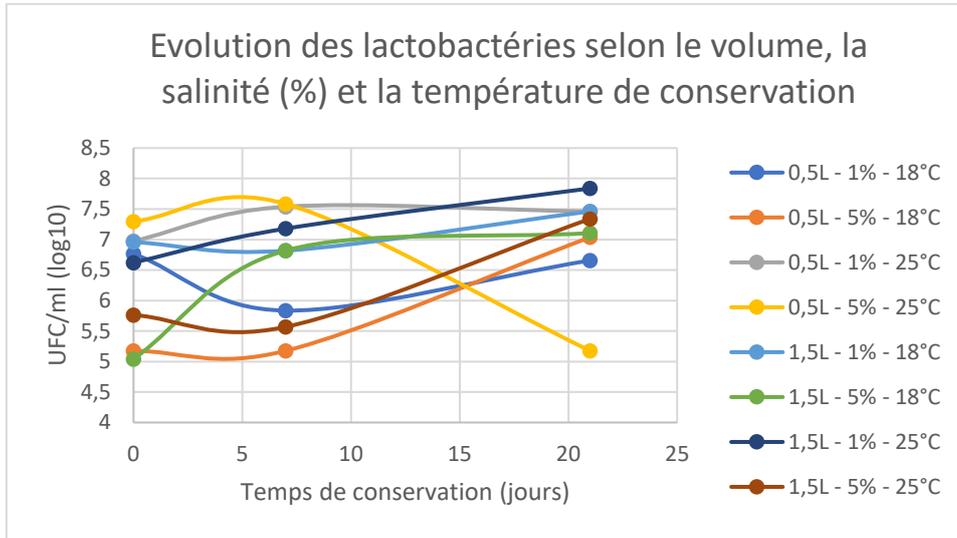


Figure 8 Evolution des lactobactéries lors de l'expérimentation n°1 (exprimé en log<sub>10</sub>)

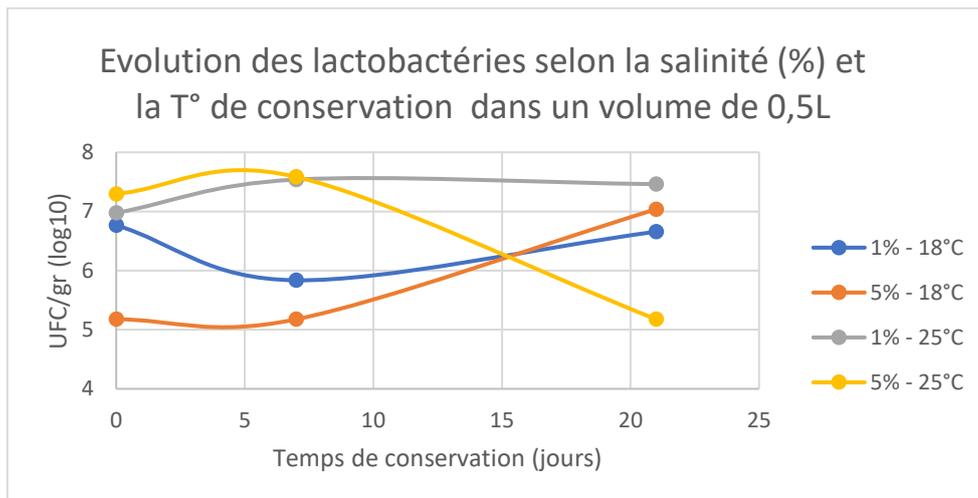


Figure 9 Evolution des lactobactéries lors de l'expérimentation n°1 dans les bocaux de 0,5L (exprimé en log<sub>10</sub>)

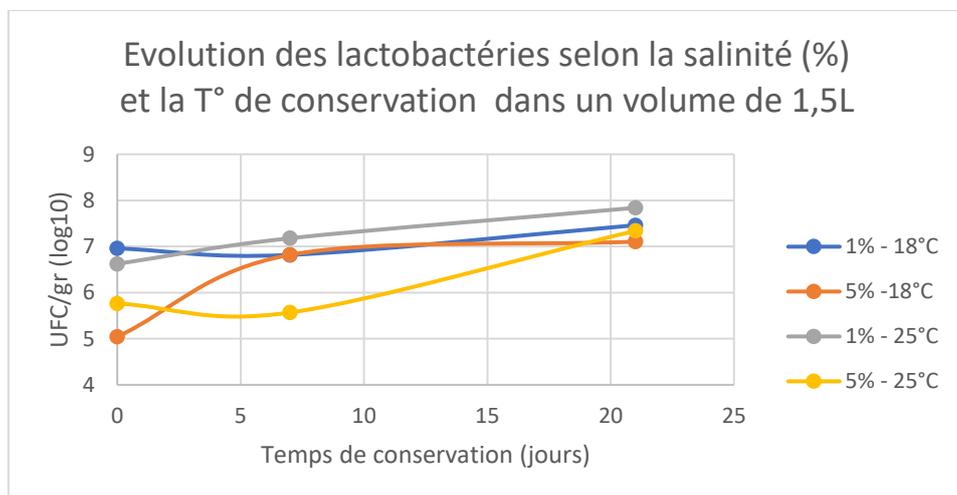


Figure 10 Evolution des lactobactéries lors de l'expérimentation n°1 dans les bocaux de 1,5L (exprimé en log<sub>10</sub>)

Comme précédemment, le nombre initial de LAB est assez variable en début de conservation. Cependant, l'évolution est plus complexe que pour les entérobactéries. Dans ce cas-ci, la quantité d'UFC finale varie beaucoup plus selon les modalités considérées, notamment pour les bocaux de 0,5L à 5% de sel, avec une température de conservation de 25°C. Ce couple de modalité présente une diminution de LAB en fin de conservation, contrairement aux autres modalités présentant plutôt une croissance constante sur la fin du temps de conservation considéré.

### 6.2.2. Acidité

L'acidification au cours du temps est reprise dans les figures 11 à 13

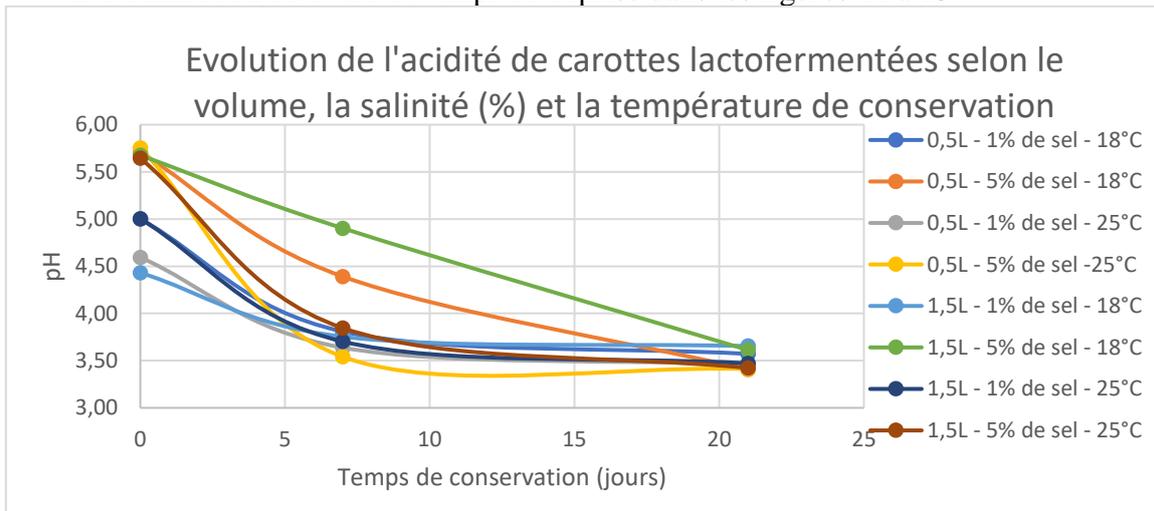


Figure 11 Evolution de l'acidité des bocaux lactofermentés de 0,5L et 1,5L selon les différentes modalités

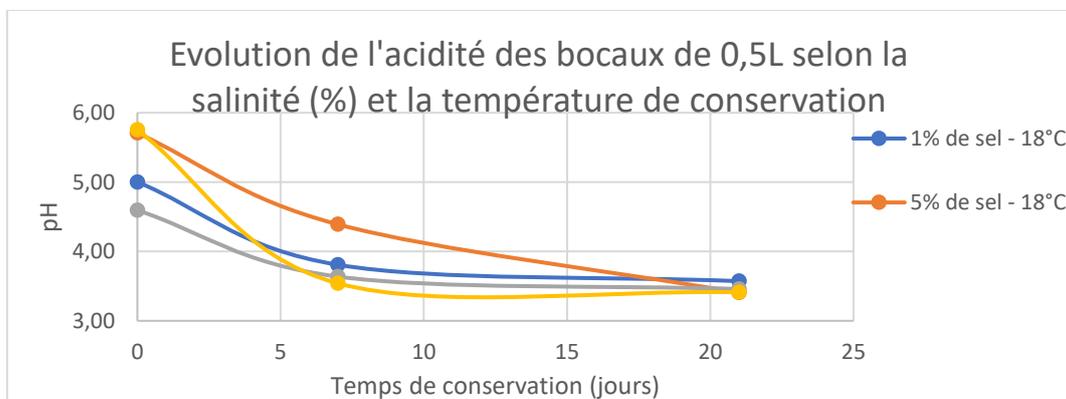


Figure 12 Evolution de l'acidité des bocaux lactofermentés de 0,5L selon les différentes modalités

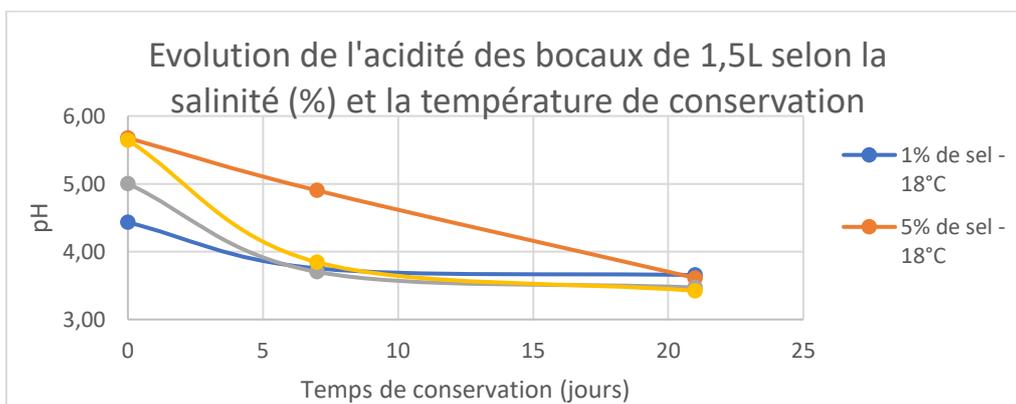


Figure 13 Evolution de l'acidité des bocaux lactofermentés de 1,5L selon les différentes modalités

On constate que, malgré la différence de pH initiale suite à la fermentation, l'acidité après 21 jours de conservation est presque la même pour tous les bocaux, indépendamment du volume. Les courbes relatives à 5% de sel à 18°C (indépendamment du volume) ont malgré tout une cinétique plus lente que les autres, même si la valeur finale est semblable pour toutes les courbes.

### 6.2.3. Colorimétrie

Les moyennes des mesures colorimétriques en fonction des paramètres testés sont reprises dans les tableaux 18 et 19.

Tableau 18 Mesure colorimétrique moyenne des bocaux de 0,5L de l'expérimentation n°1

Vol.	Sel	T°	Temps	L*	Ecart-type	a*	Ecart-type	b*	Ecart-type
0,5	1	18	0	<b>43,02</b>	0,03	<b>27,96</b>	0,05	<b>44,37</b>	0,20
0,5	1	18	7	<b>45,93</b>	0,10	<b>26,92</b>	0,10	<b>41,29</b>	0,27
0,5	1	18	21	<b>47,91</b>	0,15	<b>17,31</b>	0,31	<b>33,95</b>	0,27
0,5	5	18	0	<b>38,85</b>	0,01	<b>27,58</b>	0,04	<b>40,64</b>	0,09
0,5	5	18	7	<b>41,36</b>	0,09	<b>27,39</b>	0,03	<b>41,12</b>	0,13
0,5	5	18	21	<b>42,34</b>	0,02	<b>29,39</b>	0,02	<b>44,47</b>	0,02
0,5	1	25	0	<b>43,73</b>	0,27	<b>27,27</b>	0,05	<b>41,79</b>	0,14
0,5	1	25	7	<b>43,90</b>	0,04	<b>38,63</b>	0,06	<b>49,04</b>	0,14
0,5	1	25	21	<b>42,96</b>	0,04	<b>34,66</b>	0,03	<b>44,48</b>	0,14
0,5	5	25	0	<b>37,89</b>	0,31	<b>26,77</b>	0,07	<b>40,22</b>	0,13
0,5	5	25	7	<b>43,57</b>	0,01	<b>29,75</b>	0,02	<b>44,77</b>	0,10
0,5	5	25	21	<b>41,89</b>	0,02	<b>30,50</b>	0,06	<b>45,09</b>	0,14

Tableau 19 Mesure colorimétrique moyenne des bocaux de 1,5L de l'expérimentation n°1

Vol.	Sel	T°	Temps	L*	Ecart-type	a*	Ecart-type	b*	Ecart-type
1,5	1	18	0	<b>46,65</b>	0,01	<b>25,22</b>	0,03	<b>41,07</b>	0,29
1,5	1	18	7	<b>43,92</b>	0,34	<b>30,65</b>	0,27	<b>41,94</b>	1,15
1,5	1	18	21	<b>47,94</b>	0,12	<b>16,94</b>	0,22	<b>32,95</b>	0,10
1,5	5	18	0	<b>43,12</b>	0,07	<b>36,78</b>	0,01	<b>52,43</b>	0,03
1,5	5	18	7	<b>42,10</b>	0,04	<b>30,16</b>	0,06	<b>43,42</b>	0,18
1,5	5	18	21	<b>41,16</b>	0,08	<b>30,82</b>	0,05	<b>46,92</b>	0,12
1,5	1	25	0	<b>43,28</b>	0,03	<b>34,09</b>	0,03	<b>47,51</b>	0,14
1,5	1	25	7	<b>42,65</b>	0,02	<b>37,42</b>	0,10	<b>48,95</b>	0,01
1,5	1	25	21	<b>43,05</b>	0,04	<b>32,79</b>	0,18	<b>42,87</b>	0,56
1,5	5	25	0	<b>41,29</b>	0,08	<b>32,20</b>	0,42	<b>44,34</b>	1,46
1,5	5	25	7	<b>40,65</b>	0,02	<b>30,88</b>	0,15	<b>46,70</b>	0,39
1,5	5	25	21	<b>41,16</b>	0,04	<b>32,15</b>	0,15	<b>46,91</b>	0,29

En complément, les écarts-type ont été calculés afin de voir si une différence entre les prises de mesures était à signaler ou pas. Dans le cas de la première expérimentation, ces écarts-type restent assez faibles.

### 6.3. Expérimentation n°2

Les figures et tableaux relatifs à la deuxième expérience sont présentés ici. En plus des analyses précédentes (microbiologie, pH et colorimétrie), la viscosité a également été étudiée.

#### 6.3.1. Microbiologie

##### 6.3.1.1. Entérobactéries

Le tableau 20 montre l'évolution des entérobactéries au cours du temps, selon la température de conservation et le bloc considéré

Tableau 20 Enumération des entérobactéries de l'expérience n°2

Temps	T°	Bloc	Dilution -2	Dilution -3	Dilution -4	UFC/ml	Moyenne
7 jours	4°C	1	>150	>150	1939	19390000	6.521.666,67
7 jours	4°C	2	287	25	<15	25000	
7 jours	4°C	3	193	19	<15	150.000	
7 jours	18°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
7 jours	18°C	2	<15	<15	<15	150.000	
7 jours	18°C	3	<15	<15	<15	150.000	
7 jours	25°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
7 jours	25°C	2	<15	<15	<15	150.000	
7 jours	25°C	3	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	4°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
14 jours	4°C	2	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	4°C	3	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	18°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
14 jours	18°C	2	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	18°C	3	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	25°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
14 jours	25°C	2	<15	<15	<15	150.000	
14 jours	25°C	3	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	4°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
21 jours	4°C	2	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	4°C	3	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	18°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
21 jours	18°C	2	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	18°C	3	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	25°C	1	<15	<15	<15	150.000	150.000
21 jours	25°C	2	<15	<15	<15	150.000	
21 jours	25°C	3	<15	<15	<15	150.000	

Il apparaît clairement que le nombre d'entérobactéries ne varie pas au cours du temps. Il se stabilise même rapidement.

### 6.3.1.2. Lactobactéries

Le dénombrement des LAB est présenté à la figure 14.

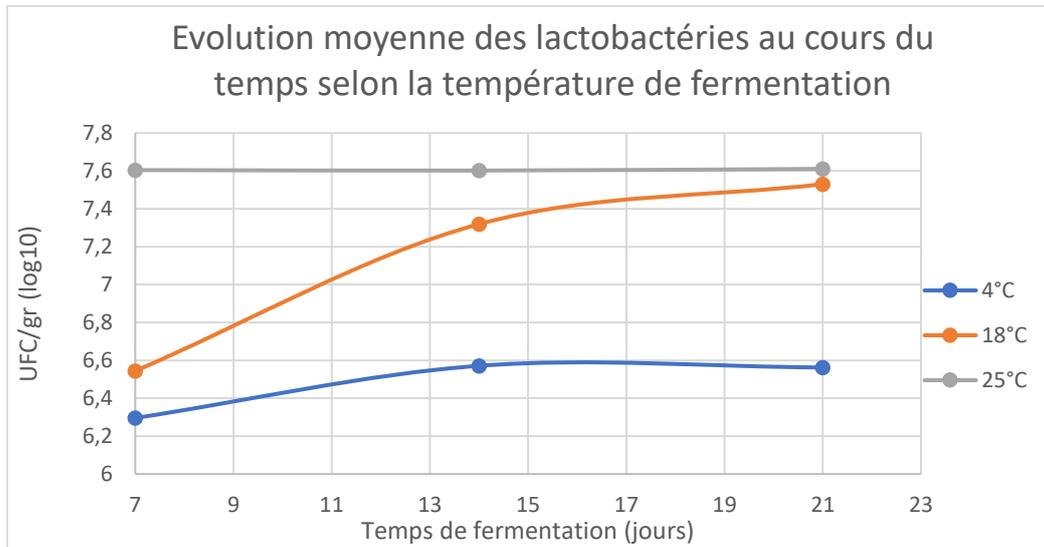


Figure 14 Evolution moyenne des lactobactéries au cours du temps selon la température de fermentation

La variabilité au sein de cette famille de bactéries est plus grande que précédemment. On remarque également un impact plus marqué selon les modalités. Ainsi, la fermentation à 25°C est logiquement plus rapide que celle à 4°C.

### 6.3.2. Acidité

La figure 15 montre l'évolution de l'acidité en fonction de la température de fermentation, sur une période de 21 jours.

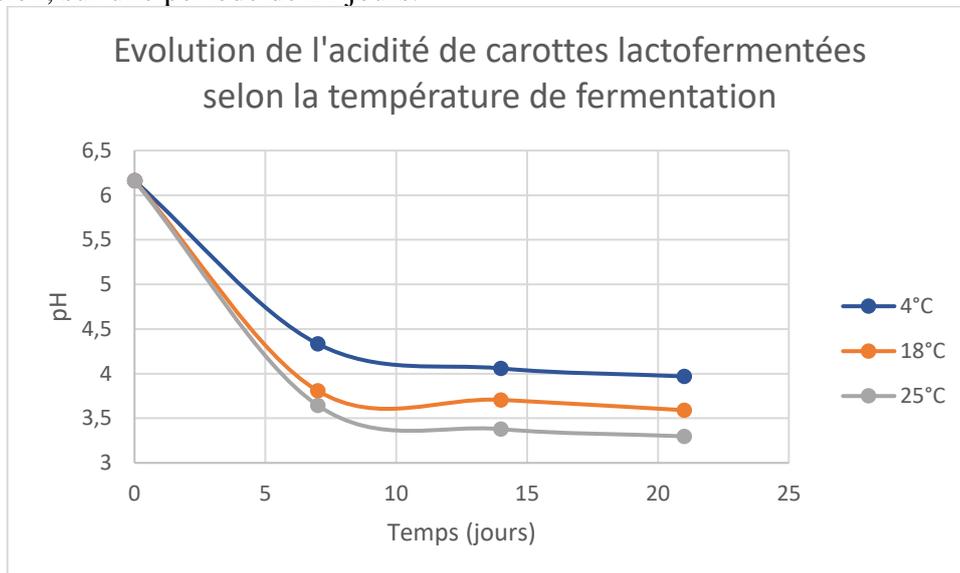


Figure 15 Evolution de l'acidité selon la température de fermentation

On peut aisément remarquer que la température de fermentation joue un rôle non négligeable dans l'acidification du produit. Plus la température est élevée, plus l'acidification est importante et rapide (au sein de la gamme de températures testées).

### 6.3.3. Colorimétrie

Tableau 21 Evolution de la moyenne colorimétrique selon les températures de conservation au cours de la fermentation

Temps (Jours)	T°	L*	Ecart-type	a*	Ecart-type	b*	Ecart-type
7	4	<b>46,67</b>	2,23	<b>32,35</b>	7,77	<b>47,69</b>	6,20
7	18	<b>48,84</b>	4,95	<b>23,03</b>	17,27	<b>33,94</b>	10,74
7	25	<b>45,02</b>	0,91	<b>34,06</b>	1,67	<b>42,76</b>	5,23
14	4	<b>46,85</b>	6,33	<b>22,70</b>	11,68	<b>36,87</b>	9,10
14	18	<b>49,88</b>	5,51	<b>18,95</b>	13,50	<b>33,48</b>	11,00
14	25	<b>44,24</b>	0,97	<b>30,62</b>	3,75	<b>41,19</b>	5,08
21	4	<b>45,59</b>	4,02	<b>24,22</b>	9,10	<b>38,21</b>	6,75
21	18	<b>45,27</b>	2,80	<b>28,09</b>	8,02	<b>39,00</b>	6,46
21	25	<b>42,97</b>	1,70	<b>31,76</b>	5,68	<b>41,29</b>	5,60

L'évolution de la colorimétrie n'est que très peu impactée par la fermentation, comme le montre le tableau 21, même si l'écart-type trahit une certaine variabilité entre les prises de mesures (notamment pour les paramètres a\* et b\* qui varient visiblement davantage).

### 6.3.4. Viscosité

Enfin, les figures 16 et 17 reprennent l'évolution de la contrainte de cisaillement ainsi que de la viscosité selon le temps et la température de fermentation

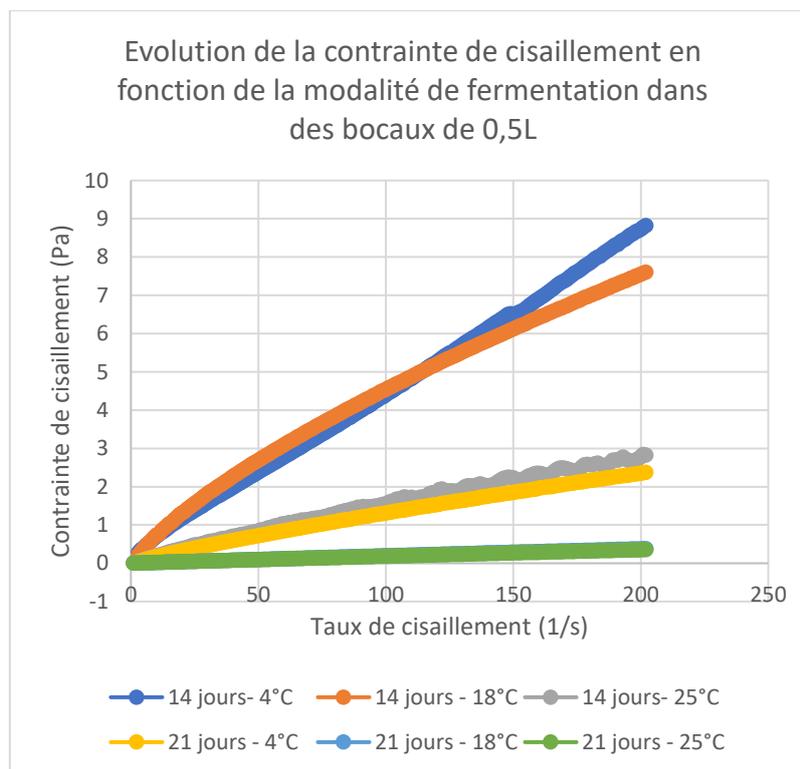


Figure 16 Évolution de la contrainte de cisaillement en fonction de la modalité de fermentation

La figure 16 représente l'évolution de la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement. Trois tendances s'en dégagent. La première montre un taux de cisaillement plus important (pour les modalités 14 jours à 4°C et 18°C). Les deux autres présentent un taux plus faible (lorsque le temps de fermentation augmente).

