

## **Etude et développement d'une boisson fonctionnelle à base de Sobacha (Infusion japonaise de graines de sarrasin torréfiées)**

**Auteur :** Suffys, Sarah

**Promoteur(s) :** Goffin, Dorothée; Fauconnier, Marie-Laure

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

**Diplôme :** Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2021-2022

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/16244>

---

### *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.*

---

**ETUDE ET DEVELOPPEMENT D'UNE  
BOISSON FONCTIONNELLE FERMENTEE A  
BASE DE SOBACHA (INFUSION JAPONNAISE  
DE GRAINES DE SARRASIN TORREFIEES)**

**SARAH SUFFYS**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022**

**(CO)-PROMOTEUR(S): GOFFIN DOROTHEE & FAUCONNIER MARIE-LAURE**



Copyright©. 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.

**ETUDE ET DEVELOPPEMENT D'UNE  
BOISSON FONCTIONNELLE FERMENTEE A  
BASE DE SOBACHA (INFUSION JAPONNAISE  
DE GRAINES DE SARRASIN TORREFIEES)**

**SARAH SUFFYS**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIOINDUSTRIES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2021-2022**

**(CO)-PROMOTEUR(S): GOFFIN DOROTHEE & FAUCONNIER MARIE-LAURE**

Ce travail de fin d'études a été réalisé au Smart Gastronomy Lab, au Laboratoire de Sciences Gastronomiques ainsi qu'au sein du département de Chimie des Molécules Naturelles à la Faculté de Gembloux Agro-Bio Tech, Université de Liège.

## **Remerciements**

Je tiens à exprimer mon entière reconnaissance à toutes les personnes m'ayant permis de mener à bien ce travail de fin d'études.

Je tiens tout d'abord à remercier les Prof. Dorothee Goffin, Marie-Laure Fauconnier et Éric Haubruge de m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire ainsi que pour leurs précieux conseils quant à l'orientation de mon travail et à l'analyse de mes résultats. De plus, je souhaite remercier tout particulièrement Gaëtan Richard pour son aide technique et intellectuelle au quotidien.

Je tiens évidemment à remercier le personnel des laboratoires pour la qualité de leur encadrement et l'aide pratique qu'ils m'ont apporté. Je remercie tout spécialement Franck Michels et Adrien Francis pour le temps qu'ils m'ont accordé : sans eux la partie expérimentale de ce travail aurait été plus laborieuse. Je suis particulièrement reconnaissante envers Laurie Josselin pour m'avoir aidée à identifier et analyser les composés organiques volatils présents dans mes échantillons grâce à sa connaissance du logiciel MassHunterAnalysis, ainsi qu'envers Charles Boreux pour m'avoir aidée à interpréter statistiquement mes résultats grâce à son expérience du logiciel Rstudio.

Je remercie également les stagiaires et autres étudiants pour leur aide et la bonne ambiance qu'ils ont contribué à apporter au laboratoire.

Je voudrais aussi remercier toutes les personnes ayant participé à la forme de ce document.

Finalement, je tiens à exprimer un remerciement tout particulier à ma famille et à mes proches qui m'ont encouragée tout au long de mes études, en ayant toujours cru en moi et en m'ayant ainsi permis d'atteindre mes objectifs. Merci à Natacha et Florian d'avoir été présents et de m'avoir soutenue dans la réflexion et l'élaboration de ce travail de fin d'études.

## Abstract

This research project focuses on the study and development of a functional drink based on *sobacha*. This cereal matrix is an infusion of roasted buckwheat seeds widely consumed in Asian countries for its health benefits. Resulting from a Japanese know-how of buckwheat roasting, the matrix presents important anti-inflammatory and anti-oxidant properties.

Fermentation is envisaged by inoculating a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY) into the cereal matrix. The experimental design aims at fermenting the cereal matrix in two buckwheat content modalities (50 and 10g/L). In addition, the fermentation duration of 25 days and the successive fermentations over seven weeks allow the study of the stability of the beverage over time. The pH is the marker of acidification of the environment and safety of the drink. The kinetics of organic compounds (sugars, ethanol and organic acids) by spectrophotometry conduct to the study of the microbial community's development during the fermentation. The study of the volatile organic compounds of the beverage by GC-MS SBSE chromatography (stir bar sorptive extraction) allows the analysis of aromas and metabolites synthesized by the microbiome; sensory analyses highlight the appreciation and preferences of the consumer towards the beverages. The study of the kinetics of antioxidant and anti-inflammatory activities allows the evaluation of the technological properties of the beverage, as well as the evaluation of the color of the samples.