Ainsi, plus le temps de fermentation est faible avec une température basse, plus la contrainte est forte. C'est, par exemple, le cas de la modalité « 14 jours-4°C » qui affiche la contrainte la plus élevée. On remarque aussi que les deux dernières modalités possèdent des contraintes beaucoup plus faibles et, de surcroît, identiques (ce qui implique une superposition des courbes associées à ces modalités).

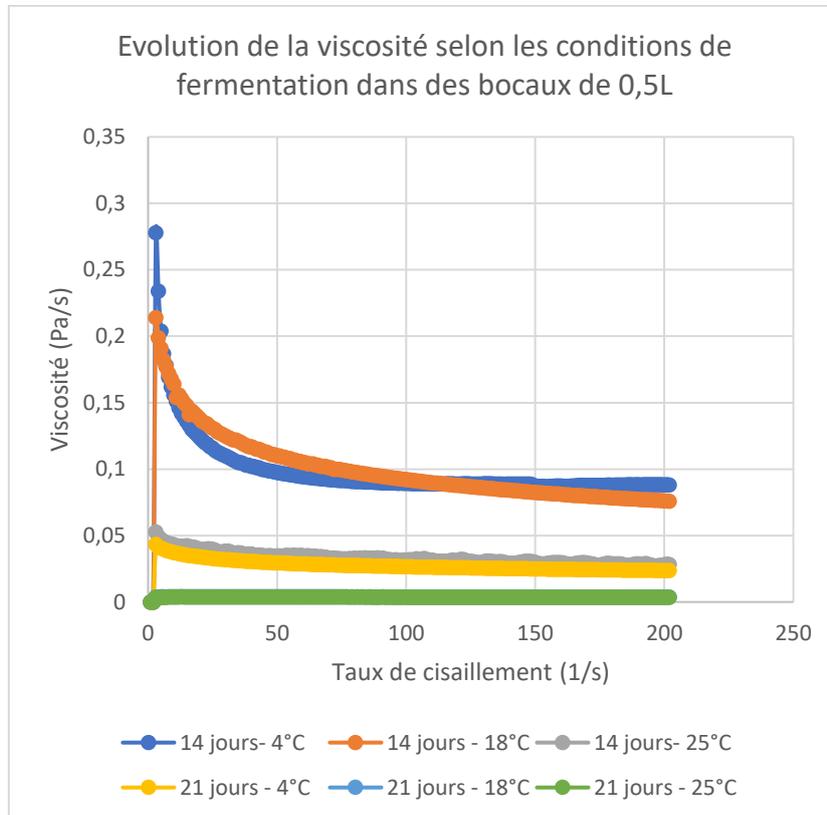


Figure 17 Évolution de la viscosité en fonction de la modalité de fermentation

La viscosité en figure 17 montre les mêmes tendances que celles visibles dans la figure 15, à savoir que plus le temps et la température [de fermentation] sont faibles plus la viscosité est élevée. De même, à la figure 15, les deux dernières modalités se superposent, étant donné que la viscosité mesurée est identique. On constate aussi que la viscosité tend à diminuer avec le taux de cisaillement appliqué, excepté pour les deux dernières modalités qui restent constantes au cours de l'analyse.

## 6.4. Test de vieillissement

Les résultats du test de vieillissement sont repris ici. Les analyses portent sur la microbiologie, le pH, la colorimétrie ainsi que sur l'analyse des sucres et acides organiques.

### 6.4.1. Microbiologie

#### 6.4.1.1. Entérobactéries

Tableau 22 Dénombrement des entérobactéries lors du test de vieillissement

Salinité (%)	Température de conservation	Temps de conservation	-2	-3	-4	UFC/ml
1	4	0	<15	<15	<15	150000
1	25	0	<15	<15	<15	150000
3	4	0	<15	<15	<15	150000
3	25	0	<15	<15	<15	150000
1	4	28	<15	<15	<15	150000
1	25	28	<15	<15	<15	150000
3	4	28	<15	<15	<15	150000
3	25	28	<15	<15	<15	150000
1	4	56	<15	<15	<15	150000
1	25	56	<15	<15	<15	150000
3	4	56	<15	<15	<15	150000
3	25	56	<15	<15	<15	150000
1	4	84	<15	<15	<15	150000
1	25	84	<15	<15	<15	150000
3	4	84	<15	<15	<15	150000
3	25	84	<15	<15	<15	150000

Les entérobactéries comptées lors du test de vieillissement sont reprises au tableau 22. Les tendances sont les mêmes que précédemment, à savoir une constance des entérobactéries au cours du temps (pour les modalités testées). On remarque que, dès le début, les entérobactéries n'ont pas été décelées au sein des produits fermentés.

#### 6.4.1.2. Lactobactéries

Le dénombrement des LAB est repris à la figure 18.

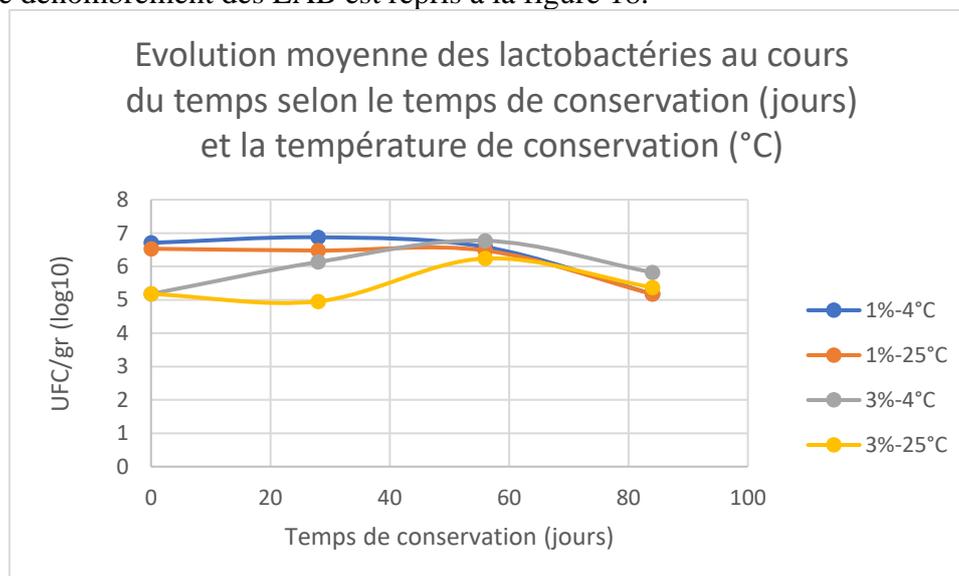


Figure 18 Evolution des lactobactéries selon la salinité et la température de conservation

On constate une augmentation du nombre de lactobactéries lors des premiers jours de conservation et une soudaine diminution en fin de temps de conservation. La croissance en début de conservation est plus lente lorsque la salinité est légèrement plus élevée.

#### 6.4.2. Acidité

L'acidification au cours du temps est reprise à la figure 19

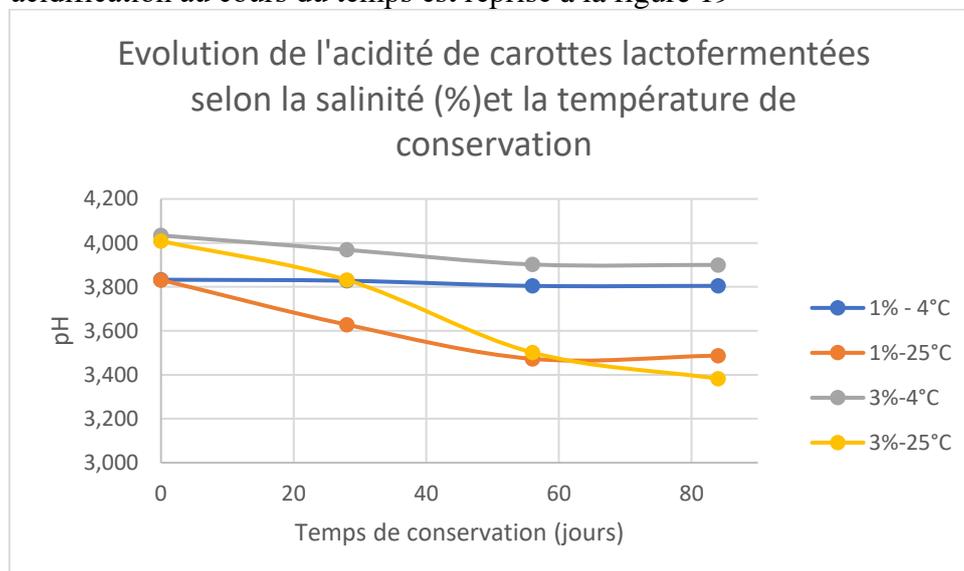


Figure 19 Evolution de l'acidité au cours du temps selon différentes modalités de conservation

Sur la période de temps considérée, les produits conservés à des températures plus faibles ont tendance à avoir un pH légèrement plus élevé que ceux fermentés à 25°C.

#### 6.4.3. Colorimétrie

Tableau 23 Evolution de la moyenne colorimétrique selon la salinité et la température de conservation au cours de la fermentation

% sel	Température	Temps de conservation	L*	ET	a*	ET	b*	ET
1	4	0	<b>44,954</b>	0,015	<b>43,153</b>	0,020	<b>47,727</b>	0,012
		28	<b>48,370</b>	0,143	<b>38,253</b>	0,372	<b>43,870</b>	1,793
		56	<b>47,707</b>	0,143	<b>39,178</b>	0,095	<b>46,491</b>	0,363
		84	<b>44,747</b>	0,015	<b>32,913</b>	0,047	<b>37,133</b>	0,162
1	25	0	<b>48,562</b>	0,460	<b>38,868</b>	0,837	<b>45,562</b>	1,577
		28	<b>47,129</b>	0,562	<b>38,557</b>	0,542	<b>44,861</b>	1,201
		56	<b>46,862</b>	0,703	<b>38,499</b>	0,495	<b>44,968</b>	0,965
		84	<b>43,273</b>	0,152	<b>31,420</b>	0,178	<b>36,757</b>	0,268
3	4	0	<b>48,792</b>	0,544	<b>40,465</b>	0,295	<b>49,192</b>	0,134
		28	<b>47,914</b>	0,347	<b>40,011</b>	0,576	<b>48,107</b>	0,260
		56	<b>47,293</b>	0,261	<b>40,380</b>	0,827	<b>48,873</b>	1,103
		84	<b>46,477</b>	1,082	<b>38,960</b>	0,505	<b>46,829</b>	0,796
3	25	0	<b>48,440</b>	0,061	<b>39,553</b>	0,051	<b>48,370</b>	0,044
		28	<b>46,449</b>	0,807	<b>39,352</b>	0,510	<b>46,669</b>	0,351
		56	<b>46,057</b>	1,194	<b>38,208</b>	0,610	<b>45,264</b>	0,470
		84	<b>46,339</b>	0,280	<b>39,784</b>	0,953	<b>47,623</b>	0,459

Les moyennes colorimétriques (tableau 23) ne montrent qu'une faible variance selon les paramètres. On peut également constater que les écart-types (calculés à partir des différentes prises de mesures) présentent peu de variance. Cela indique que les prises de mesures peuvent être considérées comme constantes entre les bocaux pour un même ensemble de paramètres.

#### 6.4.4. Calcul des concentrations des sucres et acides organiques (par HPLC)

Tableau 24 Evolution des sucres et acides organiques de différents échantillons lors du test de vieillissement

N° d'échantillon	Modalités	Saccharose		Glucose		Fructose		Acide lactique		Acide acétique	
		Absorbance	Concentration (mg/ml)	Absorbance	Concentration (mg/ml)	Absorbance	Concentration (mg/ml)	Absorbance	Concentration (mg/ml)	Absorbance	Concentration (mg/ml)
0	Carotte nature	593503	3,82	227744	1,16	260016	1,39	N.D	/	N.D	/
1	1% - 0 jours de conservation	58650	0,37	66725	0,35	586538	3,11	4993	186,93	1553	0,60
2	3% - 0 jours de conservation	11006	0,07	24600	0,13	342088	1,82	3670	136,94	811	0,31
3	1% - 4°C -28 jours de conservation	1141	0,00	45059	0,24	520261	2,76	4302	160,82	1198	0,46
4	3% - 4°C -28 jours de conservation	56829	0,36	61374	0,32	215385	1,16	1692	62,20	291	0,12
5	1% - 25°C -28 jours de conservation	14974	0,09	4637	0,03	536281	2,85	8740	328,50	1869	0,72
6	3% - 25°C -28 jours de conservation	110299	0,71	154694	0,79	517782	2,75	3784	141,24	825	0,32
7	1% - 4°C -56 jours de conservation	5406	0,03	58231	0,30	488131	92,59	4099	153,15	932	0,36
8	3% - 4°C -56 jours de conservation	47699	0,30	122534	0,63	457823	2,43	3010	112,00	526	0,20
9	1% - 25°C -56 jours de conservation	1354	0,00	69942	0,36	497230	2,64	4223	157,83	602	0,23
10	3% - 25°C -56 jours de conservation	80907	0,52	140235	0,72	434366	2,31	3338	124,39	615	0,24
11	1% - 4°C -84 jours de conservation	N.D.	-0,01	21087	0,12	509922	2,71	4379	163,73	1183	0,46
12	1% - 25°C -84 jours de conservation	15274	0,09	6251	0,04	453834	2,41	8197	307,99	1473	0,57
13	3% - 4°C -84 jours de conservation	52454	0,33	130796	0,67	482137	2,56	3425	127,68	538	0,21
14	3% - 25°C -84 jours de conservation	74945	0,48	56710	0,30	336381	1,79	7724	290,11	922	0,36
	Equation	$x=(y+4152,3)/189\ 918$		$x=(y+1819,1)/198\ 104$		$x=(y+4152,3)/189\ 918$		$x=(y-45,819)/26,466$		$x=(y+10)/2617,1$	

Le tableau 24 reprend l'évolution des sucres dans le temps. Les concentrations obtenues ont été calculées sur base des chromatogrammes et droites d'étalonnages présentés dans les annexes 8 et 9. Les tendances sont une diminution des sucres et une augmentation des acides organiques (notamment de l'acide lactique) au cours du temps.

## 6.5. Analyse sensorielle

### 6.5.1 Caractérisation du jury

La première partie de l'analyse sensorielle reposait sur des questions basées sur les habitudes de consommation générales du jury. Au travers des figures 8 à 14, les tendances de consommations de produits fermentés sont retranscrites à partir d'un jury de 63 personnes, composé de 29 hommes et 34 femmes.

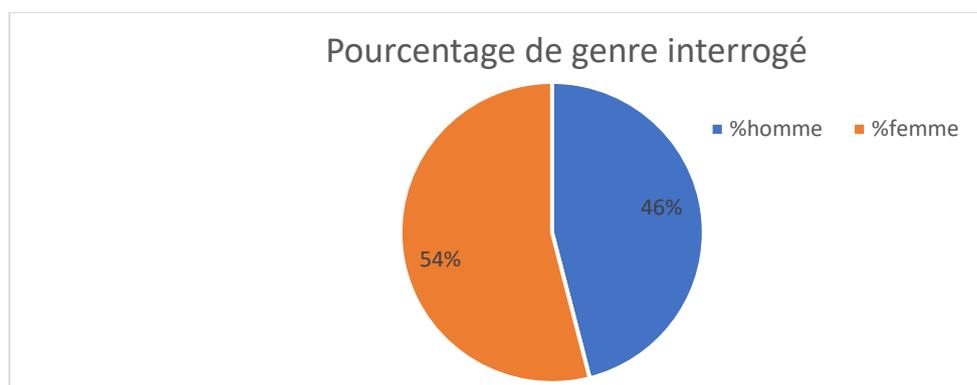


Figure 20 Pourcentage de genre interrogé durant l'analyse sensorielle

La figure 20 reprend simplement le pourcentage de personnes interrogées : 54% (femmes) et 46% (hommes).

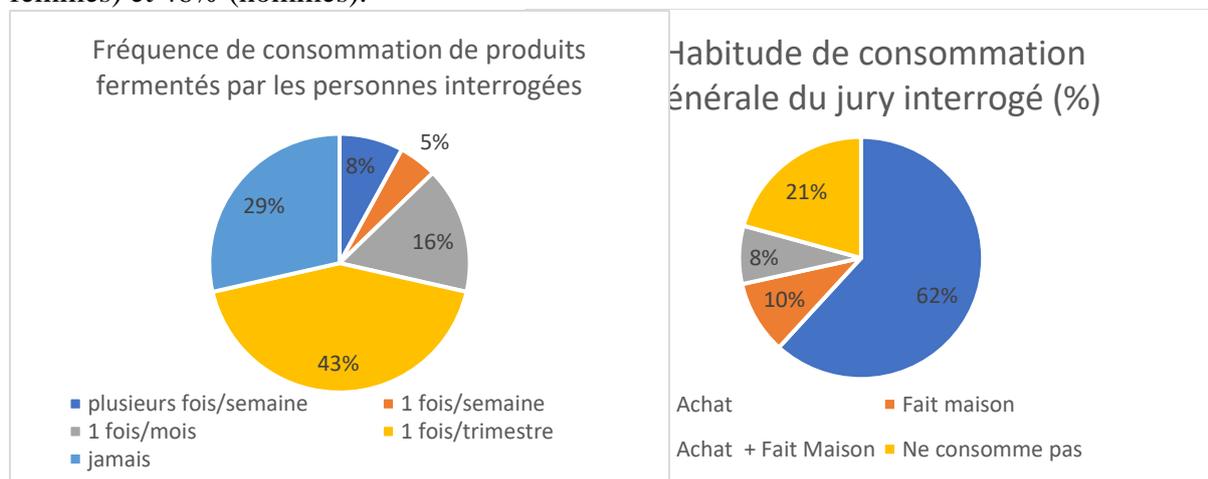


Figure 21 Fréquence de consommation des produits fermentés du jury (%)

Figure 22 Habitudes de consommation du jury (%)

Les figures 21 et 22 informent sur la fréquence et les habitudes de consommations (relatives aux produits fermentés) d'un panel de 63 personnes interrogées. La majorité (43% soit 27 jurés) de ces personnes ne consomment ce type de produits qu'une fois par trimestre et préfère généralement les acheter plutôt que de les réaliser eux-mêmes (à raison de 62% ou 39 jurés). Un faible pourcentage de personnes s'occupe d'en faire régulièrement « maison » et

comble le volume nécessaire par des achats. En dehors de ces tendances, la consommation de produits fermentés est assez peu répandue dans la population. Seuls 13% en consomment régulièrement (1x/semaine, voire plus)

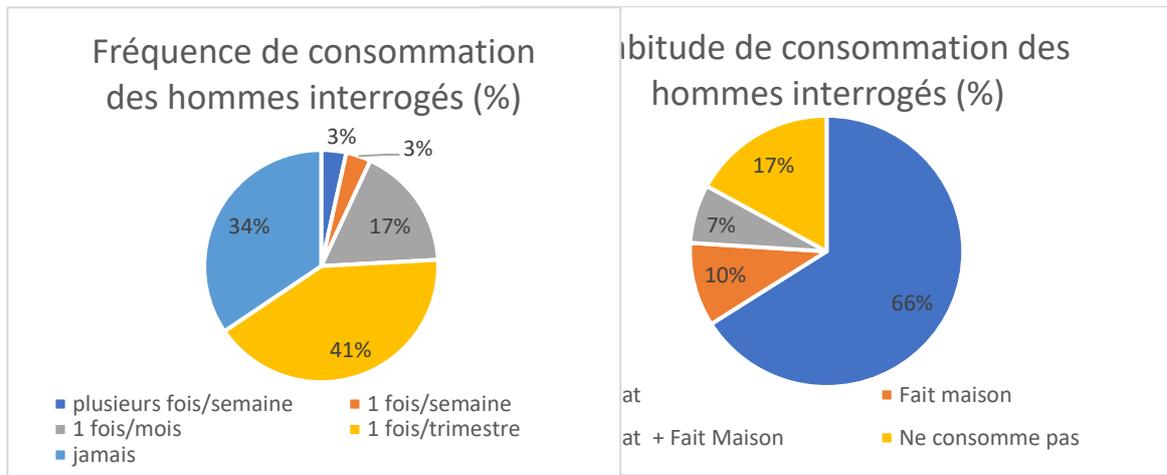


Figure 23 Fréquence de consommation des produits fermentés des hommes interrogés

Les figures 23 et 24 montrent la fréquence de consommation ainsi que les habitudes de consommations des hommes interrogés. Sur les 29 hommes interrogés, l'on constate que 41% ne consomment des produits fermentés qu'une seule fois par trimestre. De plus, l'origine de ces produits émane majoritairement de magasins- (66%) les achètent en magasin. En dehors de cette période, les produits fermentés sont faiblement consommés par les hommes. Tout comme précédemment, une petite portion se charge de réaliser ses produits maison (10%).

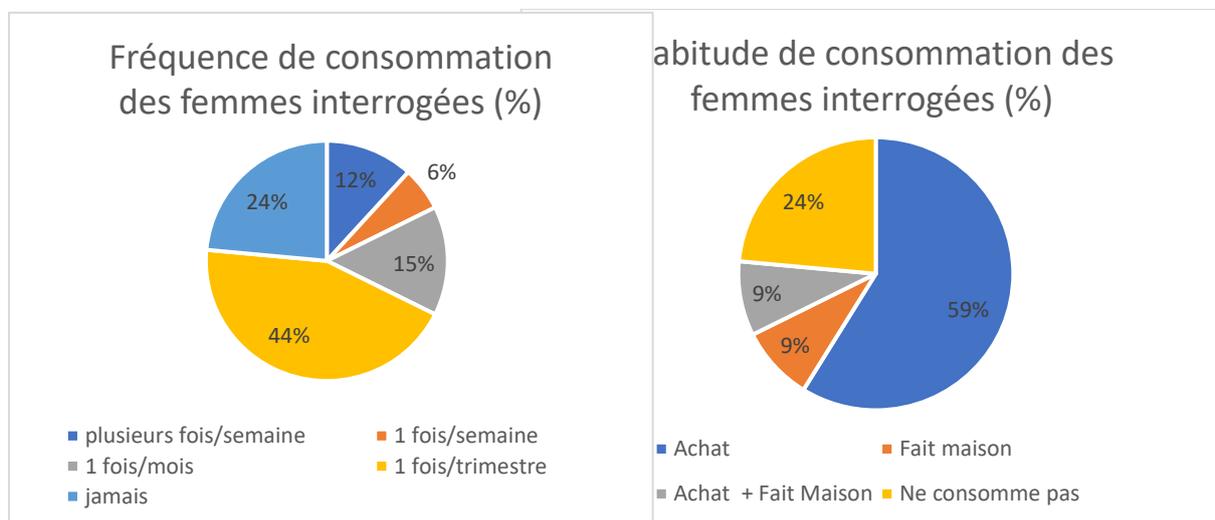


Figure 25 Fréquence de consommation des produits fermentés des femmes interrogées

Les figures 25 et 26 sont relatives à la consommation de produits fermentés par les femmes interrogées. Les tendances restent les mêmes que pour les graphiques précédents. 44% des femmes (15 jurés) ne consomment de tels produits qu'une fois par trimestre. Pour toutes celles qui en consomment, la provenance majeure émane de magasins.

La tendance la plus répandue (parmi celles proposées) est donc une consommation trimestrielle (43%). Seuls 29% consomment ces produits régulièrement. De plus, 62% des jurés ont plutôt l'habitude d'acheter ce genre de produits en magasin. Le pourcentage réalisant des produits faits maison reste assez faible (18%). Ce pourcentage prend également en compte les personnes produisant eux-mêmes une partie de leur consommation qui sera complétée par achat en magasin.

Les proportions obtenues lors de la deuxième analyse sensorielle sont proches des résultats présentés ci-dessus, c'est pourquoi les graphiques ne sont pas présentés dans ce travail.

#### 6.5.2. Test triangulaire

La deuxième partie des analyses est un test triangulaire (échantillons fermentés à 18°C et à 25°C). Le nombre de réponses est repris dans le tableau 25.

Tableau 25 Réponses obtenues lors du test triangulaire (produit fermenté à 18°C – produit fermenté à 25°C)

	Nombre de réponse
Réponses correctes	27
Réponses erronées	36
p-valeur (Résultat de la loi binomiale)	0,073

Comme on le constate, seules 27 personnes ont pu déterminer quel échantillon était différent des deux autres. Cela représente une p-valeur de 0,073 après application de la loi binomiale. La différence majeure soulignée par le panel était le niveau d'acidité du produit à 25°C. Les autres paramètres ont été jugés identiques entre les échantillons, du moins aucune différence majeure n'a été remarquée.

Les tableaux 26 à 28 reprennent les résultats des tests triangulaires de la deuxième analyse sensorielle. Comme le montrent les p-valeurs hautement significatives, le jury a réussi à déterminer quel produit était différent. Selon lui, les différences ayant permis de trouver le bon produit étaient l'acidité ainsi que la texture des échantillons

Tableau 26 Réponses du test triangulaire (produit fermenté à 20°C - produit conservé à 4°C)

	Nombre de réponses
Réponses correctes	32
Réponses erronées	28
p-valeur (Résultat de la loi binomiale)	0,001

Tableau 27 Réponses du test triangulaire (produit fermenté à 20°C - produit conservé à 25°C)

	Nombre de réponses
Réponses correctes	51
Réponses erronées	9
p-valeur (Résultat loi binomiale)	<0,0001

Tableau 28 Réponses du test triangulaire (produit conservé à 25°C - produit conservé à 4°C)

	Nombre de réponses
Réponses correctes	48
Réponses erronées	12
p-valeur (Résultat de la loi binomiale)	<0,0001

### 6.5.3. Evaluation des produits

La dernière partie de l'analyse sensorielle était une évaluation et une comparaison des deux échantillons à l'aveugle (les jurés ne connaissaient pas l'ordre de dégustation). Le pourcentage à l'aveugle pour chaque produit est donné à la figure 27.

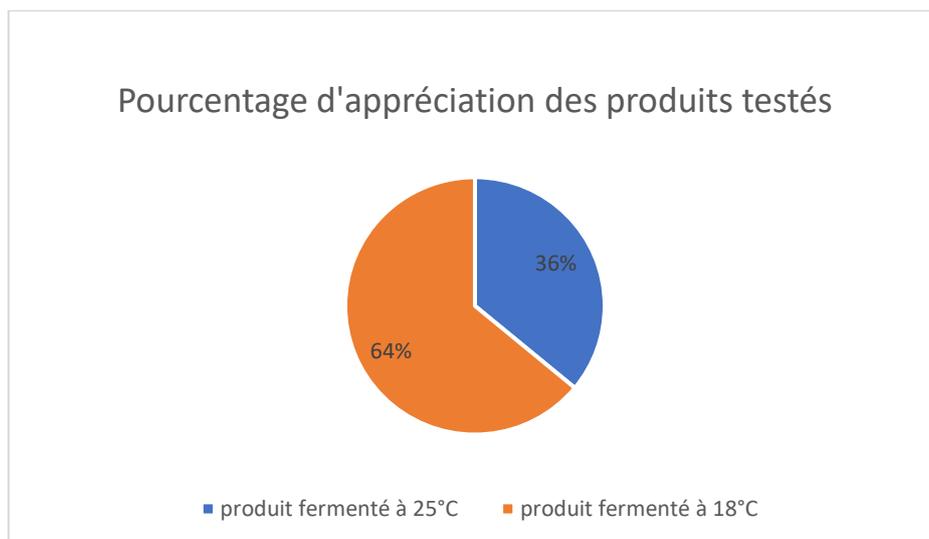


Figure 27 Préférence de produits lors de la première analyse sensorielle (% de personnes)

La raison principale évoquée par les participants est le niveau d'acidité. Les personnes préférant le produit fermenté à 18°C trouvaient que la fermentation à 25°C apportait une acidité trop importante, ce qui les empêchait d'apprécier correctement le produit.

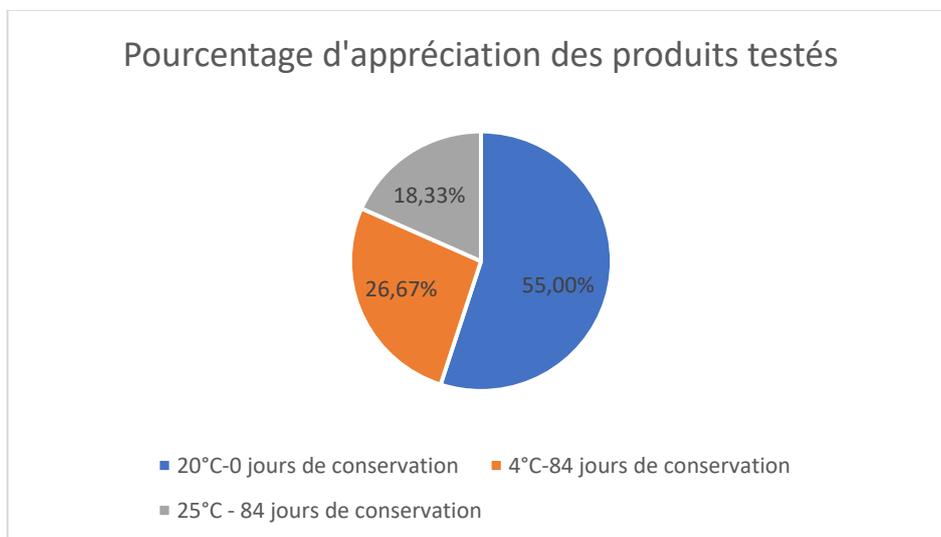


Figure 28 Préférence de produits lors de la deuxième analyse sensorielle (% de personnes)

La figure 28 montre clairement que le jury de la deuxième analyse sensorielle a une préférence marquée (55%) pour le produit qui n'a pas été conservé (mais uniquement fermenté). Arrivent ensuite le produit conservé au frigo (26,67%) et le produit conservé à 25°C (18,33%). La raison principale est ici encore, l'acidité du produit, trop élevée, lorsqu'il est conservé à 25°C.

## 7. Discussion

Au cours de ce travail, plusieurs paramètres de fermentation lactique ont été testés afin de voir leur impact sur les caractéristiques du produit ainsi que sur la durée de conservation.

Les premiers résultats obtenus corroborent les observations présentées dans la littérature, à savoir une diminution des entérobactéries au profit des bactéries lactiques (figure 5-10, 14, tableau 20). Cette croissance des LAB est également corrélée à une diminution de pH, comme montré dans les figures 11-13,15. En ce qui concerne l'évolution des sucres et acides organiques, les chromatogrammes permettent de la suivre. Ici encore, les résultats concordent avec la littérature. Le saccharose est d'abord clivé en glucose et en fructose, avant d'être fermenté par les LAB dans le but d'obtenir de l'acide lactique, comme démontré dans le tableau 25. Les acides organiques seront de plus en plus présents tandis que les sucres auront tendance à disparaître.

L'analyse statistique révèle que dans les trois expérimentations le pH est principalement influencé par le temps et la température. Les LAB, quant à elles, sont surtout influencées par le temps, la température (et le sel, dans la première expérience). Les deux autres essais ne révèlent pas d'influence significative des paramètres sur leur croissance. Les facteurs les plus importants à suivre lors de la fermentation sont donc le temps et la température. Le sel et le volume n'ont pas d'impact significatif sur la fermentation.

Pour les valeurs obtenues, une certaine variabilité peut être remarquée sur les différents graphiques et tableaux, notamment en début de temps de conservation. Les produits fermentés étant des produits « vivants » et les échantillons analysés différents à chaque analyse, cette variabilité peut s'expliquer en partie de la sorte. Au cours des expérimentations, quelques résultats semblent cependant aberrants. Dans la figure 9, par exemple, les résultats montrent que les lactobactéries diminuent grandement lorsqu'elles sont soumises à des salinités et des températures plus élevées (dans ce cas-ci : 5% de sel - 25°C – 0,5L). Or, on constate une croissance beaucoup plus marquée dans un volume plus important. De plus, l'acidité mesurée du bocal se situe tout de même dans la gamme des valeurs attendues (aux alentours de 3,5). Il y a donc bien eu développement de bactéries acidifiantes sur la période considérée. La figure 18 montre elle aussi des résultats aberrants. En effet, les lactobactéries diminuent drastiquement après environ 40 jours. Afin de confirmer ces résultats, une analyse a été faite à nouveau avec des bocaux (fermés) à 84 jours de conservation. Les résultats obtenus ont été semblables. Il y a donc peu de chance que la méthode soit responsable de ce décrochage. Une autre cause en est vraisemblablement responsable : la mortalité serait due à l'acidité trop importante, même pour les lactobactéries [92].

Pour ce qui est de la méthode utilisée, elle pourrait être améliorée en vue d'une expérimentation future, notamment en microbiologie. Dans ce cas-ci, quatre dilutions ont été ensemencées afin de dénombrer les familles microbiologiques choisies. Cependant, cette dilution peut parfois se montrer insuffisante pour un dénombrement plus précis (notamment lorsque la fermentation est plus importante). Pour ce travail, les dénombrements ont été approximés via la moyenne de « quelques carrés » de Petrifilm. Malheureusement, cela reste une moyenne (même si cela suffit ici) et non un dénombrement très précis.

Si les moyens le permettent, le recours à un laboratoire externe peut également être une solution à ce problème. Cela permettra un dénombrement précis ainsi qu'un certain gain de temps, mais le coût de cette alternative sera vraisemblablement plus élevé.

L'analyse rhéologique a aussi été réalisée afin d'évaluer l'évolution de la viscosité au cours du temps. Les figures 15 et 16 montrent que la viscosité est inversement proportionnelle au temps et à la température. Plus la fermentation est longue et à température élevée, moins la viscosité sera grande.

La raison principale serait la présence d'exopolysaccharides dans le milieu. Ces glucides sont obtenus après polymérisation du saccharose existant dans les matières premières [86]. Cette polymérisation est la conséquence du métabolisme de certaines LAB, telle que *Weissella spp* ainsi que *Pediococcus spp* [86]. Ces bactéries se développent surtout en début de fermentation. Elles ont ensuite tendance à disparaître, notamment suite à l'acidification trop importante. Leur disparition s'accompagnera de l'installation de nouvelles bactéries lactiques avec d'autres propriétés et métabolismes [87]. Ce métabolisme est caractérisé par la synthèse de diverses enzymes permettant de cliver les exopolysaccharides, enzymes qui peuvent, par exemple, être des  $\beta$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-glucuronidase, dextranase, ... [87].

Étant donné que la viscosité est le résultat de la production d'exopolysaccharides par certaines LAB, ce paramètre variera avec le type de matières premières utilisées. Les raisons en sont le type (ainsi que la richesse) d'EPS présent, mais également la composition intrinsèque de la flore lactique des différents aliments qui peuvent être fermentés.

La viscosité aura donc tendance à diminuer avec la température ainsi qu'avec la nouvelle flore lactique [87, 88]. Les LAB nouvellement arrivées auront la possibilité de produire des enzymes (citées plus haut) pouvant cliver les exopolysaccharides et ainsi diminuer la viscosité du produit [88].

Durant ce travail, les mesures et analyses ont porté sur des carottes avec différents taux de sel. Cependant, les recettes se diversifient et se complexifient en fonction des producteurs. Ceci peut considérablement changer la dynamique de développement du produit, notamment avec l'utilisation de matières premières différentes et l'ajout d'épices supplémentaires.

La littérature renseigne des recherches similaires aux expérimentations testées [84]. Par exemple, Zhen (2020) a prouvé, dans son article traitant de l'effet de la température sur les produits fermentés, que la température idéale pour l'acidification était de 20°C (obtenu après 15 jours), au lieu de 25°C comme obtenu dans ce travail. Les résultats obtenus sont donc légèrement différents de ceux présentés ici. Cela peut s'expliquer par les conditions mises en œuvre dans chaque expérience. Les différences majeures entre les expérimentations sont le volume (5L), le pourcentage de sel (6%) et le légume préparé (le chou, sous forme suancai). La raison principale impliquant ce changement serait vraisemblablement le légume utilisé. En effet, le chou montre une meilleure tendance à l'acidification [85] comparé à la carotte.

Notons cependant que la différence entre les pH obtenus demeure très faible et est d'environ 3.5 dans les deux expérimentations. Les deux produits sont donc fiables pour la consommation.

L'acidification est en effet un paramètre important à suivre, étant donné qu'elle assure la sécurité du produit. La valeur critique du pH doit être de 4.4 afin d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes telles que *Clostridium botulinum* et *Listeria monocytogenes*.

Cependant, comme on peut le constater dans le point 2.4 (*Aspect législatif*), l'AFSCA ne considère pas ce paramètre comme CCP. Selon l'agence, le risque majeur provient de la température des matières premières réfrigérées, ce qui causerait un risque microbiologique. Or les produits travaillés dans ce cas-ci ne sont pas réfrigérés et de ce fait ce CCP n'a que peu d'intérêt. Le pH est donc la seule mesure permettant d'assurer la sécurité des produits testés ici. Il est donc primordial pour les producteurs de suivre l'acidification lors de leurs procédés de fabrication afin d'assurer la sécurité de leurs produits.

Dans les faits, tous les producteurs interrogés sont conscients de l'importance de l'acidification de leurs produits et mesurent ce pH régulièrement. Cette mesure se fait généralement sur un bocal test, afin de ne pas ouvrir ceux réservés au commerce, évitant ainsi la contamination de toute la production.

Pour les normes microbiologiques, les produits fermentés ne sont pas repris dans la liste du règlement CE 2073/2005. Les producteurs peuvent alors se baser sur le tableau reprenant les critères réglementaires et les limites d'action d'un plus grand nombre de produits [90]. Il y est spécifié que les bactéries à dénombrer sont les bactéries anaérobies sulfite-réductrices (dont est issue la famille des *Clostridium* [91]) ainsi que les staphylococcus à coagulase positive, à raison de maximum 1000 UFC/gr. *Listeria monocytogenes* y est aussi référencée pour une recherche dans 25 grammes. Pour des raisons économiques, ces analyses ne sont pas faites systématiquement sur chaque lot, mais uniquement sur quelques productions de l'année. La raison en est la même que précédemment : si le pH est suffisamment bas, le produit est sûr.

D'autre part, les analyses sensorielles menées révèlent que le consommateur lambda préfère un goût plus « sucré » et est plus réticent face aux produits acides. Il y a donc une légère contradiction entre la volonté du consommateur et les recommandations légales de ce genre de produits. Pour essayer de concilier les deux, les producteurs recommandent souvent de conserver ces produits au frigo. De cette manière, la fermentation est ralentie et l'acidité, moins marquée au fil du temps. Cependant, l'analyse sensorielle a également révélé que les produits mis au frigo ont tendance à trop se ramollir pour le consommateur. Néanmoins, les produits proposés aux juges n'étaient que des carottes fermentées légèrement salées. Ce type de produit n'a pas pour vocation d'être consommé en l'état, mais plutôt en accompagnement dans l'assiette. Le goût « acide » pourrait donc être neutralisé (ou atténué) en choisissant un accompagnement adéquat.

L'utilité de ces informations pour les producteurs est multiple. Premièrement, en ce qui regarde le goût, le grand public n'est pas amateur de produits « acides ». Cette acidification est, cependant, nécessaire tout du moins jusqu'à un certain point. Il y a donc lieu de trouver le juste milieu entre le goût et la sécurité du produit. En outre, des producteurs ont remarqué que certains légumes posaient quelques problèmes lors de la fermentation (par exemple, débordement des bocaux). Aucun problème similaire n'a été soulevé avec le produit choisi dans les conditions testées.

Les conditions expérimentales reproduites étaient constantes au cours du temps. Cependant, la conservation chez le consommateur peut subir des variations (suite aux changements de température au cours de la journée). Une expérience reprenant des variations de températures peut être pensée afin de comparer les résultats et voir si une différence significative apparaît dans la conservation. En parallèle, une étude plus poussée pourrait être menée dans le futur afin d'étudier de manière plus exhaustive la fermentation de plusieurs légumes (ainsi que leur association). Il serait également intéressant de tester des volumes beaucoup plus grands que ceux pris en considération, afin de s'assurer que la fermentation se poursuit convenablement et s'acidifie correctement.

Enfin, le type de fermentation était spontanée et ne requérait pas l'utilisation d'additifs ou d'épices. De tels ajouts sont souvent utilisés par les producteurs, afin d'apporter de nouvelles touches de saveurs, en plus de contrôler la fermentation [93]. Par exemple, certaines recherches montrent en effet que l'ajout de  $MgSO_4$  et de  $MnSO_4$  aboutit à une fermentation plus prononcée. La conséquence directe sera un produit plus acide qu'à l'accoutumée [93]. A l'inverse, certains producteurs interrogés utilisent des épices dans le but de ralentir la fermentation et atténuer les saveurs acides.

## 8. Conclusion

L'objet de ce travail est de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la fermentation, afin de permettre aux producteurs de mieux aborder leurs procédés de fabrication. Pour ce faire, trois expérimentations ont été menées.

La première se concentre sur un effet volume potentiel, associé à une salinité et une température de conservation. Les résultats statistiques ont montré que les seules modalités significatives étaient le temps et la température. Les volumes testés n'impactent donc pas la fermentation.

La deuxième expérimentation compare plusieurs températures afin de déterminer quelle est la plus performante. Après comparaison avec la littérature, la température idéale se situe aux alentours de 20°C, ce qui est logique pour le cas des lactobactéries. De plus, il faut noter que la mise au frigo est susceptible de provoquer un ramollissement de texture (remarqué par le consommateur).

Enfin, le test de vieillissement a permis de suivre l'évolution de produits fermentés sur un laps de temps plus long (84 jours). Au cours de cette période, le produit s'acidifie progressivement. Une décroissance soudaine des lactobactéries a cependant été remarquée après 40 jours environ. La raison principale en serait l'acidité trop élevée du produit. Celle-ci est également ressentie par le consommateur qui apprécie moins ce type de saveur.

Pour le futur, des études sur d'autres aspects de la fermentation peuvent être menées afin de compléter les conclusions déjà connues. Il est possible de se pencher sur d'autres légumes, avec ou sans additifs/épices ainsi que l'ajout (ou non) de starters afin d'étudier plus en détails les interactions entre tous ces éléments. Il est également envisageable d'ajouter des traitements supplémentaires dans ces expériences (comme le traitement thermique en fin de process, par exemple).

En définitive, seuls les temps de conservation ainsi que les températures jouent un rôle majeur dans la fermentation (dans les conditions testées). Le grand public n'est pas encore habitué à ce type de saveur trop acide. Pour ce faire, les habitudes de consommation doivent être revues afin d'incorporer ces aliments dans le régime. Outre le fait qu'elle apporte des saveurs uniques, la fermentation est une source de bienfaits nutritionnels. Cet aspect pourrait être abordé dans une future étude.

## Bibliographie

- [1] Paul Ross R., Morgan S. & Hill C., 2002. Preservation and fermentation: Past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* **79**(1–2), 3–16, DOI:10.1016/S0168-1605(02)00174-5.
- [2] Tamang J.P., Cotter P.D., Endo A., Han N.S., Kort R., Liu S.Q., Mayo B., Westerik N. & Hutkins R., 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **19**(1), 184–217, DOI:10.1111/1541-4337.12520.
- [3] Dimidi E., Cox S., Rossi M. & Whelan K., 2019. Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients* **11**(1806), 1–26.
- [4] Food and Agriculture Organization, 1998. Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective. FAO agricultural services bulletin, 134 Fao Inter-Departmental Working Group, Rome
- [5] Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F. & Kunkee R.E., 1999. Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. Principles and Practices of Winemaking, 102–192 | 10.1007/978-1-4757-6255-6\_4. *Princ. Pract. Winemak.* 102–192.
- [6] Choudhary M., Joshi S., Bhagyawant S.S. & Srivastava N., 2018. Advances in Fermentation Technology: Principle and Their Relevant Applications. *Princ. Appl. Ferment. Technol.* 53–63, DOI: 10.1002/9781119460381.ch4.
- [7] Buckenhueskes H.J., 2015. 22 – *Quality improvement and fermentation control in vegetables*, Advances in Fermented Foods and Beverages, Elsevier Ltd, 515–539.
- [8] Suresh, E. R. (2008). Development of Shelf-Stable Brined Vegetables by Lactic Acid Fermentation. *Journal of Horticultural Sciences*, 3(2), 150-155
- [9] Thierry A., Pogacic T., Weber M. & Lortal S., 2015. Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. *Biotechnol. Lact. Acid Bact. Nov. Appl. Second Ed.* 314–340, DOI:10.1002/9781118868386.ch19.
- [10] Bamforth, C. W., & Cook, D. J., 2019. Food, Fermentation, and Micro-organisms .2e éd. Oxford. Wiley.
- [11] Gregory E.M. & Fridovich I., 1974. Oxygen metabolism in *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* **117**(1), 166–169, DOI:10.1128/jb.117.1.166-169.1974.
- [12] da Silva A.P.R., Longhi D.A., Dalcanton F. & de Aragão G.M.F., 2018. Modelling the growth of lactic acid bacteria at different temperatures. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **61**, 1–11, DOI:10.1590/1678-4324-2018160159.
- [13] Tanguler H., Cankaya A., Agcam E. & Uslu H., 2021. Effect of temperature and production method on some quality parameters of fermented carrot juice (Shalgam). *Food Biosci.* **41**(January), 100973, DOI: 10.1016/j.fbio.2021.100973.

- [14] Szutowaska J., 2020. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. *Eur. Food Res. Technol.* **246**(3), 357–372, DOI:10.1007/s00217-019-03425-7.
- [15] Leroy F. & De Vuyst L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **15**(2), 67–78, DOI:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- [14] Lengkey H.A.W. & Balia R.L., 2014. The effect of starter dosage and fermentation time on pH and lactic acid production. *Biotechnol. Anim. Husb.* **30**(2), 339–347, DOI:10.2298/bah1402339l.
- [16] Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligne B., Kort R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J. & Hutkins R., 2017. ScienceDirect Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond Michael Ga 94–102, DOI: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- [17] T B., 2018. Lactic acid bacteria: their applications in foods. *J. Bacteriol. Mycol. Open Access* **6**(2), 89–94, DOI:10.15406/jbmoa.2018.06.00182.
- [18] Graham K., Rea R., Simpson P. & Stack H., 2019. Enterococcus faecalis milk fermentates display antioxidant properties and inhibitory activity towards key enzymes linked to hypertension and hyperglycaemia. *J. Funct. Foods* **58**(May), 292–300, DOI: 10.1016/j.jff.2019.04.052.
- [20] Gardner N.J., Savard T., Obermeier P., Caldwell G. & Champagne C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures **64**, 261–275.
- [21] Medina-Pradas E., Pérez-Díaz I.M., Garrido-Fernández A. & Arroyo-López F.N., 2017. Review of Vegetable Fermentations with Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage. *Microbiol. Qual. Food Foodborne Spoilers* 211–236, DOI:10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1.
- [22] Khalisanni K., 2011. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* **1**(3), 1–13.
- [23] Urbonaviciene D., Viskelis P., Bartkiene E., Juodeikiene G. & Vidmantiene D., 2015. The Use of Lactic Acid Bacteria in the Fermentation of Fruits and Vegetables — Technological and Functional Properties. *Biotechnology* DOI:10.5772/59938.
- [24] Clarke P.H., 1985. Microbial physiology and biotechnology. *Endeavour* **9**(3), 144–148, DOI:10.1016/0160-9327(85)90115-2.
- [25] Cagno R. Di, Filannino P. & Gobbetti M., 2015. Vegetable and Fruit Fermentation by Lactic Acid Bacteria. *Biotechnol. Lact. Acid Bact. Nov. Appl. Second Ed.* 216–230, DOI:10.1002/9781118868386.ch14.
- [26] Bautista-Gallego J., Medina E., Sánchez B., Benítez-Cabello A. & Arroyo-López F.N., 2020. Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites* **71**(2), 1–9, DOI:10.3989/GYA.0344191.