The acidification of the medium permits to highlight the synthesis of organic compounds by the microorganisms during the fermentation. The differences in fermentative yield observed between the two buckwheat concentration modalities (10 and 50g/L) are mainly due to the amount of sugars available for fermentation but also to the nutrients available from the complex sugars of the starch matrix. The successive fermentations of the beverages show a slower acidification of the medium, inducing a slowdown of some metabolic pathways (cellulose production for instance). The study of volatile organic compounds shows the analysis of production kinetics of potentially aromatic compounds such as esters, aldehydes, ketones, terpenes, ... from carboxylic acids and alcohols in particular. The synthesis of these aromas evolves during fermentation, reflecting the activity of microorganisms to use multiple fermentative pathways in search of an optimal environment for their development.

Consumers appreciate the beverage with the highest buckwheat concentration for its fruity (citrus), green, fatty/waxy/creamy, spicy/woody (mainly esters, ketones and phenols) aromas, as well as for its acidity, predominant roasted hazelnut aroma (pyrazines of *sobacha*), acidity intensity and taste. Opposite consumers appreciate rather the drink less concentrated in buckwheat for its sour, floral, sulphurous/grilled, fruity (melon), green notes (carboxylic acids, esters and alcohols mainly) but also for its color, freshness and sparkle.

The colorimetric analyses allow to underline that the color of the drinks darkens with the acidification of the environment. Indeed, although the color is mainly linked to the color of the starting substrate, the activity of synthesis of compounds by the microbiome seems to bring turbid to the drinks.

The antioxidant and anti-inflammatory powers present in the starting cereal matrix are maintained by the fermentation. The latter also exhibits these activities through the synthesis of natural bioactive compounds during the acidification of the medium. On the other hand, the coexistence of several forms of biological activities during successive fermentations is not certified; related to the adaptation and specification of the microbiome of the beverage over time.

**Keywords:** Functional beverage; *sobacha*; buckwheat; antioxidant; anti-inflammatory; fermentation; physicochemical characteristics; volatile organic compounds; sensory analysis

## Résumé

Ce projet de recherche est axé sur l'étude et le développement d'une boisson fonctionnelle à base de *sobacha*. Cette matrice céréalière est une infusion de graines de sarrasin torrifiées largement consommée dans les pays asiatiques pour ses vertus sur la santé. Issue d'un savoir-faire japonais de torrification du sarrasin, la matrice présente des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes importantes.

La fermentation est envisagée par l'inoculation d'une culture symbiotique de bactéries et de levures (SCOBY) dans la matrice céréalière. Le plan expérimental vise à fermenter la matrice céréalière selon deux modalités de teneur en sarrasin (50 et 10g/L). De plus, la durée de fermentation d'une part de 25 jours et d'autre part étalée en fermentations successives sur sept semaines permet l'étude de la stabilité de la boisson dans le temps. Le pH est le marqueur d'acidification du milieu et de sécurité de la boisson. Les cinétiques des dosages en composés organiques (sucres, éthanol et acides organiques) par spectrophotométrie permettent l'étude du développement de la communauté microbienne au cours de la fermentation. L'étude des composés organiques volatils de la boisson par chromatographie GC-MS SBSE (extraction par sorption sur barreau magnétique) permettent l'analyse des arômes et des métabolites synthétisés par le microbiome ; des analyses sensorielles mettent en lumière l'appréciation et les préférences du consommateur vis-à-vis des boissons. L'étude des cinétiques des pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires permettent l'évaluation des propriétés technologiques de la boisson, tout comme l'évaluation de la couleur des échantillons.

L'acidification du milieu permet de mettre en lumière la synthèse de composés organiques par les microorganismes au cours de la fermentation. Les différences de rendement fermentaire observées entre les deux modalités de concentration en sarrasin proviennent principalement de la quantité de sucres disponibles pour la fermentation mais également des nutriments disponibles provenant des sucres complexes de la matrice amidonnée. Les fermentations successives des boissons démontrent une acidification plus lente du milieu, induisant un ralentissement de certaines voies métaboliques (production de cellulose par exemple). L'étude des composés organiques volatils démontre l'analyse de cinétiques de production de composés potentiellement aromatiques tels que les esters, aldéhydes, cétones, terpènes, ... au départ d'acides carboxyliques et alcools notamment. La synthèse de ces arômes évolue au cours de la fermentation, traduisant de l'activité des microorganismes à utiliser des voies fermentaires multiples dans la recherche d'un milieu optimal pour leur développement.