- [27] Montet D., Ray R.C. & Zakhia-Rozis N., 2014. Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. *Microorg. Ferment. Tradit. Foods* (August), 108–140, DOI:10.1201/b17307.
- [28] Moreno-Arribas M.V. & Polo M.C., 2009. Wine chemistry and biochemistry. *Wine Chem. Biochem.* 1–735, DOI:10.1007/978-0-387-74118-5.
- [29] Albergaria H. & Arneborg N., 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**(5), 2035–2046, DOI :10.1007/s00253-015-7255-0.
- [30] Ciani M., Comitini F. & Mannazzu I., 2008. Fermentation. *Encycl. Ecol. Five-Volume Set* 1548–1557, DOI:10.1016/B978-008045405-4.00272-X.
- [31] Zamora F. (2009) Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In: Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds) *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1)
- [32] Eliodório K.P., Cunha G.C. de G. e., Müller C., Lucaroni A.C., Giudici R., Walker G.M., Alves S.L. & Basso T.O., 2019. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Adv. Appl. Microbiol.* **109**, 61–119, DOI: 10.1016/bs.aambs.2019.10.002.
- [33] Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., & Okamoto-Kainuma, A. (2018). *Acetic Acid Bacteria Ecology and Physiology* (Softcover reprint of the original 1<sup>st</sup> ed. 2016 éd.). Springer.
- [34] Steinkraus K.H., 2009. Fermented Foods. *Encycl. Microbiol.* 45–53, DOI:10.1016/B978-012373944-5.00121-8.
- [35] Mamlouk D. & Gullo M., 2013. Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian J. Microbiol.* **53**(4), 377–384, DOI:10.1007/s12088-013-0414-z.
- [36] Demir N., Acar J. & Bahçeci K.S., 2004. Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. *Eur. Food Res. Technol.* **218**(5), 465–468, DOI:10.1007/s00217-004-0883-8.
- [37] Wuyts S., Beeck W. Van & Oerlemans E.F.M., 2018. Crossm Carrot Juice Fermentations as Man-Made Microbial Ecosystems 1–16.
- [38] Katz, S. E. (2012). *Art of Fermentation by Katz, Sandor Ellix [Hardcover]* (1<sup>st</sup> Printing éd.). Vermont, United States of America: ChelsaeGreen,2012.
- [39] Satora P., Skotniczny M., Strnad S. & Piechowicz W., 2021. Chemical composition and sensory quality of sauerkraut produced from different cabbage varieties. *Lwt* **136**(September 2020), DOI : 10.1016/j.lwt.2020.110325.
- [40] Behera S.S., El Sheikha A.F., Hammami R. & Kumar A., 2020. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? *J. Funct. Foods* **70**(December 2019), 103971, DOI: 10.1016/j.jff.2020.103971.

- [41] Xiong T., Li J., Liang F., Wang Y., Guan Q. & Xie M., 2016. Effects of salt concentration on Chinese sauerkraut fermentation. *LWT – Food Sci. Technol.* **69**, 169–174, DOI: 10.1016/j.lwt.2015.12.057.
- [42] Matejčeková Z., Liptáková D., Spodniaková S. & Valík Ľ., 2016. Characterization of the growth of *Lactobacillus plantarum* in milk in dependence on temperature. *Acta Chim. Slovaca* **9**(2), 104–108, DOI:10.1515/acs-2016-0018.
- [43] Lee C.H. & Lee G.I., 2014. *Safety of Food and Beverages: Safety of Regional Specialities – Korean Fermented Foods*, Encyclopedia of Food Safety, Elsevier Ltd., 462–469.
- [44] Mathur H., Beresford T.P. & Cotter P.D., 2020. Health benefits of lactic acid bacteria (Lab) fermentates. *Nutrients* **12**(6), 1–16, DOI :10.3390/nu12061679.
- [45] Şanlıer N., Gökçen B.B. & Sezgin A.C., 2019. Health benefits of fermented foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**(3), 506–527, DOI :10.1080/10408398.2017.1383355.
- [46] Melini F., Melini V., Luziatelli F., Ficca A.G. & Ruzzi M., 2019. Health-promoting components in fermented foods: An up-to-date systematic review. *Nutrients* **11**(5), 1–24, DOI :10.3390/nu11051189.
- [47] Raghuvanshi R., Grayson A.G., Schena I., Amanze O., Suwintono K. & Quinn R.A., 2019. Microbial transformations of organically fermented foods. *Metabolites* **9**(8), DOI:10.3390/metabo9080165.
- [48] Buruleanu L., Nicolescu C.L., Bratu M.G., Manea I. & Avram D., 2010. Study regarding some metabolic features during lactic acid fermentation of vegetable juices. *Rom. Biotechnol. Lett.* **15**(2), 5177–5188.
- [49] Di Cagno R., Coda R., De Angelis M. & Gobbetti M., 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* **33**(1), 1–10, DOI :10.1016/j.fm.2012.09.003.
- [50] Wouters D., Grosu-Tudor S., Zamfir M. & De Vuyst L., 2013. Bacterial community dynamics, lactic acid bacteria species diversity and metabolite kinetics of traditional Romanian vegetable fermentations. *J. Sci. Food Agric.* **93**(4), 749–760, DOI:10.1002/jsfa.5788.
- [51] Yang X., Hu W., Xiu Z., Jiang A., Yang X., Sarengaowa, Ji Y., Guan Y. & Feng K., 2020. Microbial dynamics and volatilome profiles during the fermentation of Chinese northeast sauerkraut by *Leuconostoc mesenteroides* ORC 2 and *Lactobacillus plantarum* HBUAS 51041 under different salt concentrations. *Food Res. Int.* **130**(July 2019), 108926, DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108926.
- [52] Esteban-Torres M., Mancheño J.M., de las Rivas B. & Muñoz R., 2015. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT – Food Sci. Technol.* **60**(1), 246–252, DOI: 10.1016/j.lwt.2014.05.063.

- [53] Klaenhammer T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**(3), 337–349, DOI :10.1016/0300-9084(88)90206-4.
- [54] Alvarez-Sieiro P., Montalbán-López M., Mu D. & Kuipers O.P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**(7), 2939–2951, DOI :10.1007/s00253-016-7343-9.
- [55] Benmouna Z., 2012. Bactériocines des bactéries lactiques : étude biochimique et génétique 132.
- [56] Dortu C. & Thonart P., 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : Caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**(1), 143–154.
- [57] Van Beeck W., Verschueren C., Wuyts S., van den Broek M.F.L., Uyttendaele M. & Lebeer S., 2020. Robustness of fermented carrot juice against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Food Microbiol.* **335**(April), 108854, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108854.
- [58] Gardner N.J., Savard T., Obermeier P., Caldwell G. & Champagne C.P., 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage , beet and onion vegetable mixtures **64**, 261–275.
- [59] Montet D., Ray R.C. & Zakhia-Rozis N., 2014. Lactic acid fermentation of vegetables and fruits. *Microorg. Ferment. Tradit. Foods* (August), 108–140, DOI:10.1201/b17307.
- [60] Snyder A., Breidt F., Andress E.L. & Ingham B.H., 2020. Manufacture of traditionally fermented vegetable products: Best practice for small businesses and retail food establishments. *Food Prot. Trends* **40**(4), 251–263.
- [61] AFSCA – Conseils pour la mise en conserve de ses propres fruits et légumes. (2017, 15 septembre). AFSCA. Consulté le 28 novembre 2021, à l’adresse <https://www.favv-afsca.be/consommateurs/viepratique/conservation/conservedfruitslegumes/#:%7E:text=Dans%20les%20pr%C3%A9parations%20et%20aliments,toutefois%20pas%20de%20la%20neutraliser.>
- [62] Rodríguez J.M., Martínez M.I. & Kok J., 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42**(2), 91–121, DOI:10.1080/10408690290825475.
- [63] Inatsu, Y., M. L. Bari, S. Kawasaki, and K. Isshiki. 2004. “Survival of *Escherichia Coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus Aureus*, and *Listeria Monocytogenes* in Kimchi.” *Journal of Food Protection* **67** (7): 1497–1500. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.7.1497>.
- [64] Hsin-Yi C. & Chou C.C., 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *Int. J. Food Microbiol.* **70**(1–2), 189–195, DOI :10.1016/S0168-1605(01)00538-4.

- [65] AFSCA, Module préparation et transformation des fruits et légumes, 2021. Consultable à l'adresse : [https://www.favv-afsca.be/autocontrole-fr/guides/distribution/generique/documents/2021-01-12G-044\\_module\\_GLfruitsetlegumes\\_v1.pdf](https://www.favv-afsca.be/autocontrole-fr/guides/distribution/generique/documents/2021-01-12G-044_module_GLfruitsetlegumes_v1.pdf)
- [66] RÈGLEMENT (CE) N o 2073/2005 DE LA COMMISSION du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Récupéré de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:32005R2073&from=FR> le 24 août 2021.
- [67] Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (2007). Codex alimentarius : norme pour les fruits et légumes marinés fermentés cxs 260-2007.
- [68] Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (2007). Codex alimentarius : PRINCIPES GÉNÉRAUX D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE CXC 1-1969.
- [69] Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. (2007). CODE D'USAGES EN MATIÈRE D'HYGIÈNE POUR LES CONSERVES NON ACIDIFIÉES OU ACIDIFIÉES, DE PRODUITS ALIMENTAIRES NATURELLEMENT PEU ACIDÉS (CAC/RCP 23-1979).
- [70] Juturu V. & Wu J.C., 2016. Microbial production of lactic acid: the latest development. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**(6), 967–977, DOI:10.3109/07388551.2015.1066305.
- [71] Satora P., Skotniczny M., Strnad S. & Piechowicz W., 2021. Chemical composition and sensory quality of sauerkraut produced from different cabbage varieties. *Lwt* **136**(September 2020), DOI:10.1016/j.lwt.2020.110325.
- [72] Kohajdová Z., Karovičová J. & Greifová M., 2006. Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *J. Food Nutr. Res.* **45**(3), 115–119.
- [73] Thierry A., Pogacic T., Weber M. & Lortal S., 2015. Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods. *Biotechnol. Lact. Acid Bact. Nov. Appl. Second Ed.* 314–340, DOI:10.1002/9781118868386.ch19.
- [74] Hutkins R.W., 2007. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, Microbiology and Technology of Fermented Foods, 1–473.
- [75] Eifert J., Boyer R. & Williams R., 2013. Vegetable Fermentation *J. Food Sci. Technol.* **10**, 1–18.
- [76] Behera S.S., El Sheikha A.F., Hammami R. & Kumar A., 2020. Traditionally fermented pickles: How the microbial diversity associated with their nutritional and health benefits? *J. Funct. Foods* **70**(December 2019), 103971, DOI: 10.1016/j.jff.2020.103971.
- [77] Heng N.C.K., Wescombe P.A., Burton J.P., Jack R.W. & Tagg J.R., 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. *Bacteriocins* 45–92, DOI:10.1007/978-3-540-36604-1\_4.

- [78] Bengoa A.A., Iraporda C., Garrote G.L. & Abraham A.G., 2019. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J. Appl. Microbiol.* **126**(3), 686–700, DOI :10.1111/jam.14107.
- [79] Ninane, V. (2009). Caractérisation du consortium microbien d'un grain de kéfir. Gembloux - Belgique, Faculté Universitaire des Sciences agronomiques, 197.
- [80] Todorov S.D., 2009. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. *Braz. J. Microbiol.* **40**(2), 209–20921, DOI :10.1590/S1517-83822009000200001.
- [81] Vasantha Rupasinghe H.P., Joshi V.K., Smith A. & Parmar I., 2017. *Chemistry of Fruit Wines*, Science and Technology of Fruit Wine Production, Elsevier Inc., 105–176.
- [82] 3M Petrifilm product instructions- enterobacteriaceae count plate test, 2021
- [83] 3M Petrifilm product instructions- lactic acid bacteria count plate test, 2017
- [84] Adamberg K., Kask S., Laht T.M. & Paalme T., 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: A pH-auxostat study. *Int. J. Food Microbiol.* **85**(1–2), 171–183, DOI:10.1016/S0168-1605(02)00537-8.
- [85] Vatansever S., Vegi A., Garden-Robinson J. & Hall III C.A., 2017. The Effect of Fermentation on the Physicochemical Characteristics of Dry-Salted Vegetables. *J. Food Res.* **6**(5), 32, DOI:10.5539/jfr.v6n5p32.
- [86] Rizzello C.G., Coda R., Wang Y., Verni M., Kajala I., Katina K. & Laitila A., 2019. Characterization of indigenous *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc kimchii*, *Weissella cibaria* and *Weissella confusa* for faba bean bioprocessing. *Int. J. Food Microbiol.* **302**(August 2018), 24–34, DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.014.
- [87] Zannini E., Waters D.M., Coffey A. & Arendt E.K., 2016. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**(3), 1121–1135, DOI:10.1007/s00253-015-7172-2.
- [88] Salehi F. Rheological and physicochemical properties of vegetable juices and concentrates: A review. *J Food Process Preserv.* 2021;45:e15326. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15326>
- [89] Ashaolu T.J. & Reale A., 2020. A holistic review on euro-asian lactic acid bacteria fermented cereals and vegetables. *Microorganisms* **8**(8), 1–24, DOI:10.3390/microorganisms8081176.
- [90] AFSCA, 2019. Limites d'action pour les contaminants microbiologiques dans les denrées alimentaires 1–30.
- [91] Valero A., Olague E., Medina-Pradas E., Garrido-Fernández A., Romero-Gil V., Cantalejo M.J., García-Gimeno R.M., Pérez-Rodríguez F., Posada-Izquierdo G.D. & Arroyo-López F.N., 2020. Influence of acid adaptation on the probability of germination of *Clostridium sporogenes* spores against pH, NaCl and time. *Foods* **9**(2), 1–18, DOI:10.3390/foods9020127.

- [92] Nualkaekul S. & Charalampopoulos D., 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *Int. J. Food Microbiol.* **146**(2), 111–117, DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.040.
- [93] Sharma S., 2019. Effect of Addition of Additives on Sequential Culture Lactic Acid Fermentation of Radish. *Int. J. Food Ferment. Technol.* **9**(2), 133–138, DOI:10.30954/2277-9396.02.2019.10.

## Annexes

Annexe 1 : Questions posées aux producteurs .....	61
Annexe 2 : Relevé de température .....	61
Annexe 3 : Matériel utilisé .....	63
Annexe 4 : Schéma des expérimentations .....	64
Annexe 5 : Explication du choix des modalités des expérimentations .....	65
Annexe 6 : Interprétation des Petrifilm .....	66
Annexe 7 : Analyse statistique .....	68
Annexe 8 : Chromatogrammes de l'évolution des sucres et acides organiques.....	73
Annexe 9: Droites d'étalonnage HPLC.....	83

### Liste des annexes

ANNEXE 1 CARACTERISTIQUES DE LA T° ENREGISTREE PAR LA SONDE SUR LA DUREE TOTALE DES MESURES .....	61
ANNEXE 2 ECHANTILLON DE 30 MESURES ENREGISTREES SUR LA PERIODE DE MESURE .....	62
ANNEXE 3 SCHEMA DE LA PREMIERE EXPERIENCE MENEES.....	64
ANNEXE 4 SCHEMA DE L'EXPERIENCE N°2 .....	64
ANNEXE 5 SCHEMA DE L'EXPERIMENTATION N° 3 .....	65
ANNEXE 6 ASPECT DES ENTEROBACTERIES (AVEC BULLES DE GAZ) SUR PETRIFILM.....	66
ANNEXE 7 ASPECT DES LACTOBACTERIES (AVEC BULLES DE GAZ) SUR PETRIFILM.....	67
ANNEXE 8 ASPECT DES LACTOBACTERIES (SANS BULLES DE GAZ) SUR PETRIFILM.....	67
ANNEXE 9 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'ACIDITE AU COURS DE LA PREMIERE EXPERIMENTATION .....	68
ANNEXE 10 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DES LACTOBACTERIES AU COURS DE LA PREMIERE EXPERIMENTATION.....	69
ANNEXE 11 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DES ENTEROBACTERIES AU COURS DE LA PREMIERE EXPERIMENTATION.....	69
ANNEXE 12 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'ACIDITE AU COURS DE LA DEUXIEME EXPERIMENTATION.....	70
ANNEXE 13 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DES LACTOBACTERIES AU COURS DE LA DEUXIEME EXPERIMENTATION .....	70
ANNEXE 14 TABLEAU DE CORRELATION ENTRE LE TEMPS, LE PH ET LES LAB DE LA DEUXIEME EXPERIMENTATION.....	71
ANNEXE 15 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'ACIDITE AU COURS DU TEST DE VIEILLISSEMENT.....	72
ANNEXE 16 TABLEAU DE L'ANALYSE DE LA VARIANCE DE L'ACIDITE AU COURS DU TEST DE VIEILLISSEMENT.....	72
ANNEXE 17 TABLEAU DE CORRELATION ENTRE LE TEMPS, LE PH ET LES LAB DU TEST DE VIEILLISSEMENT .....	73
ANNEXE 18 CHROMATOGRAMME DU STANDARD DE SACCHAROSE .....	73
ANNEXE 19 CHROMATOGRAMME DU STANDARD DE FRUCTOSE .....	74
ANNEXE 20 CHROMATOGRAMME DU STANDARD DE L'ACIDE LACTIQUE.....	74
ANNEXE 21 CHROMATOGRAMME DU STANDARD DE L'ACIDE ACETIQUE.....	75
ANNEXE 22 CHROMATOGRAMMES DES SUCRES DANS DES CAROTTES NATURES.....	75
ANNEXE 23 CHROMATOGRAMMES DES ACIDES ORGANIQUES DANS DES CAROTTES NATURES.....	75
ANNEXE 24 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL .....	76
ANNEXE 25 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL .....	76
ANNEXE 26 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL .....	76
ANNEXE 27 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL .....	76
ANNEXE 28 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 28 JOURS..	77
ANNEXE 29 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 28 JOURS.....	77
ANNEXE 30 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 28 JOURS..	77
ANNEXE 31 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 28 JOURS.....	77
ANNEXE 32 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 28 JOURS	78
ANNEXE 33 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 28 JOURS.....	78
ANNEXE 34 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 28 JOURS	78
ANNEXE 35 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 28 JOURS.....	78
ANNEXE 36 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 56 JOURS..	79

ANNEXE 37 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 56 JOURS.....	79
ANNEXE 38 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 56 JOURS..	79
ANNEXE 39 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 56 JOURS.....	79
ANNEXE 40 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 56 JOURS	80
ANNEXE 41 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 56 JOURS.....	80
ANNEXE 42 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 56 JOURS	80
ANNEXE 43 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 56 JOURS.....	80
ANNEXE 44 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 84 JOURS..	81
ANNEXE 45 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 84 JOURS.....	81
ANNEXE 46 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 84 JOURS	81
ANNEXE 47 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 1% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 84 JOURS.....	81
ANNEXE 48 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 4°C PENDANT 84 JOURS..	82
ANNEXE 49 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTES A 3% DE SEL ET CONSERVE A 4°C PENDANT 84 JOURS.....	82
ANNEXE 50 CHROMATOGRAMME DES SUCRES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 84 JOURS	82
ANNEXE 51 CHROMATOGRAMME DES ACIDES ORGANIQUES DE CAROTTES FERMENTEES A 3% DE SEL ET CONSERVEES A 25°C PENDANT 84 JOURS.....	82
ANNEXE 52 AIRE DES PICS SELON LA CONCENTRATION DE SACCHAROSE MESUREE .....	83
ANNEXE 53 DROITE D'ETALONNAGE DU SACCHAROSE .....	83
ANNEXE 54 AIRE DES PICS SELON LA CONCENTRATION DE GLUCOSE MESUREE.....	84
ANNEXE 55 DROITE D'ETALONNAGE DU GLUCOSE.....	84
ANNEXE 56 AIRE DES PICS SELON LA CONCENTRATION DE FRUCTOSE MESUREE .....	84
ANNEXE 57 DROITE D'ETALONNAGE DU FRUCTOSE .....	85
ANNEXE 58 AIRE DES PICS SELON LA CONCENTRATION D'ACIDE LACTIQUE MESUREE.....	85
ANNEXE 59 DROITE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE LACTIQUE.....	85
ANNEXE 60 AIRE DES PICS SELON LA CONCENTRATION D'ACIDE ACETIQUE MESUREE .....	86
ANNEXE 61 DROITE D'ETALONNAGE DE L'ACIDE ACETIQUE .....	86

## Annexe 1 : Questions posées aux producteurs

1. Quels sont les produits lactofermentés vendus par/sur l'exploitation ?
2. Quelle est l'origine des matières premières ?
3. Quelles sont les volumes de productions habituels ?
4. Achetez-vous (ou utilisez-vous) des starters ?
5. Utilisez-vous des mix de matières premières ?
6. Quel est le process suivi pour la lactofermentation ?
7. Les saisons ont-ils un impact significatif sur la production/sur le procédé de lactofermentation ?
8. Quelle est le type d'emballage proposé ainsi que le type de conservation mis en place ?
9. Quelles sont les recommandations de conservation indiquées sur l'emballage ?
10. Quels sont les éléments/paramètres observés et suivis lors de la conservation ?
11. Des problèmes récurrents sont-ils observés lors de cette conservation ? (Changement organoleptiques, développement bactérien non voulu, moisissures, ...) + Autres pistes : pourquoi ces problèmes se présentent-ils ?
12. Avez-vous déjà essayé de résoudre ce problème ?
13. Seriez-vous intéressé par des recherches/améliorations sur le sujet ?
14. Réalisez-vous des analyses sur vos produits ? Lesquelles ? (pH ?) A quelle fréquence ?

## Annexe 2 : Relevé de température

La température ambiante a été relevée à l'aide d'une sonde thermique, à raison d'une mesure par heure pendant 18 jours (du 16 août 2021 au 03 septembre 2021) soit un total de 438 mesures. Les tableaux ci-dessous présentent respectivement quelques tendances enregistrées par la sonde sur un échantillon de 30 mesures enregistrées.

Nombre de mesures	438
T° Moyenne	21,29
T° maximale enregistrée	24,5
T° minimale enregistrée	19

*Annexe 1 Caractéristiques de la T° enregistrée par la sonde sur la durée totale des mesures*

Date	Heure	T° mesurée
20-08-21	11:00:01	23
20-08-21	12:00:01	22
20-08-21	13:00:01	21,5
20-08-21	14:00:01	22
20-08-21	15:00:01	22
20-08-21	16:00:01	22
20-08-21	17:00:01	22
20-08-21	18:00:01	22
20-08-21	19:00:01	22
20-08-21	20:00:01	22
20-08-21	21:00:01	21,5
20-08-21	22:00:01	21,5
20-08-21	23:00:01	21,5
21-08-21	00:00:01	21,5

21-08-21	01:00:01	21,5
21-08-21	02:00:01	21
21-08-21	03:00:01	21
21-08-21	04:00:01	21
21-08-21	05:00:01	21
21-08-21	06:00:01	20,5
21-08-21	07:00:01	20,5
21-08-21	08:00:01	20,5
21-08-21	09:00:01	21
21-08-21	10:00:01	21,5
21-08-21	11:00:01	22
21-08-21	12:00:01	22,5
21-08-21	13:00:01	23
21-08-21	14:00:01	23
21-08-21	15:00:01	23,5
21-08-21	16:00:01	23,5

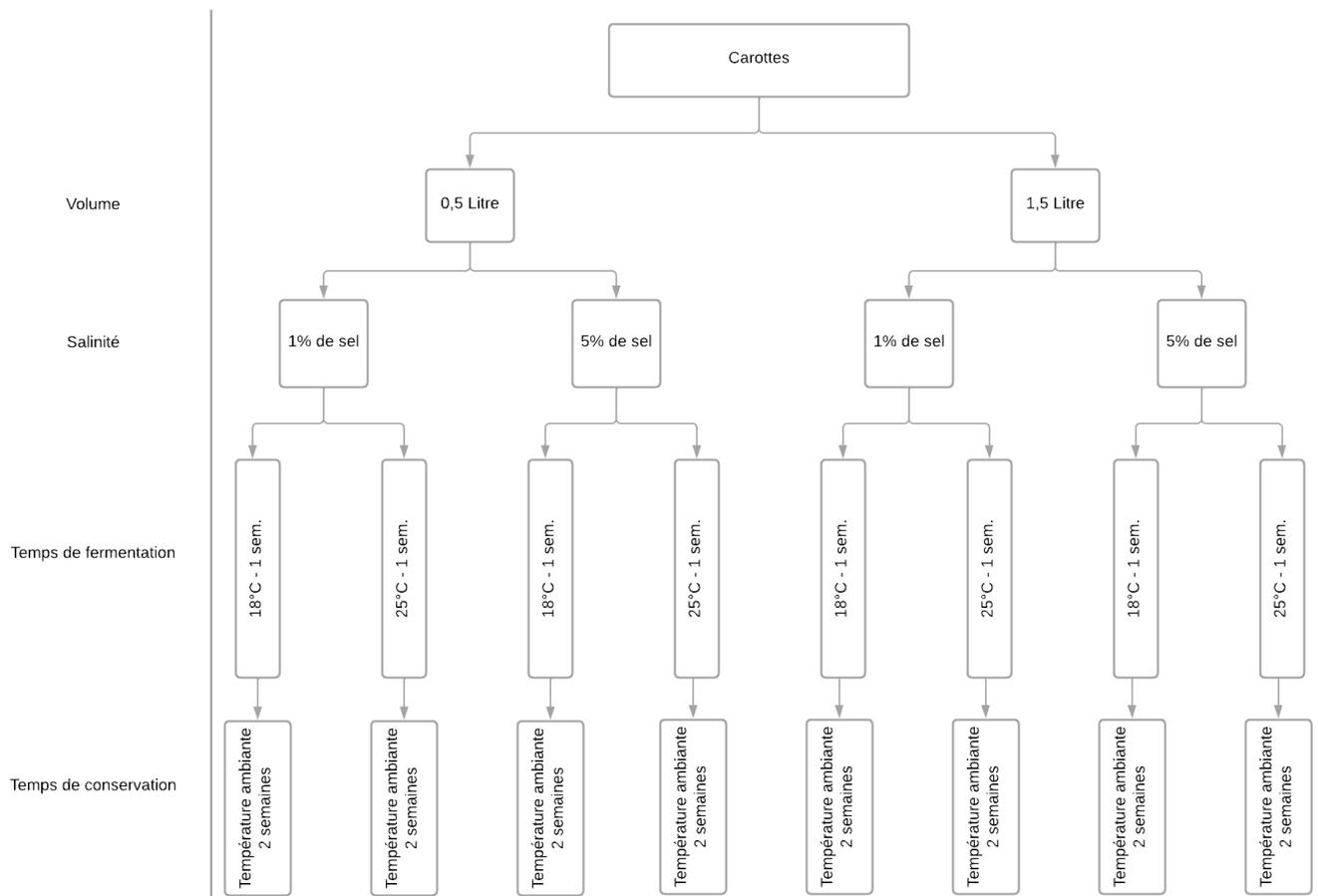
*Annexe 2 Echantillon de 30 mesures enregistrées sur la période de mesure*

Annexe 3 : Matériel utilisé

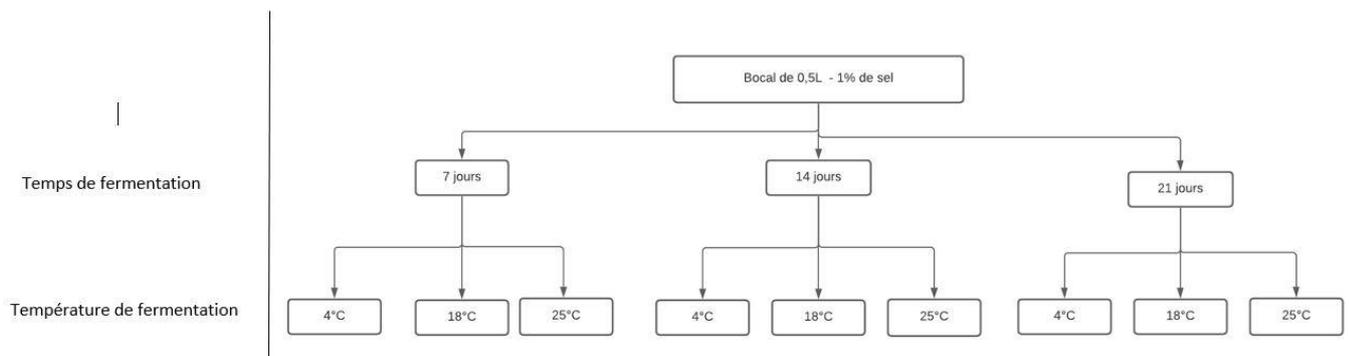
<b>Matériel</b>	<b>Caractéristique</b>	<b>Quantités</b>	<b>Marque</b>
Carottes	Néerlandaise, biologique	106 kg	Boni
Sel	Gros grain, non raffiné	3960 gr	MarSel
Eau	En bouteille de 1,5L	9L	Everyday
Bocaux	En verre + hermétique Volume : 0,5 et 1,5L	32 bocaux de 0,5L 32 bocaux de 1,5L	LeParfait
Petrifilm « LAB »	Fourni par LED Techno	444	3M
Petrifilm « Enterobactéries »	Fourni par LED Techno	444	3M

<b>Matériel</b>	<b>Caractéristique</b>	<b>Marque</b>
Râpe	Grosseur coupe : 5 ml	Moulinex « Fresh Express Max » Robo coupe 50 CL-ultra,
Balance		Mettler PJ3000
Incubateur		25°C : Memmert Ine 600 18°C : La sommelière
Sac stomacher	Volume : 4000ml Présence d'un filtre latéral	VWR
Stomacher		Lab-blender 400
pH-mètre		WTW pH 340i
Solution tampon 7.00	Potassium dihydrogénophosphate	Merck Millipore
Solution tampon 4.10	Phtalate	VWR Chemicals
Centrifugeuse	4000 RPM – 5 minutes	Thermoscientific labofuge 200
Colorimètre		Colorflex ez
Tuiles de calibrage	X :84.72 /Y :89.87/ Z :95.68	
Viscosimètre	Tête conique « CP50-1 »	Anton-paar MCR302
HPLC		Agilent technologies « 1260 infinity »
Colonne HPLC	HPX-87H ion exclusion column	Biorad
Seringue	Volume : 5 ml	Henke-Ject
Filtres à seringues	Taille filtre :0,45µm	ROCC
Saccharose	ACS reagent	Sigma-aldrich
Fructose	D-fructose	VWR life science
Glucose	Anhydre, 96%, alpha-D- glucose	Aldrich chemistry,
Acide lactique	Galacid excel-lactic acid 88%	Galactic
Acide acétique	Acetic acid 33%	Prolabo VWR
NaCl	>=99,5%	Fischer Chemical Sodium Chloride

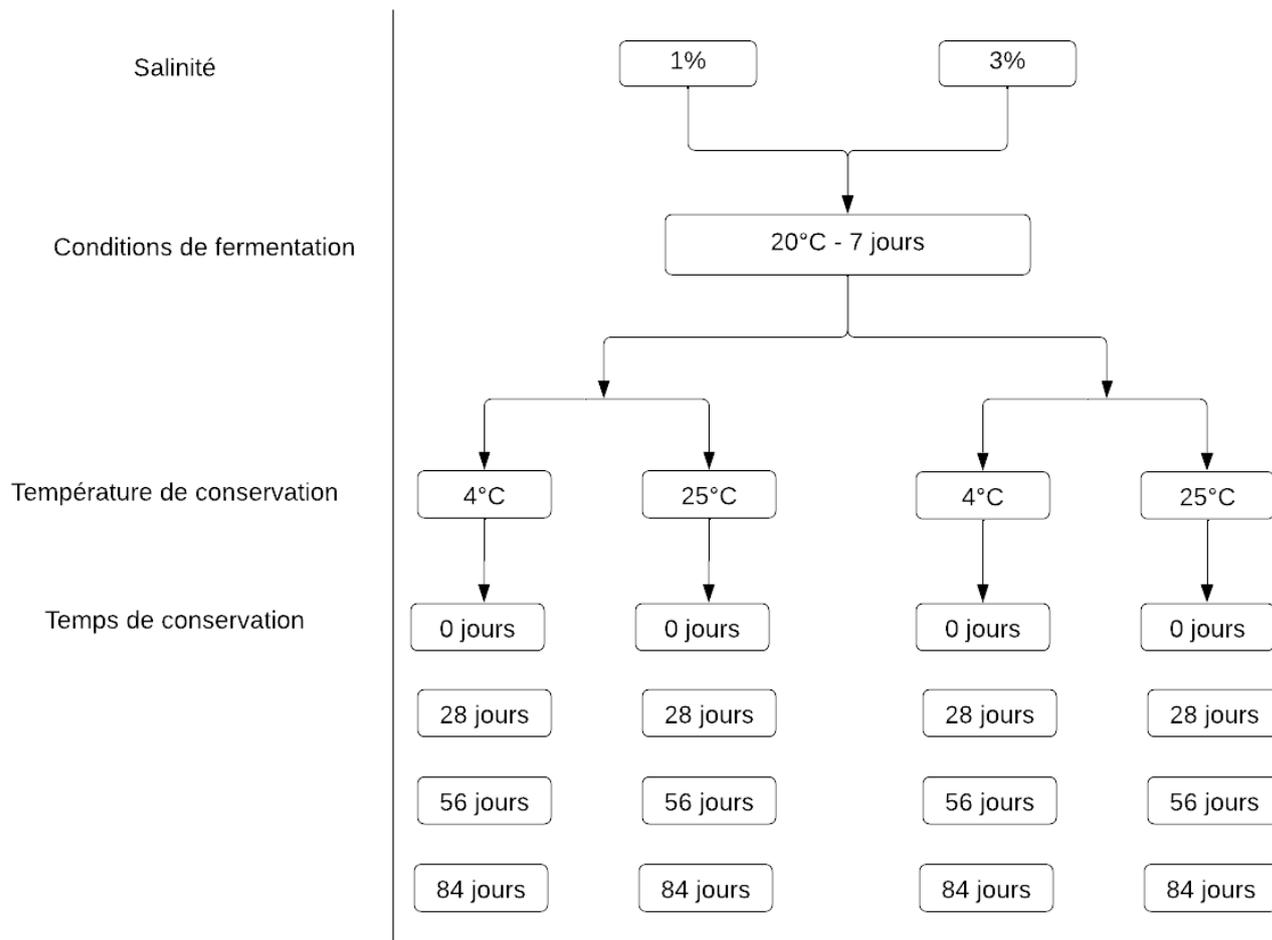
## Annexe 4 : Schéma des expérimentations



Annexe 3 Schéma de la première expérience menée



Annexe 4 Schéma de l'expérience n°2



Annexe 5 Schéma de l'expérimentation n° 3

## Annexe 5 : Explication du choix des modalités des expérimentations

Dans cette annexe, le choix des différentes modalités est expliqué plus en détail afin de permettre une meilleure compréhension des différents essais.

### Expérimentation 1

Les deux volumes testés sont ceux le plus souvent proposés par les producteurs et demandés par les consommateurs (respectivement en petit et grand conditionnement).

Deux salinités ont également été testées. Le premier taux (à 1%) est une valeur reprise par les producteurs dans le commerce (pour diverses raisons énoncées dans le point 2.2.2.). Le taux de 5% par contre est plus élevé que les valeurs commerciales (et littéraires) habituelles, il permettra de voir comment le produit évolue à des concentrations salines plus élevées.

Enfin, les températures de fermentation choisies simulent une certaine différence qui peut être retrouvée chez le consommateur (marquant une conservation en cave ou plutôt en milieu tempéré). Ces modalités permettront de mettre en avant l'impact plus précis sur la croissance des LAB. Le temps de fermentation est d'une semaine pour suivre le choix des producteurs.

Enfin, la conservation est de deux semaines à température ambiante (le relevé thermique de cette température est disponible en annexe 2).

## Expérimentation 2

Le volume et la salinité des bocaux ont été choisis pour être plus simples et moins coûteux à mettre en place. Pour le facteur « temps », la fermentation a été régulièrement analysée sur 21 jours.

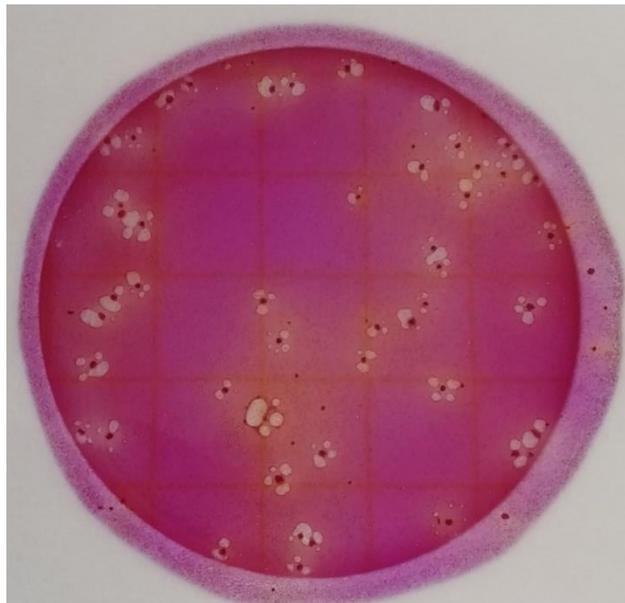
Enfin, la température est presque semblable à celle de la première expérimentation. La modalité 4°C a cependant été rajoutée dans le but de tester l'effet plus précis du froid sur la microbiologie lors d'une fermentation « ralentie ».

### Test de vieillissement

Les taux de sels sont des concentrations facilement retrouvées dans le commerce. Les conditions de fermentation ont été choisies pour représenter une fermentation avec une température souvent utilisée par les producteurs (une semaine à température ambiante, estimée ici à +/-20°C). Les températures de conservation, par contre, simulent une température de conservation au frigo ainsi qu'à T° ambiante. Comme pour la première expérimentation, ces températures reflètent les habitudes des consommateurs. Enfin, les temps de conservation ont été choisis arbitrairement à raison d'une ouverture tous les 28 jours.

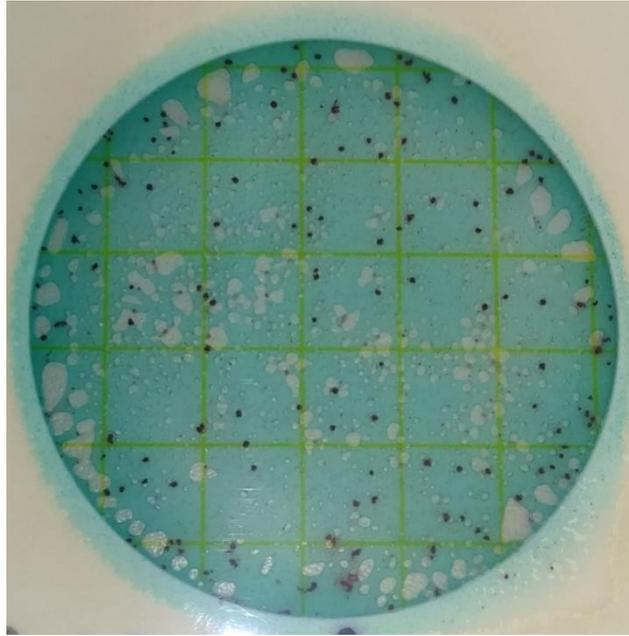
## Annexe 6 : Interprétation des Petrifilm

Les entérobactéries présentent un aspect rouge foncé sur la gélose et sont associées à une bulle de gaz ainsi qu'un halo jaune, comme montré sur la photo ci-dessous

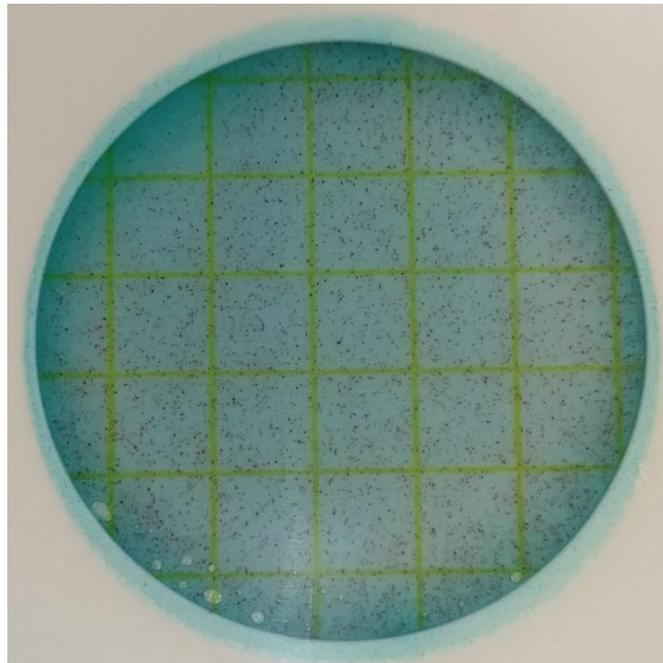


*Annexe 6 Aspect des entérobactéries (avec bulles de gaz) sur Petrifilm*

Pour les lactobactéries, l'aspect général est également de couleur rouge. Dans ce cas-ci, par contre, il se peut que les colonies ne soient pas associées à une bulle de gaz. Selon le guide d'interprétation 3M, si une bulle de gaz est associée à la colonie, il s'agit de LAB hétérofermentaire. Dans le cas contraire, les LAB sont homofermentaires.



*Annexe 7 Aspect des lactobactéries (avec bulles de gaz) sur Petrifilm*



*Annexe 8 Aspect des lactobactéries (sans bulles de gaz) sur Petrifilm*

Si le nombre de colonies est supérieur à 150, une approximation d'UFC a été établie. Pour ce faire, la moyenne de 3 zones de gélose distinctes a été effectuée avant d'être multiplier par la surface du Petrifilm (soit 30 cm<sup>2</sup> pour les LAB et 20 cm<sup>2</sup> pour les entérobactéries).

## Annexe 7 : Analyse statistique

### Expérimentation 1 :

Plan statistique de l'expérimentation 1 :

**Objectif :** Comparer l'effet de 4 traitements sur l'évolution de carottes lactofermentés

**Observation :** Nombre de micro-organismes ; Viscosité ; Acidité ; Colorimétrie

**Facteurs :**

Volume : Fixe – 2 modalités

→ 0,5L/1,5L

Sel : Fixe – 2 modalités

→ 1%/5%

Température de conservation : Fixe – 2 modalités

→ 18°C/25°C

**Unité expérimentale :** un bocal

**Répétition :** 2

Tableau d'analyse de la variance de l'acidité :

**The SAS System**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: pH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	16.25286064	0.85541372	21.56	0.0044
Error	4	0.15868049	0.03967012		
Corrected Total	23	16.41154113			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	pH Mean
0.990331	4.714005	0.199174	4.225146

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Volume	1	0.02913228	0.02913228	0.73	0.4398
Sel	1	1.13745347	1.13745347	28.67	0.0059
Temperature	1	0.24620628	0.24620628	6.21	0.0674
Temps	2	12.83000526	6.41500263	161.71	0.0001
Volume*Sel	1	0.03724876	0.03724876	0.94	0.3874
Volume*Temperature	1	0.01259653	0.01259653	0.32	0.6032
Volume*Temps	2	0.07985759	0.03992879	1.01	0.4425
Sel*Temperature	1	0.12386461	0.12386461	3.12	0.1520
Sel*Temps	2	1.02776161	0.51388081	12.95	0.0179
Temperature*Temps	2	0.35345779	0.17672890	4.45	0.0960
Volume*Sel*Temperatu	1	0.09435514	0.09435514	2.38	0.1979
Volume*Sel*Temps	2	0.04563131	0.02281566	0.58	0.6032
Sel*Temperatur*Temps	2	0.23529000	0.11764500	2.97	0.1622

Annexe 9 Tableau de l'analyse de la variance de l'acidité au cours de la première expérimentation

Tableau d'analyse de la variance des lactobactéries :

**The SAS System**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Lab

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	21	6.269977E15	2.9857033E14	17.31	0.0560
Error	2	3.449059E13	1.7245295E13		
Corrected Total	23	6.3044676E15			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Lab Mean
0.994529	30.33231	4152745	13690833

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Volume	1	1.9729067E13	1.9729067E13	1.14	0.3968
Sel	1	4.6016284E14	4.6016284E14	26.68	0.0355
Temperature	1	1.0116614E15	1.0116614E15	58.66	0.0166
Temps	2	1.0298998E15	5.1494992E14	29.86	0.0324
Volume*Sel	1	2.4174454E14	2.4174454E14	14.02	0.0645
Volume*Temperature	1	1.5944415E14	1.5944415E14	9.25	0.0933
Volume*Temps	2	1.260646E15	6.30323E14	36.55	0.0266
Sel*Temperature	1	1.260875E14	1.260875E14	7.31	0.1139
Sel*Temps	2	4.8147792E14	2.4073896E14	13.96	0.0668
Temperature*Temps	2	2.1453413E14	1.0726707E14	6.22	0.1385
Volume*Sel*Temperatu	1	2.7370704E13	2.7370704E13	1.59	0.3348
Volume*Sel*Temps	2	4.5517631E13	2.2758816E13	1.32	0.4311
Sel*Temperatur*Temps	2	4.8895533E14	2.4447766E14	14.18	0.0659
Volume*Tempera*Temps	2	7.0274599E14	3.51373E14	20.38	0.0468

Annexe 10 Tableau de l'analyse de la variance des lactobactéries au cours de la première expérimentation

Tableau d'analyse de la variance des entérobactéries :

**The SAS System**

The ANOVA Procedure

Dependent Variable: Entero

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	19	4.0783572E14	2.1465038E13	1.10	0.5221
Error	4	7.8169809E13	1.9542452E13		
Corrected Total	23	4.8600553E14			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Entero Mean
0.839159	205.4947	4420685	2151240

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Volume	1	99816461185	99816461185	0.01	0.9465
Sel	1	1.1964199E13	1.1964199E13	0.61	0.4777
Temperature	1	11343540685	11343540685	0.00	0.9819
Temps	2	6.9361334E13	3.4680667E13	1.77	0.2807
Volume*Sel	1	1.8855449E13	1.8855449E13	0.96	0.3816
Volume*Temperature	1	3.6492433E13	3.6492433E13	1.87	0.2436
Volume*Temps	2	3.7387622E13	1.8693811E13	0.96	0.4576
Sel*Temperature	1	2.9933879E13	2.9933879E13	1.53	0.2835
Sel*Temps	2	1.2993845E14	6.4969226E13	3.32	0.1411
Temperature*Temps	2	4.3218903E13	2.1609451E13	1.11	0.4147
Volume*Sel*Temperatu	1	660272406435	660272406435	0.03	0.8631
Volume*Sel*Temps	2	1.1277029E13	5.6385147E12	0.29	0.7637
Sel*Temperatur*Temps	2	1.863499E13	9.3174949E12	0.48	0.6521