Les consommateurs apprécient la boisson la plus concentrée en sarrasin pour ses arômes fruités (agrumes), notes vertes, gras/cireux/crémeux, épicé/boisé (esters, cétones et phénols principalement) ainsi que pour son acidité, arôme de noisette torréfié prédominant (pyrazines du *sobacha*), intensité de l'acidité et goût. Les consommateurs opposés apprécient plutôt la boisson la moins concentrée en sarrasin pour ses arômes sûr/aigre, floral, sulfureux/grillé, fruités (melon), notes vertes (acides carboxyliques, esters et alcools principalement) mais également pour sa couleur, fraîcheur et pétillance. Les analyses colorimétriques permettent de souligner que la couleur des boissons se fonce avec l'acidification du milieu. En effet, bien que la couleur soit majoritairement liée à celle du substrat de départ, l'activité de synthèse de composés par le microbiome semble apporter un trouble aux boissons.

Les pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires présents dans la matrice céréale de départ sont maintenus par la fermentation. Cette dernière présente également ces activités par la synthèse de composés naturels bioactifs au cours de l'acidification du milieu. En revanche, la coexistence de plusieurs formes d'activités biologiques au cours de fermentations successives n'est pas certifiée ; liée à l'adaptation et spécification du microbiome de la boisson au cours du temps.

**Mots-clés :** Boisson fonctionnelle ; *sobacha* ; sarrasin ; antioxydant ; anti-inflammatoire ; fermentation ; caractéristiques physico-chimiques ; composés organiques volatils ; analyse sensorielle



## Table des matières

Remerciements.....	5
Abstract.....	6
Résumé.....	7
Table des matières.....	8
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux additionnels.....	13
Liste des figures additionnelles.....	14
Liste des abréviations.....	15
État de l’art.....	16
I.    La fermentation dans le domaine de l’agro-alimentaire.....	16
1.    Définition de la fermentation.....	16
2.    Microbiologie de la fermentation.....	17
3.    Développement d’aliments bio-fonctionnels respectueux de la santé du consommateur	18
II.    Le kombucha, boisson fermentée santé à base de thé.....	18
1.    Description du kombucha.....	18
2.    Facteurs de variation et paramètres d’analyse des boissons fermentées.....	21
III.   Le sobacha : infusion de kasha provenant du Japon.....	22
1.    Description du kasha et du sobacha.....	22
2.    Propriétés de l’infusion sobacha.....	24
3.    Les procédés de traitement des graines destinées à l’infusion (analyse des brevets disponibles).....	25
IV.   Développement d’une boisson fermentée santé : l’ <i>Hakko sobacha</i> .....	26
1.    Fermentation sur matrice de type céréale.....	26
2.    Développement d’arômes au cours de la fermentation et variations des profils aromatiques.....	27
Matériel et méthode.....	29
I.    Préparation du sobacha.....	29
II.   Préparation de l’hakko sobacha.....	29
III.  Évaluation de la stabilité et de la répétabilité de la boisson par fermentations successives.....	30
IV.  Caractérisation physico-chimique de l’hakko sobacha.....	30
1.    Mesures de pH.....	30
2.    Dosages des composants principaux par spectrophotométrie.....	30
3.    Analyses colorimétriques.....	31
4.    Analyses des composés organiques volatils par GC-MS.....	31
5.    Analyses des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de la boisson par spectrophotométrie.....	32

6. Analyses sensorielles .....	32
Résultats et discussions .....	34
I. Présentation du schéma expérimental .....	34
II. Caractérisation physico-chimique de l'hakko sobacha .....	34
1. Mesures de pH .....	34
2. Dosages des composants principaux par spectrophotométrie .....	37
3. Analyses colorimétriques .....	43
4. Analyses des composés organiques volatils par GC-MS .....	47
a. Analyse des COV présents dans la matrice sobacha.....	47
.....	49
.....	49
b. Etude statistique des cinétiques de développement des COV au cours de la fermentation des échantillons #3.....	49
c. Analyse des cinétiques de développement des COV au cours des fermentations successives	56
d. Comparaison qualitative des COV contenus dans la boisson à ceux composant le kombucha de référence .....	61
5. Analyses des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires.....	62
6. Analyses sensorielles .....	66
a. Evaluation hédonique et préférences du consommateur .....	66
b. Profil flash.....	69
Contribution personnelle.....	72
Conclusion et perspectives.....	73
Références bibliographiques .....	75
Annexes.....	82
Annexe 1 : Protocoles détaillés des dosages de sucres, alcool et acides organiques par spectrophotométrie.....	82
Annexe 2 : Formulaire distribué aux sujets participant à l'analyse sensorielle reprenant les tests discriminatif et hédonique de l'étude.....	86
Annexe 3 : Formulaire distribué aux sujets participant au profil flash de l'étude.....	92
Annexe 4 : Données brutes se référant aux mesures de pH effectuées sur les expériences #2 et #3.....	93
Annexe 5 : Données brutes se référant aux dosages des molécules majoritaires par spectrophotométrie effectuées sur les expériences #2 et #3.....	94
Annexe 6 : Données brutes des mesures de colorimétrie effectuées sur les expériences #2 et #3.....	96
Annexe 7 : Données brutes d'identification des composés organiques volatils analysés par GC-MS.....	98
Annexe 8 : Données brutes relatant des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires .....	113