Annexe 11 Tableau de l'analyse de la variance des entérobactéries au cours de la première expérimentation

## Expérimentation 2 :

Plan statistique de l'expérimentation 2

**Objectif** : Comparer l'effet de différents temps et température de fermentation sur l'évolution du produit

**Observation** : Nombre de micro-organismes ; Viscosité ; Acidité ; Colorimétrie ; Sensorielle

**Facteurs** :

Température de fermentation : Fixe – 3 modalités

Température de conservation : Fixe – 3 modalités

**Unité expérimentale** : un bocal

**Répétition** : 3

Tableau d'analyse de la variance de l'acidité :

**The SAS System**  
The ANOVA Procedure  
Dependent Variable: pH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	5	13.71292734	2.74258547	87.71	<.0001
Error	6	0.18760466	0.03126744		
Corrected Total	11	13.90053200			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	pH Mean
0.986504	4.059384	0.176826	4.355981

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Temperature	2	0.52999716	0.26499858	8.48	0.0179
Temps	3	13.18293018	4.39431006	140.54	<.0001

Annexe 12 Tableau de l'analyse de la variance de l'acidité au cours de la deuxième expérimentation

Tableau d'analyse de la variance des lactobactéries :

**The SAS System**  
The ANOVA Procedure  
Dependent Variable: LAB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	4	1.8229536E14	4.5573841E13	0.98	0.5092
Error	4	1.8681684E14	4.6704209E13		
Corrected Total	8	3.691122E14			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LAB Mean
0.493875	70.29306	6834048	9722222

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Temps	2	7.6904067E13	3.8452033E13	0.82	0.5018
Temperature	2	1.053913E14	5.2695648E13	1.13	0.4087

Annexe 13 Tableau de l'analyse de la variance des lactobactéries au cours de la deuxième expérimentation

Tableau de la corrélation entre le temps, le pH et les LAB

**The SAS System**

The CORR Procedure

3 Variables: temps pH LAB

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
temps	9	14.00000	6.06218	126.00000	7.00000	21.00000
pH	9	3.75433	0.32939	33.78900	3.29800	4.33400
LAB	9	9722222	6792571	87500000	2566667	22910000

Pearson Correlation Coefficients, N = 9 Prob >  r  under H0: Rho=0			
	temps	pH	LAB
temps	1.00000	-0.40664 0.2774	0.44326 0.2321
pH	-0.40664 0.2774	1.00000	-0.36638 0.3321
LAB	0.44326 0.2321	-0.36638 0.3321	1.00000

Annexe 14 tableau de corrélation entre le temps, le pH et les LAB de la deuxième expérimentation

Expérimentation 3 :

Plan statistique de l'expérimentation 2

**Objectif :** caractériser l'évolution de produits fermentés au cours du temps

**Observation :** Lactobactéries ; Entérobactéries ; Acidité ; Colorimétrie ;

**Facteurs :**

Salinité : Fixe – 2 modalités

⇒ 1% - 3%

Température de conservation : Fixe – 2 modalités

⇒ 4°C - 25°C

Temps de conservation : Fixe – 4 modalités

⇒ 0 - 28 – 56 – 84 jours

Bloc : Aléatoire – 3 modalités

**Unité expérimentale :** un bocal de carottes fermentés

**Répétition :** 1

## Tableau d'analyse de la variance de l'acidité

**The SAS System**  
The ANOVA Procedure  
Dependent Variable: pH

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	0.70392236	0.05866020	9.92	0.0420
Error	3	0.01773601	0.00591200		
Corrected Total	15	0.72165837			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	pH Mean
0.975423	2.047041	0.076890	3.756132

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Sel	1	0.03534400	0.03534400	5.98	0.0921
Temperature	1	0.25988754	0.25988754	43.96	0.0070
Temps	3	0.24048683	0.08016228	13.56	0.0299
Sel*Temperature	1	0.00676735	0.00676735	1.14	0.3631
Sel*Temps	3	0.03620536	0.01206845	2.04	0.2864
Temperature*Temps	3	0.12523129	0.04174376	7.06	0.0714

Annexe 15 Tableau de l'analyse de la variance de l'acidité au cours du test de vieillissement

## Tableau d'analyse de la variance des lactobactéries :

**The SAS System**  
The ANOVA Procedure  
Dependent Variable: LAB

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	3.766473E14	3.1387275E13	3.20	0.1842
Error	3	2.9462305E13	9.8207683E12		
Corrected Total	15	4.0610961E14			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LAB Mean
0.927452	64.98774	3133811	4822156

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Sel	1	2.0941708E12	2.0941708E12	0.21	0.6757
Temperature	1	2.8410507E12	2.8410507E12	0.29	0.6280
Temps	3	2.0639879E14	6.8799598E13	7.01	0.0721
Sel*Temperature	1	1.5579138E13	1.5579138E13	1.59	0.2969
Sel*Temps	3	1.3869807E14	4.6232689E13	4.71	0.1177
Temperature*Temps	3	1.1036082E13	3.6786939E12	0.37	0.7793

Annexe 16 Tableau de l'analyse de la variance de l'acidité au cours du test de vieillissement

## Tableau de la corrélation entre le temps, le pH et les LAB

**The SAS System**  
The CORR Procedure

3 Variables: temps pH LAB

Simple Statistics						
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
temps	16	42.00000	32.33162	672.00000	0	84.00000
pH	16	3.76388	0.19022	60.22200	3.38200	4.02500
LAB	16	4822156	5203266	77154500	54500	14650000

Pearson Correlation Coefficients, N = 16 Prob >  r  under H0: Rho=0			
	temps	pH	LAB
temps	1.00000	-0.58184 0.0181	-0.70549 0.0023
pH	-0.58184 0.0181	1.00000	0.40339 0.1213
LAB	-0.70549 0.0023	0.40339 0.1213	1.00000

Annexe 17 tableau de corrélation entre le temps, le pH et les LAB du test de vieillissement

## Annexe 8 : Chromatogrammes de l'évolution des sucres et acides organiques

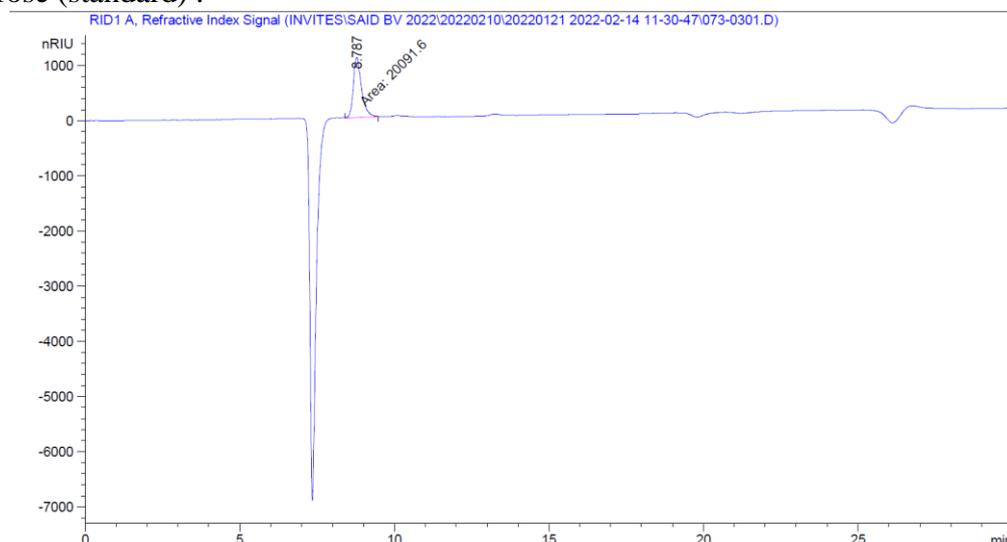
Les chromatogrammes ci-dessous représente les temps de rétention des sucres et acides organiques les plus abondants dans les produits analysés ainsi que l'évolution des sucres et des acides organiques dans différents échantillons (14) du test de vieillissement.

Pour la détection, les sucres ont été détecté par RI alors que les acides organiques l'ont été par UV (210 nm).

Les standards de sucres présentent un pic négatif en début d'élution. Selon Agilent technologies, ce pic apparait lorsque l'absorbance de l'échantillon est inférieure à celle de la phase mobile. Ils précisent également que ce phénomène est normal et est souvent ignoré.

Pour l'acide lactique, deux pics se superposent à 13.8 et 14.8 minutes. La cause est la faculté de cet acide de produire des oligomères, grâce à la présence de groupes carboxyliques et hydroxyles pouvant réagir ensemble. La colonne utilisée (HPX-87H) ne permet malheureusement pas de séparer ces deux oligomères. Cependant, un pic ayant un temps de rétention similaire apparait dans les différents échantillons. Il a donc été considéré que ce pic était de l'acide lactique.

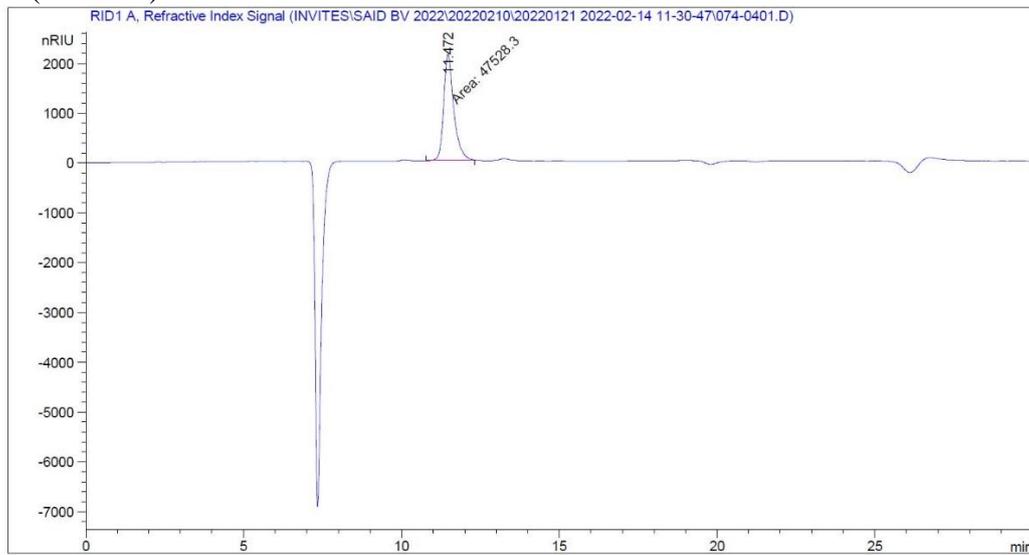
### Saccharose (standard) :



Annexe 18 Chromatogramme du standard de saccharose

Temps de rétention : 8.8 minutes

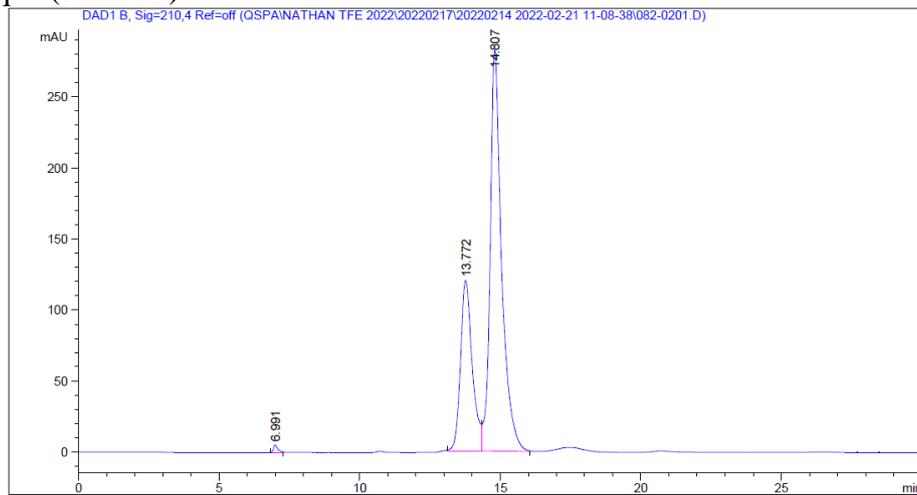
Fructose (standard) :



Annexe 19 Chromatogramme du standard de fructose

Temps de rétention : 14.5 minutes

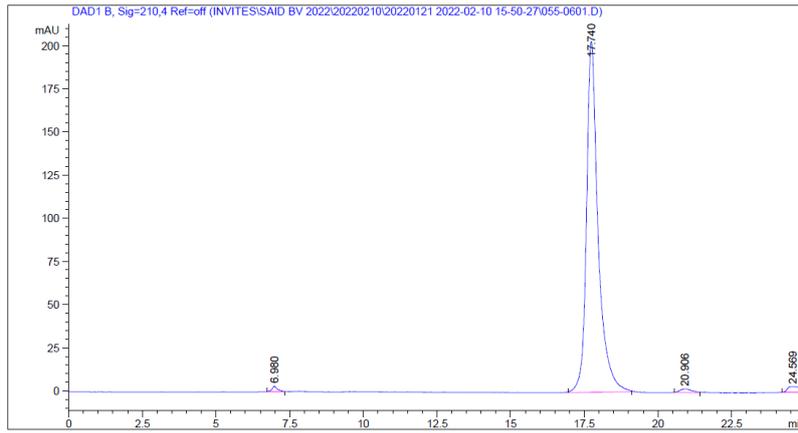
Acide lactique (standard) :



Annexe 20 Chromatogramme du standard de l'acide lactique

Temps de rétention : 14.8 minutes

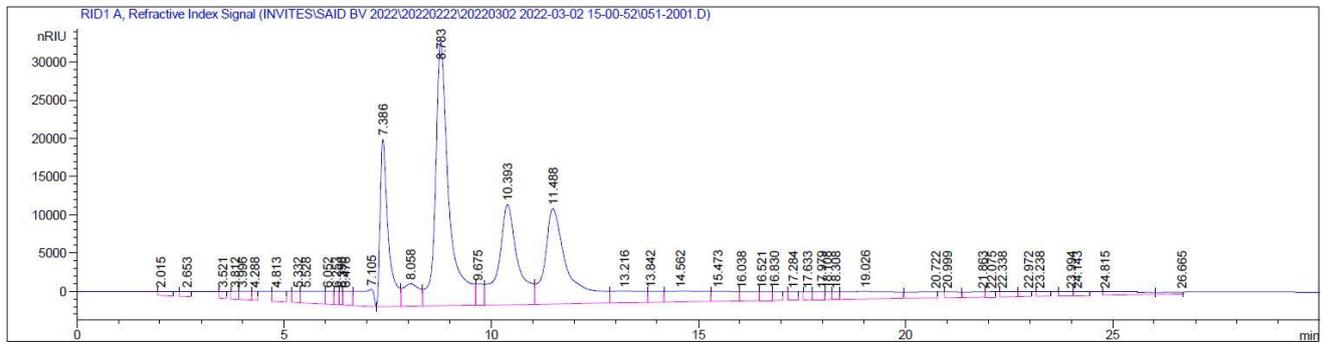
Acide acétique (standard) :



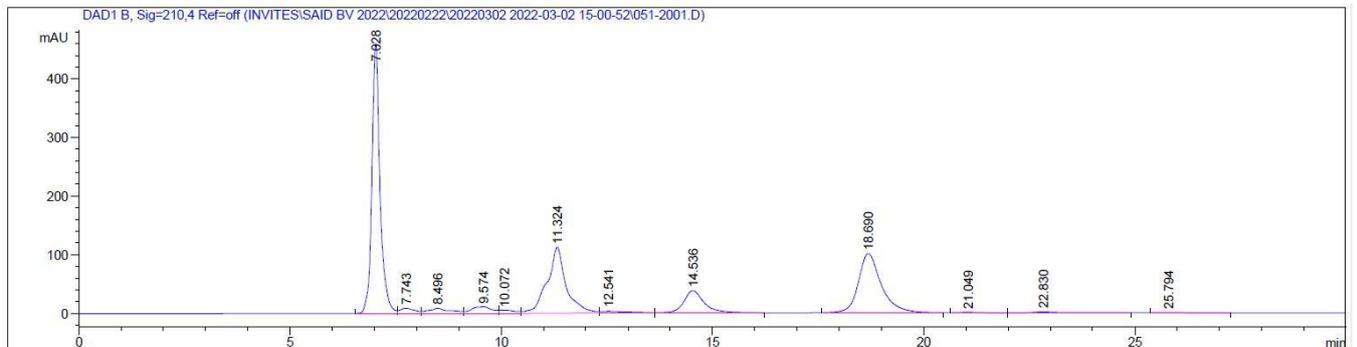
Annexe 21 Chromatogramme du standard de l'acide acétique

Temps de rétention : 17.7 minutes

Échantillon 0 : Carottes naturelles

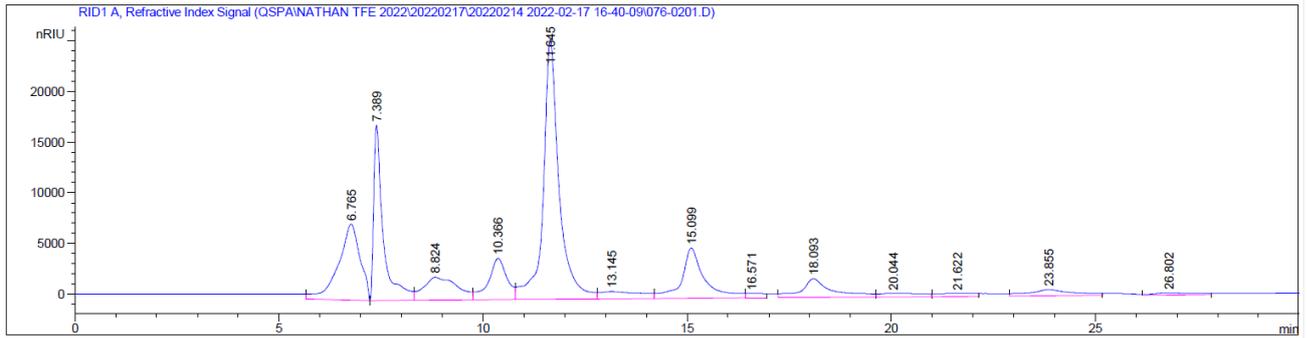


Annexe 22 Chromatogrammes des sucres dans des carottes naturelles

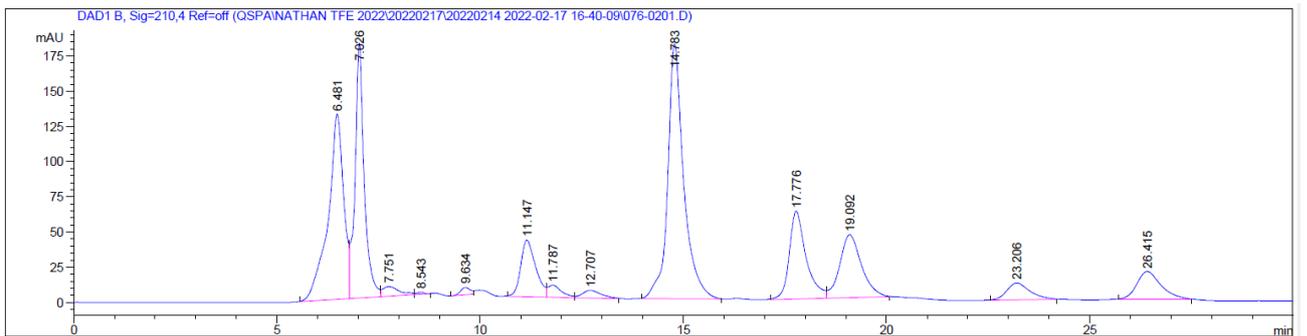


Annexe 23 Chromatogrammes des acides organiques dans des carottes naturelles

## Echantillon 1 : Carottes fermentées à 1% de sel (non conservées)

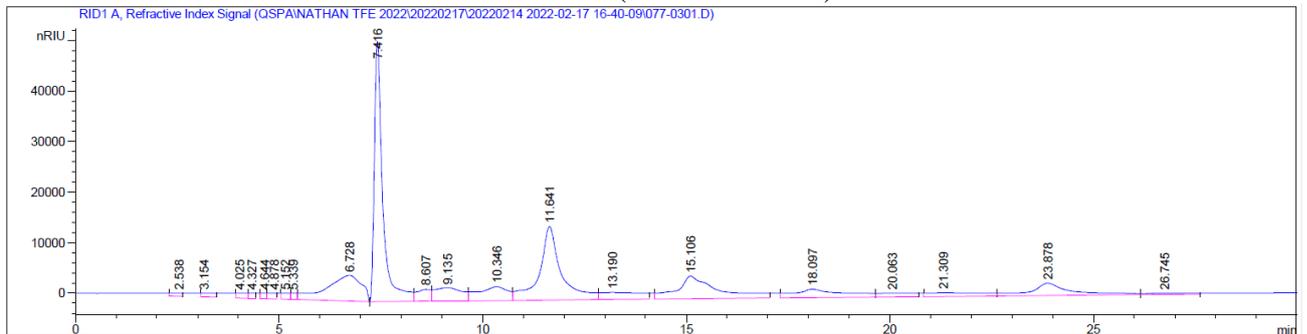


Annexe 24 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel

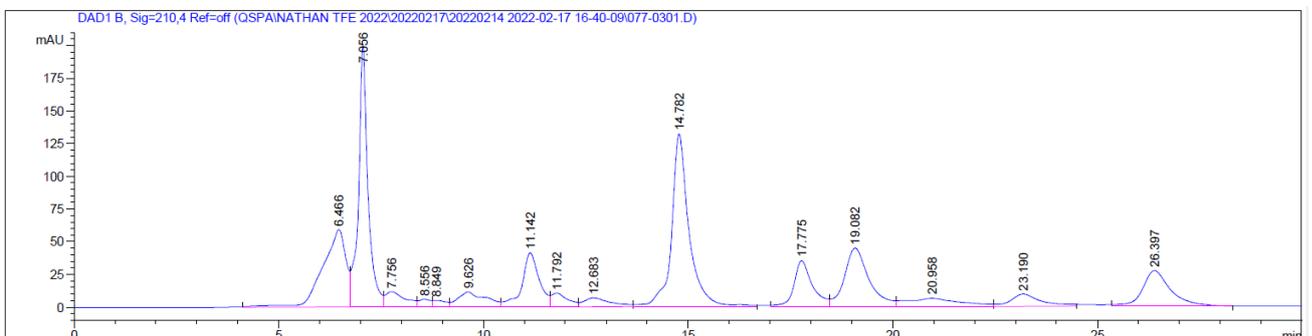


Annexe 25 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel

## Échantillon 2 : Carottes fermentées à 3% de sel (non conservées)

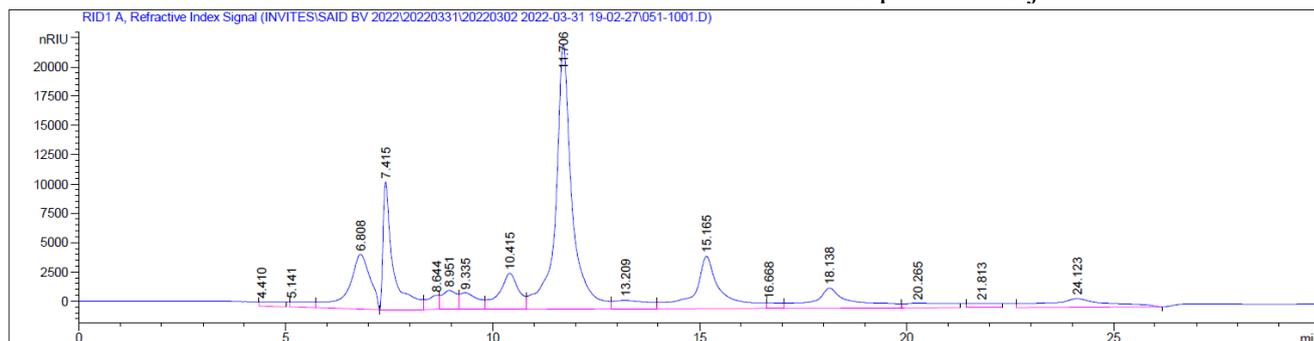


Annexe 26 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel

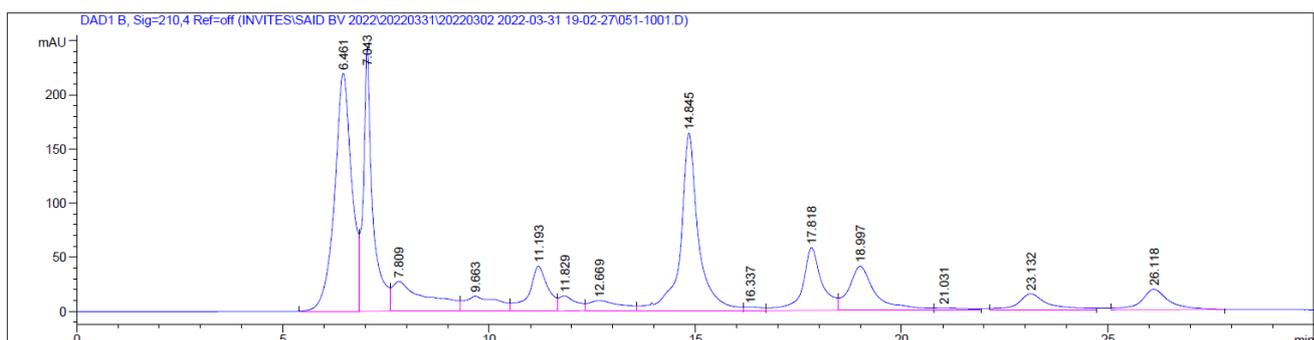


Annexe 27 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel

### Échantillon 3 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

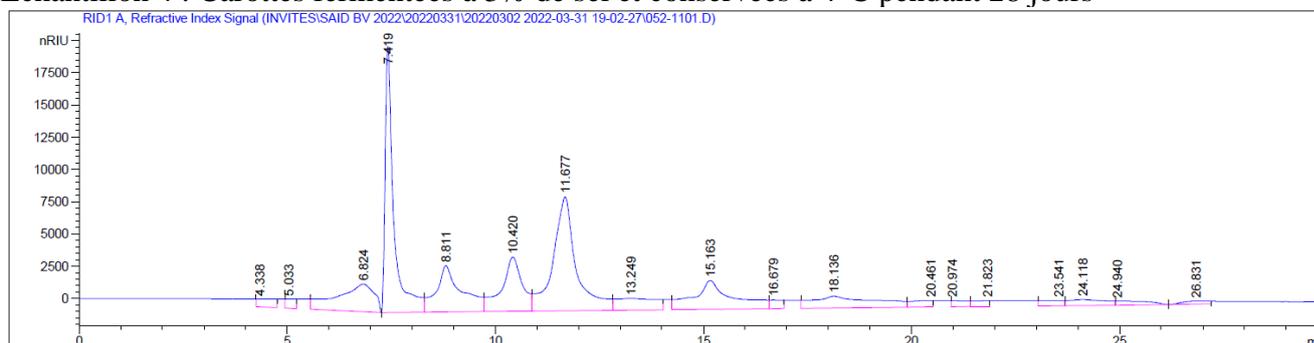


Annexe 28 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

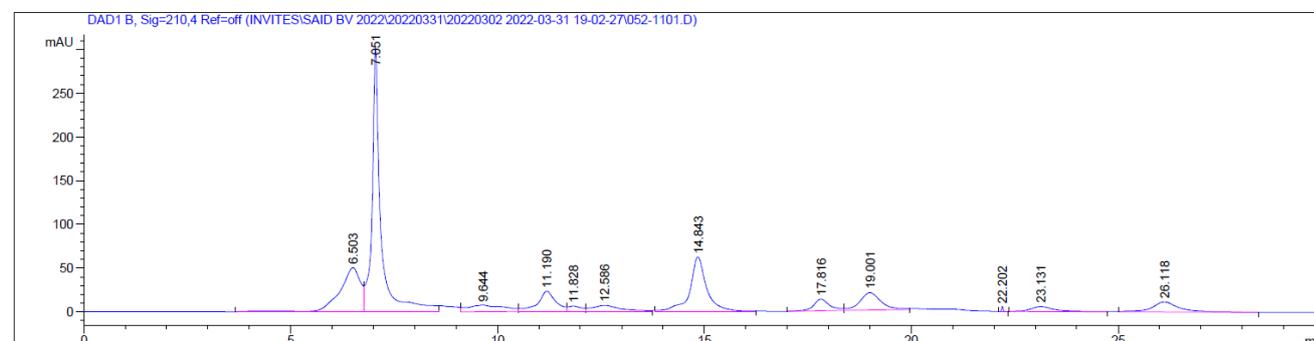


Annexe 29 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

### Échantillon 4 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

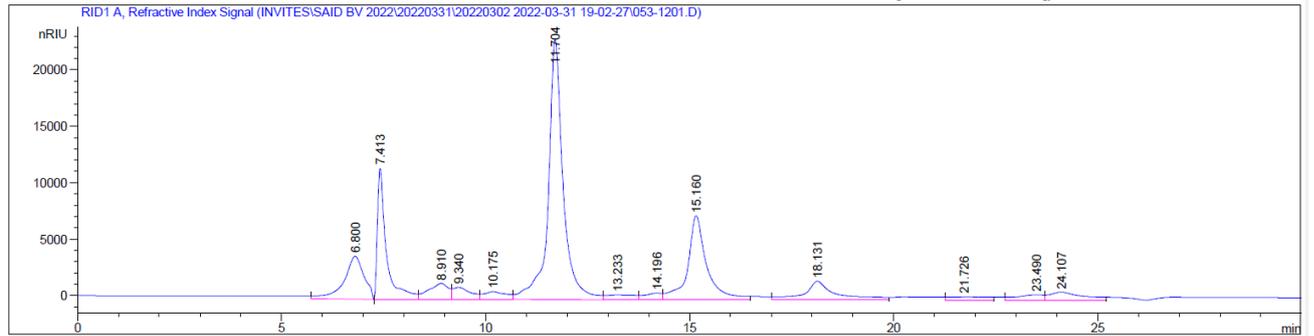


Annexe 30 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

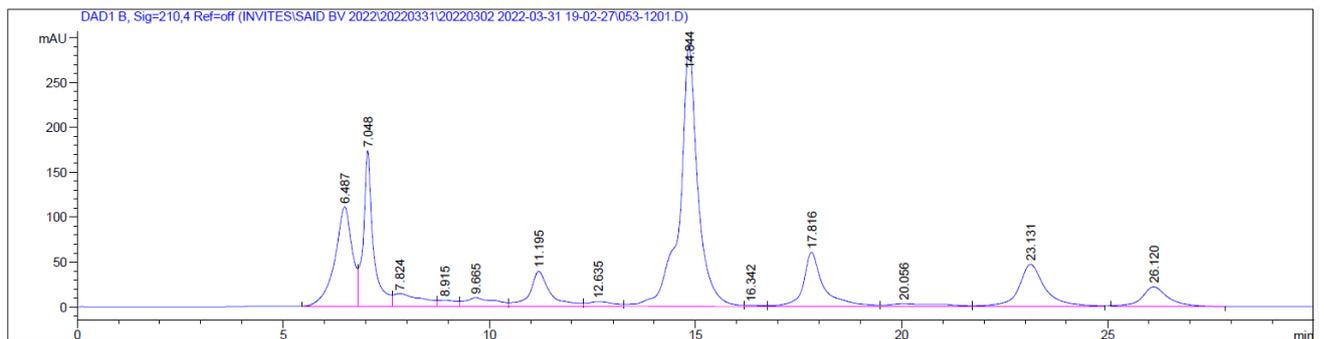


Annexe 31 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 28 jours

## Échantillon 5 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

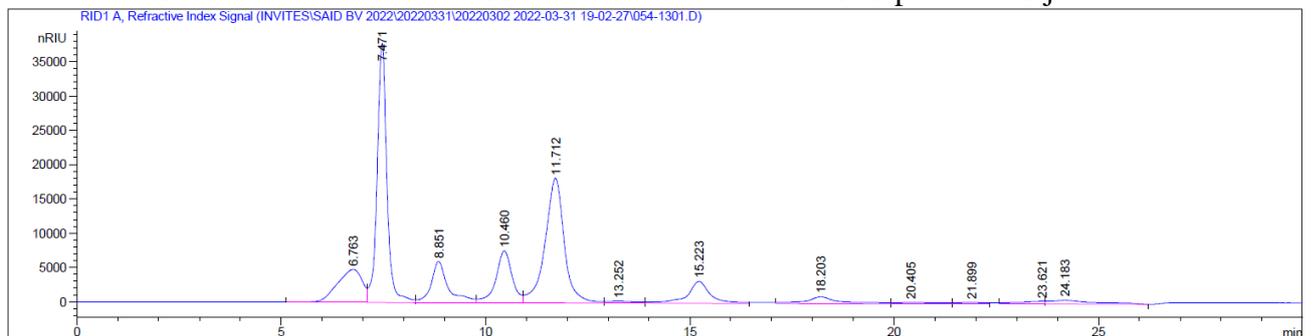


Annexe 32 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

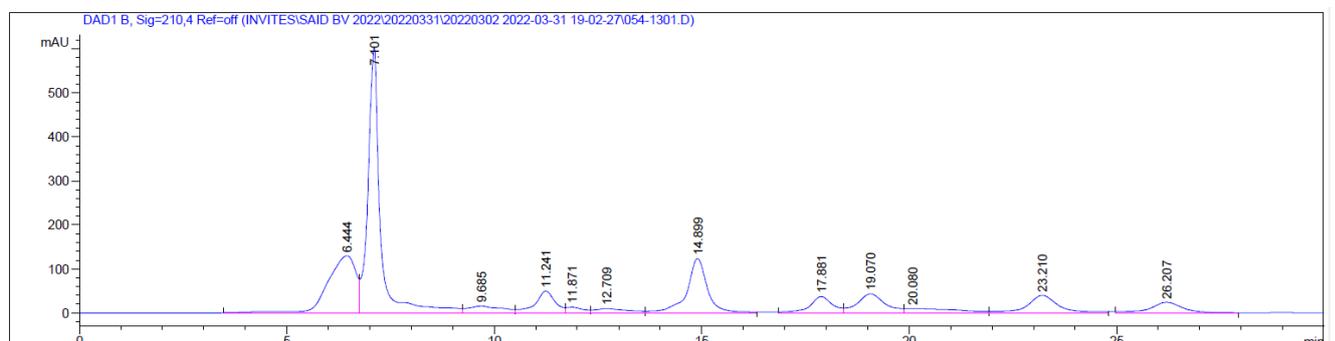


Annexe 33 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

## Échantillon 6 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

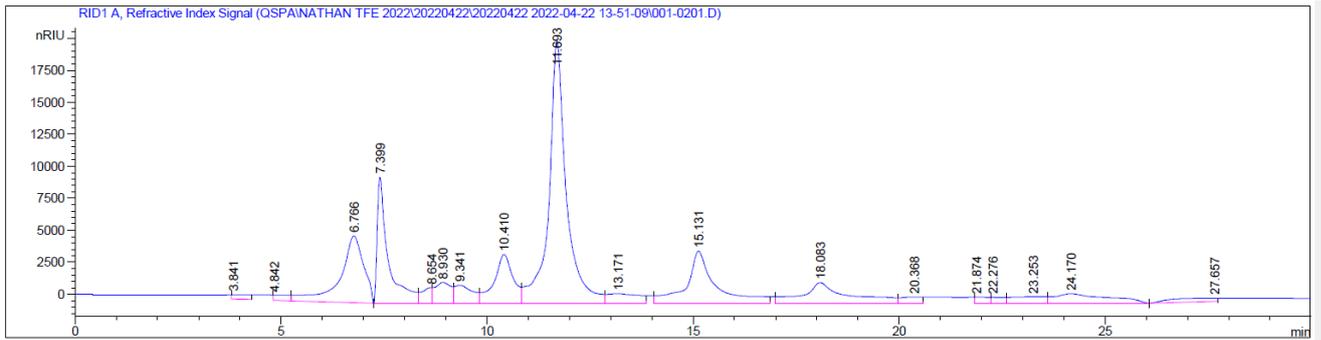


Annexe 34 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

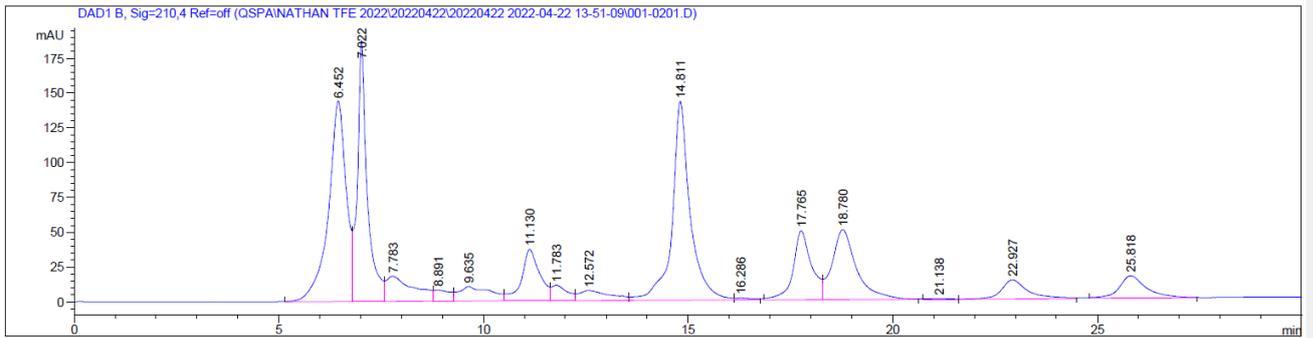


Annexe 35 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 28 jours

## Échantillon 7 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

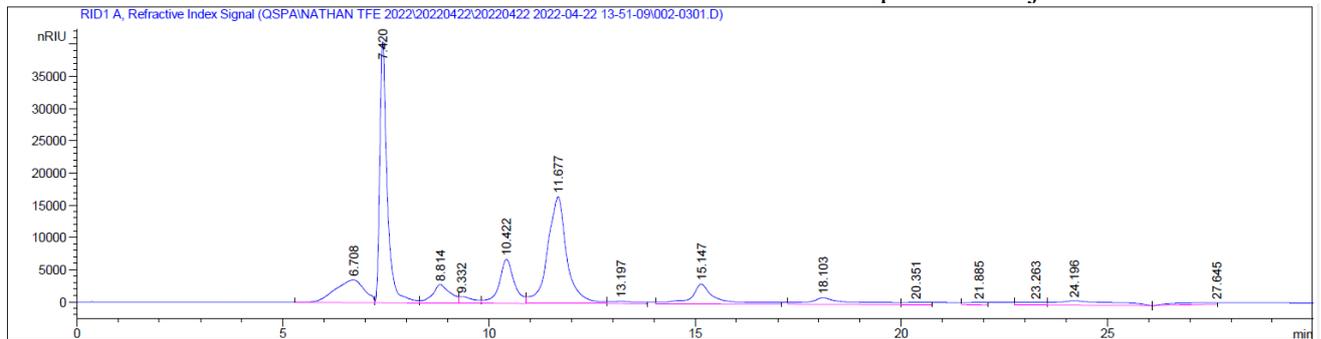


Annexe 36 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

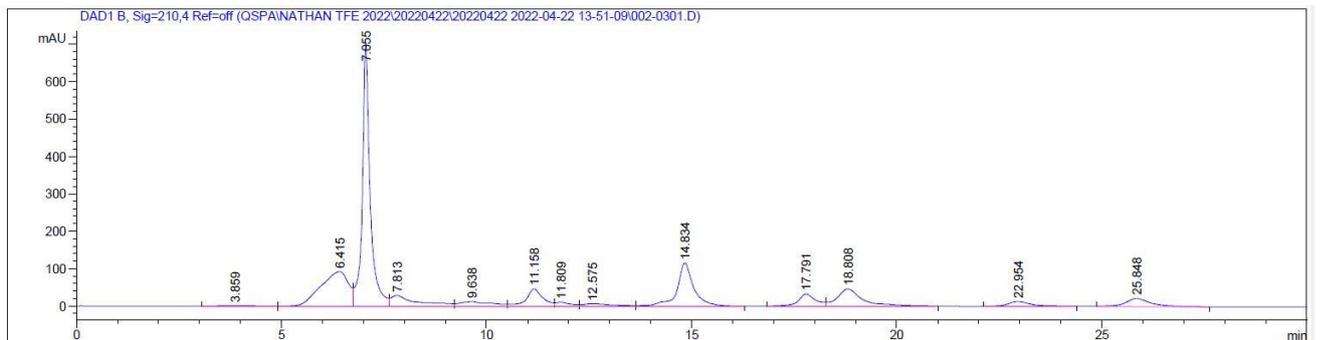


Annexe 37 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

### Échantillon 8 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

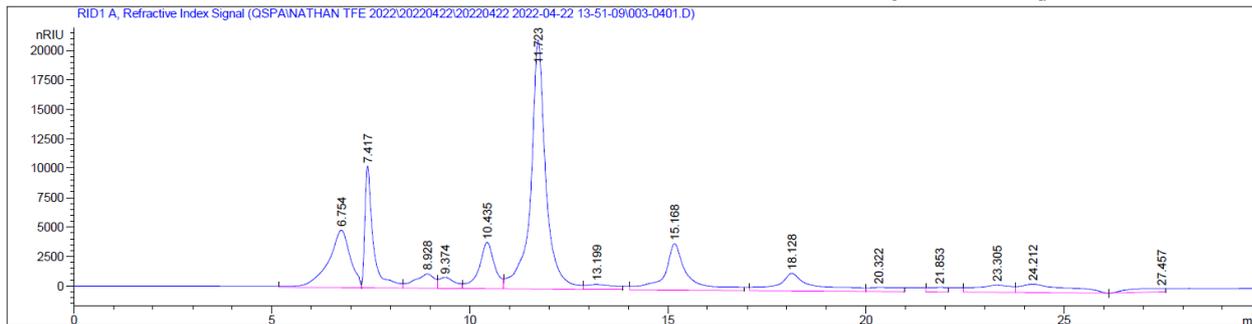


Annexe 38 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

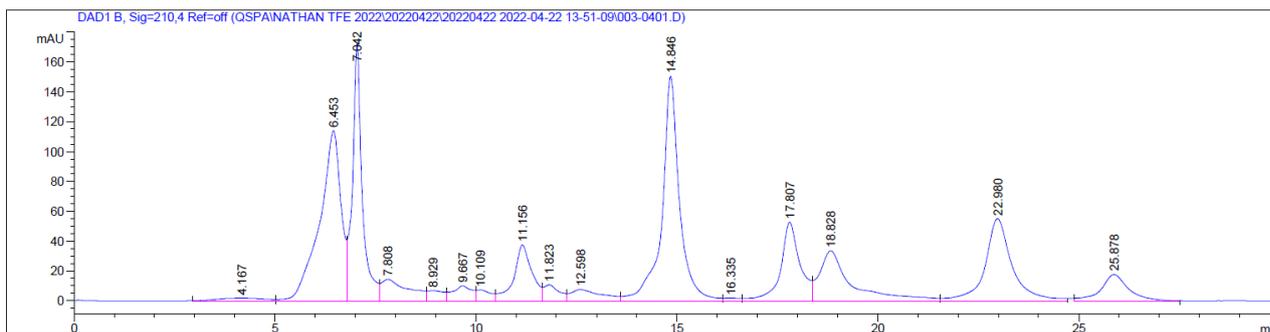


Annexe 39 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 56 jours

## Échantillon 9 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

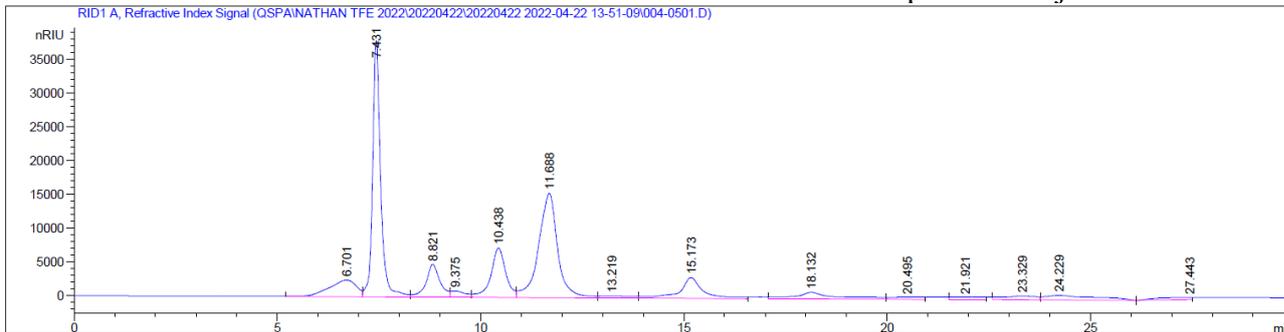


Annexe 40 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

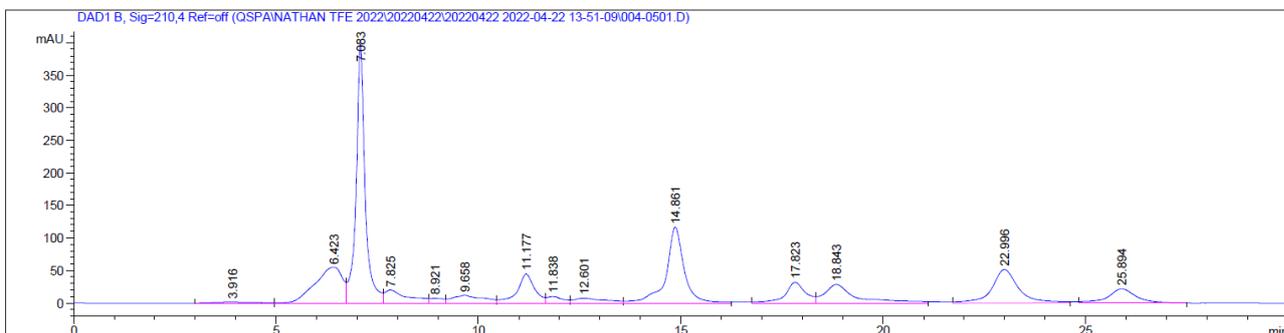


Annexe 41 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

## Échantillon 10 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

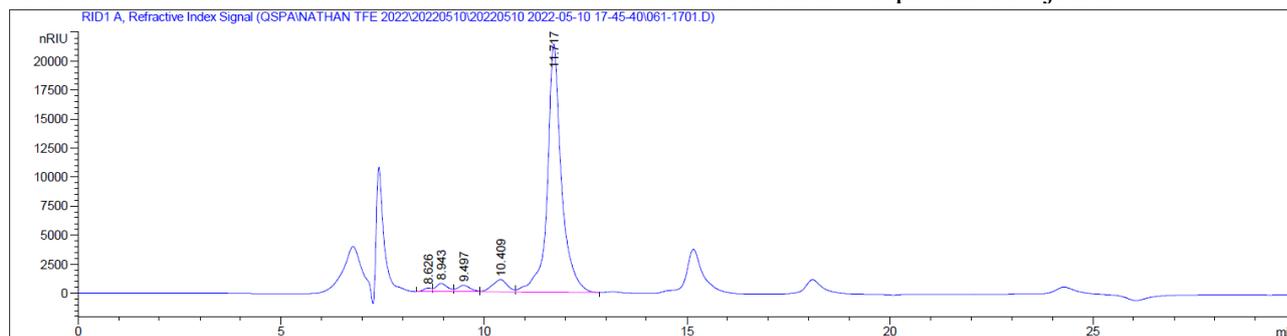


Annexe 42 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

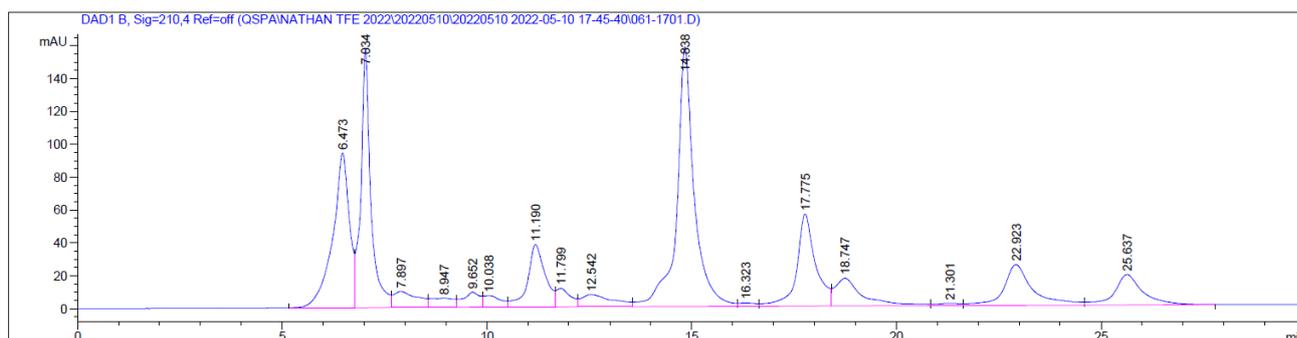


Annexe 43 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 56 jours

## Échantillon 11 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

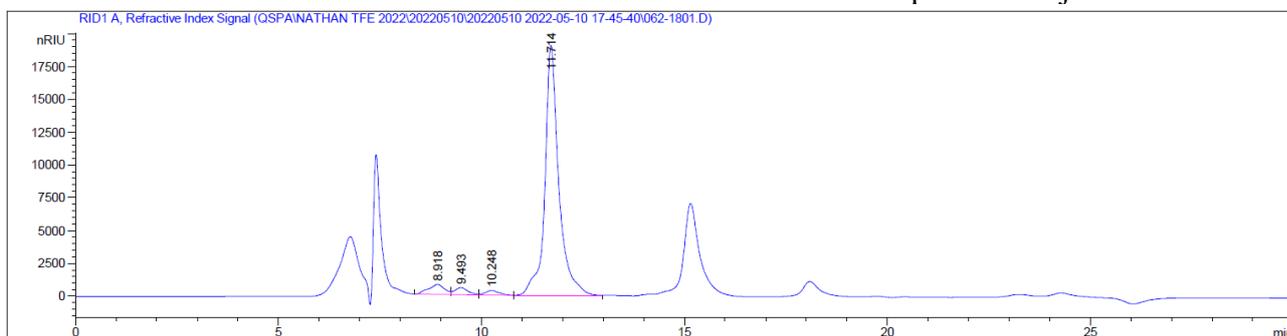


Annexe 44 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

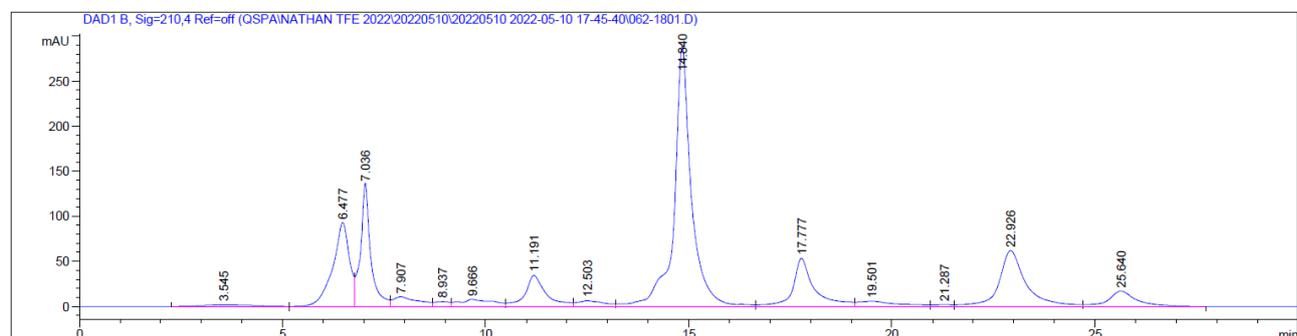


Annexe 45 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

## Échantillon 12 : Carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours

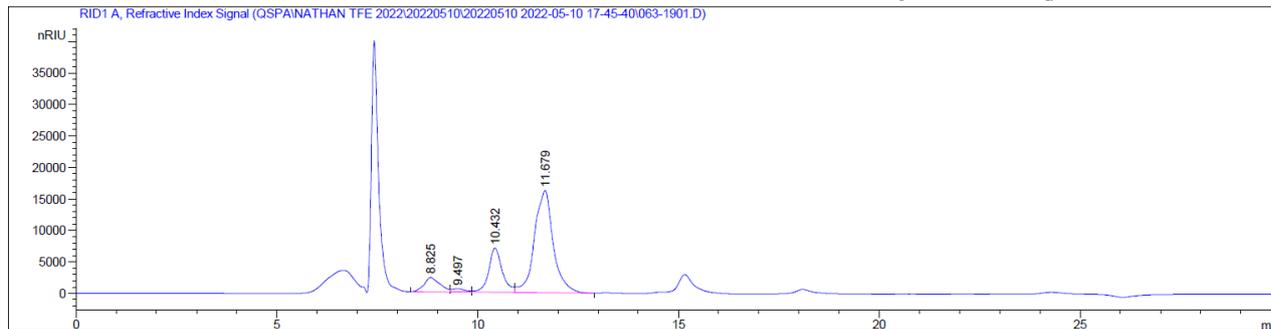


Annexe 46 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours

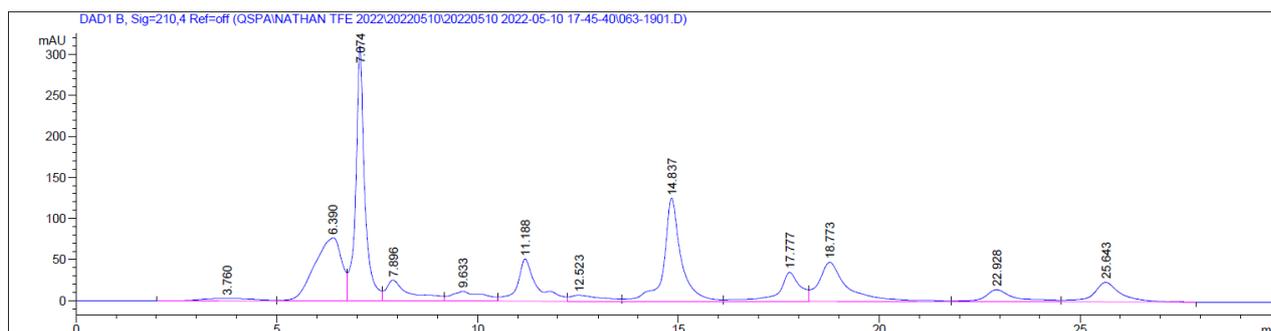


Annexe 47 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 1% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours

## Échantillon 13 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

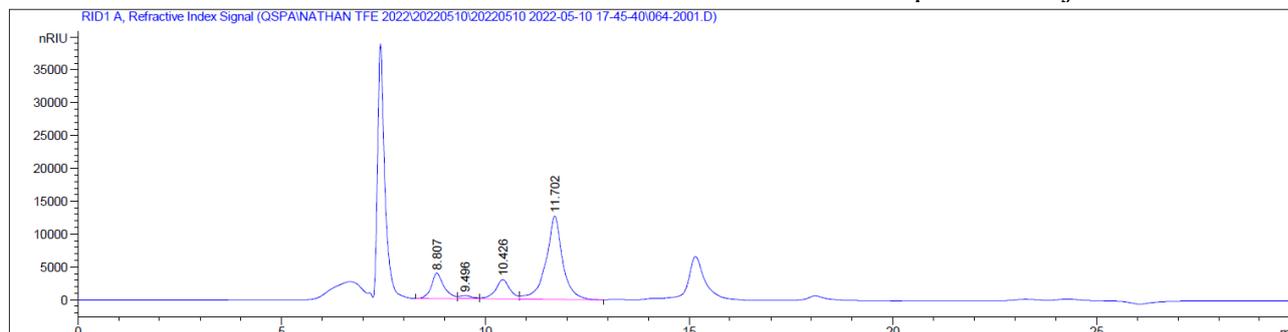


Annexe 48 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

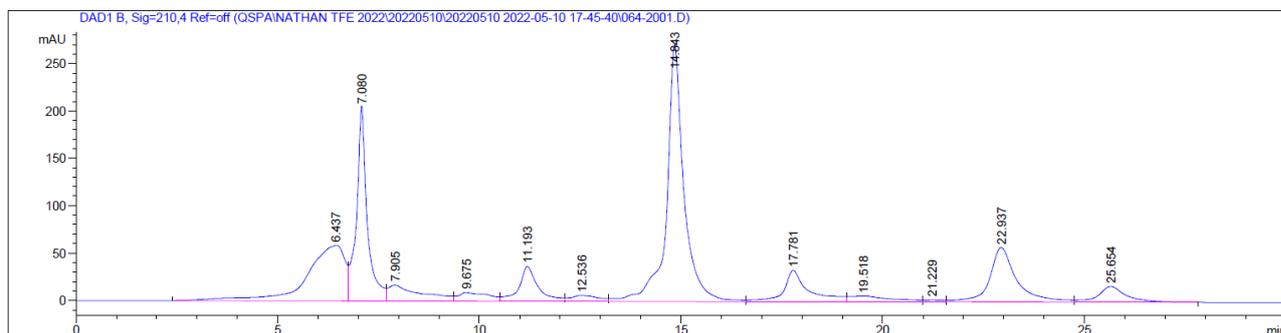


Annexe 49 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 4°C pendant 84 jours

## Échantillon 14 : Carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours



Annexe 50 Chromatogramme des sucres de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours



Annexe 51 Chromatogramme des acides organiques de carottes fermentées à 3% de sel et conservées à 25°C pendant 84 jours

Composés	Temps de rétention (standard)	Temps de rétention (échantillons)
Saccharose	8.8	8.8
Fructose	11.4	11.7
Acide lactique	13.8 – 14.8	14.8 minutes
Acide acétique	17.7	17.7

### Annexe 9: Droites d'étalonnage HPLC

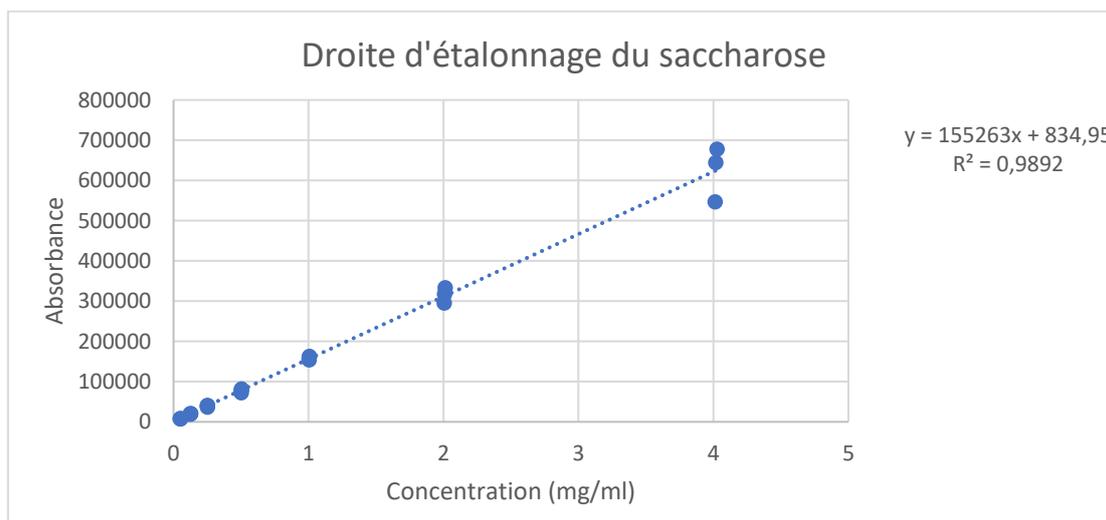
5 étalons ont été choisis pour ce travail, basé sur leur abondance plus élevée dans les échantillons testés. Les composés gardés sont le saccharose, glucose, fructose, acide lactique et acide acétique.

Pour formuler l'équation, 3 répétitions ont été faites et analysées dans Excel, à l'exception de l'acide acétique. Pour ce composé, une seule répétition a été faite faute à un manque de temps.

#### Saccharose

	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)
Dilution mère	746697	4,011	739526	3,995	802625	3,998
D1 (2*)	336064	2,006	360638	1,998	390158	1,999
D2 (4*)	177213	1,003	178602	0,999	193034	1,000
D3 (8*)	88323	0,501	92698	0,499	94145	0,500
D4 (10*)	44028	0,251	43779	0,250	46723	0,250
D5 (20*)	21449	0,125	21913	0,125	22554	0,125
D6 (80*)	9072	0,050	9815	0,050	10544	0,050
Equation	$y=189918x-4152,3$					
	$x=(y+4152,3)/189\ 918$					

Annexe 52 Aire des pics selon la concentration de saccharose mesurée

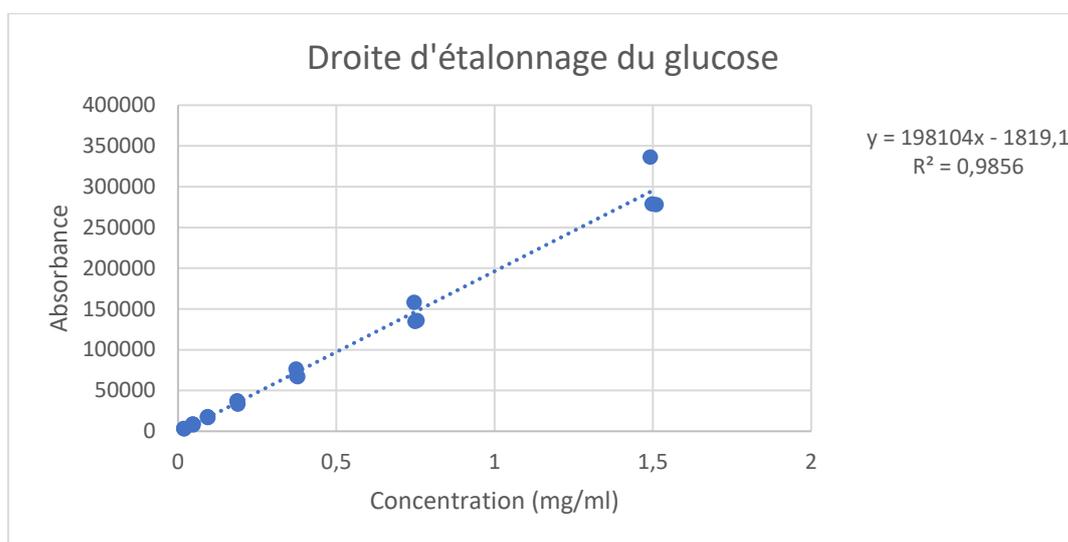


Annexe 53 Droite d'étalonnage du saccharose

### Glucose

	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)
Dilution mère	278045	1,51	278831	1,498	336487	1,492
D1 (2*)	135734	0,76	134655	0,749	158245	0,746
D2 (4*)	66870	0,38	67937	0,375	76259	0,373
D3 (8*)	33437	0,19	37211	0,187	37124	0,187
D4 (10*)	16826	0,09	17109	0,094	18007	0,093
D5 (20*)	7795	0,05	8569	0,047	8988	0,047
D6 (80*)	3211	0,02	3321	0,019	3361	0,019
Equation	$y=198104x-1819,1$					
	$x=(y+1819,1)/198\ 104$					

Annexe 54 Aire des pics selon la concentration de glucose mesurée

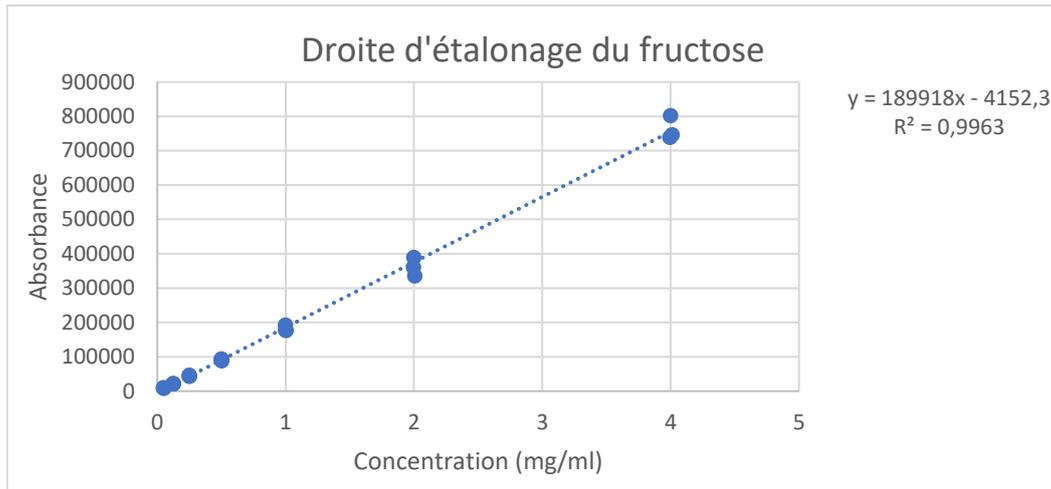


Annexe 55 Droite d'étalonnage du glucose

### Fructose

	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)
Dilution mère	746697	4,011	739526	3,995	802625	3,998
D1 (2*)	336064	2,006	360638	1,998	390158	1,999
D2 (4*)	177213	1,003	178602	0,999	193034	1,000
D3 (8*)	88323	0,501	92698	0,499	94145	0,500
D4 (10*)	44028	0,251	43779	0,250	46723	0,250
D5 (20*)	21449	0,125	21913	0,125	22554	0,125
D6 (80*)	9072	0,050	9815	0,050	10544	0,050
Equation	$y=189918x-4152,3$					
	$x=(y+4152,3)/189\ 918$					

Annexe 56 Aire des pics selon la concentration de fructose mesurée

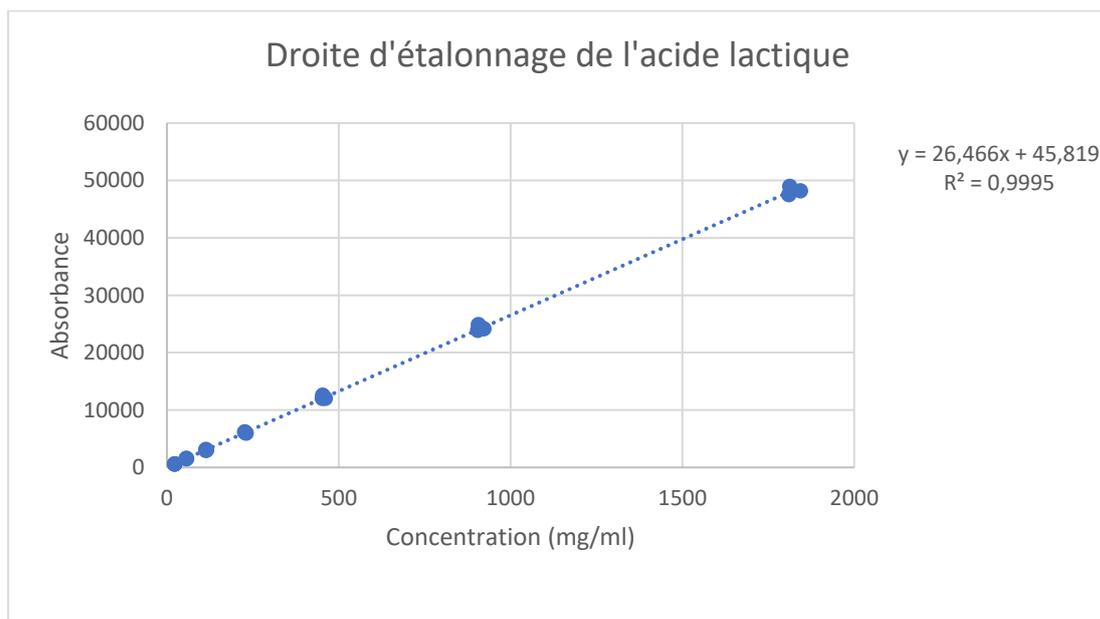


*Annexe 57 Droite d'étalonnage du fructose*

### Acide lactique

	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)	Aire	Concentration (mg/ml)
Dilution mère	48145	1844	47488	1810,00	48967	1813,00
D1 (2*)	24147	922	23842	905,00	24874	906,50
D2 (4*)	12005	461	11986	452,50	12552	453,25
D3 (8*)	5974	231	6112	226,25	6196	226,63
D4 (10*)	2973	115	2965	113,13	3118	113,31
D5 (20*)	1480	58	1511	56,56	1555	56,66
D6 (80*)	613	23	557	22,63	568	22,66
Equation	$y=26,466x+45,819$					
	$x=(y-45,819)/26,466$					

*Annexe 58 Aire des pics selon la concentration d'acide lactique mesurée*

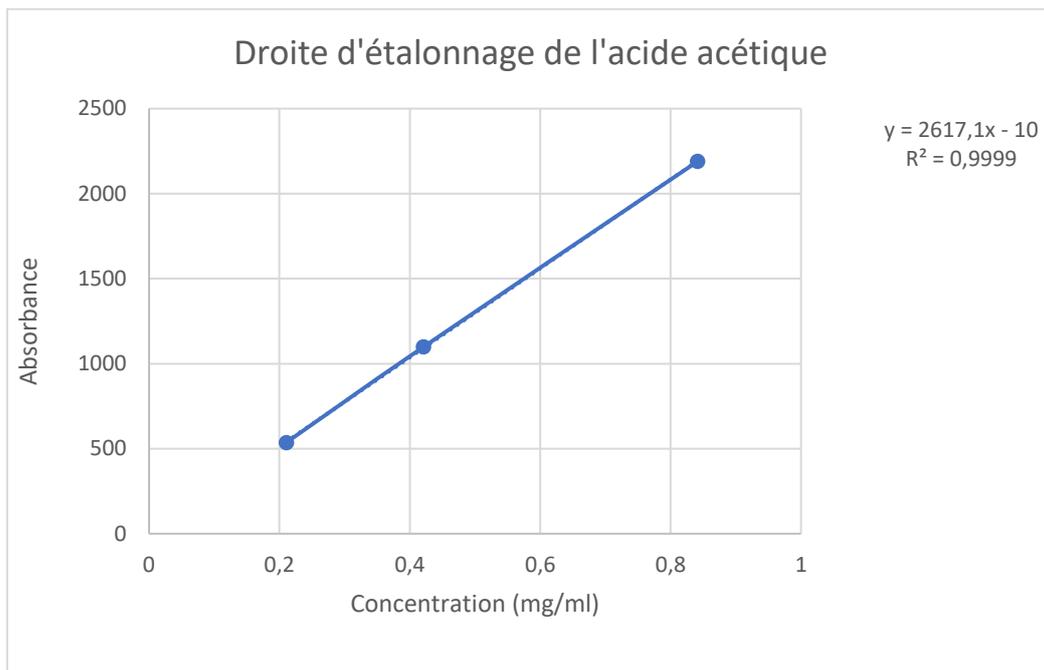


*Annexe 59 Droite d'étalonnage de l'acide lactique*

## Acide acétique

	Aire	Concentration (mg/ml)
Dilution mère	2190	0,8415
D1 (2*)	1098	0,42075
D2 (4*)	536	0,210375
Equation	$y=2617,1x-10$	
	$x=(y+10)/2617,1$	

Annexe 60 Aire des pics selon la concentration d'acide acétique mesurée



Annexe 61 Droite d'étalonnage de l'acide acétique