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Exemples de denrées fermentées en lien avec le substrat et les microorganismes impliqués dans la fermentation (adaptation de Sharma et al. (2020) <sup>9</sup> ) .....	17
<b>Tableau 2.</b> Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de sobacha #1 (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha) .....	48
<b>Tableau 3.</b> Moyennes des proportions (% d'aire sous la courbe) des COV identifiés des échantillons #3.1 (50g/L en kasha) (n=3) .....	50
<b>Tableau 4.</b> Moyennes des proportions (% d'aire sous la courbe) des COV identifiés des échantillons #3.2 (10g/L en kasha) (n=3) .....	51
<b>Tableau 5.</b> Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #2.1 (50g/L en kasha) .....	57
<b>Tableau 6.</b> Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #2.2 (10g/L en kasha) .....	59

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Illustration d'une boisson fermentée à base de thé (kombucha) et de son biofilm (SCOBY) <sup>24</sup> .....	19
<b>Figure 2.</b> Diagramme de flux simplifié de la préparation d'une boisson type kombucha (adaptation de Watawana et al. (2015) <sup>20</sup> ) .....	19
<b>Figure 3.</b> Schéma des mécanismes réactionnels du métabolisme des substrats par le SCOBY <sup>24</sup> .....	20
<b>Figure 4.</b> Evolution du pH (a) et des acides totaux (g/L) (b) en fonction de la durée de fermentation du kombucha, de la température et de la concentration de l'inoculum <sup>17</sup> .....	21
<b>Figure 5.</b> Evolution des sucres (g/L) (saccharose (a) ; glucose (b) et fructose (c)) en fonction de la durée de fermentation du kombucha, de la température et de la concentration de l'inoculum <sup>17</sup> ..	21
<b>Figure 6.</b> Evolution du taux d'acide ascorbique en fonction de la durée de fermentation du kombucha et de la température <sup>17</sup> .....	22
<b>Figure 7.</b> Illustration des parties aériennes (fleurs et fruits) du sarrasin commun <sup>67</sup> .....	23
<b>Figure 8.</b> Illustration de graines de sarrasin commun <sup>67</sup> .....	23
<b>Figure 9.</b> Illustration de kasha (graines de sarrasin torréfiées prêtes à infuser) <sup>72</sup> .....	23
<b>Figure 10.</b> Structures chimiques des molécules de quercétine (Q), isoquercétine (I) et rutine (R) <sup>43</sup> .....	24
<b>Figure 11.</b> Diagramme de flux simplifié du procédé de préparation de sobacha (adaptation de Qin et al. (2011) <sup>70</sup> ) .....	25
<b>Figure 12.</b> Diagrammes de flux simplifiés soulignant l'évolution de la préparation des kasha référencés dans les brevets (étapes colorées similaires et essentielles) <sup>82-84</sup> .....	26
<b>Figure 13.</b> Nombre total de bactéries et de levures (UFC) cultivées à partir de kombucha en fonction de la durée de fermentation <sup>39</sup> .....	27
<b>Figure 14.</b> Profils sensoriels de boissons de type kombucha établis en fonction de la température de fermentation (K20-K25-K30 : échantillons de kombucha fermentés à 20-25 et 30°C ; o: odeur, int: intensité et f: saveur) <sup>21</sup> .....	28
<b>Figure 15.</b> Schéma expérimental de l'étude .....	34
<b>Figure 16.</b> Evolution du pH des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10 g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3) .....	35
<b>Figure 17.</b> Evolution du pH des échantillons d'hakko sobacha #2.1 (concentration 50g/L de sarrasin) au cours de fermentations successives (série) .....	36
<b>Figure 18.</b> Evolution du pH des échantillons d'hakko sobacha #2.2 (concentration 10g/L de sarrasin) au cours de fermentations successives (série) .....	36
<b>Figure 19.</b> Photographie des SCOBY en cours de fermentation (a) échantillon #2.1 série 4 (b) échantillon #2.1 série 5 (c) échantillon #2.1 série 5 Thé (#2.1 correspond à 50g/L de sarrasin) .....	36

<b>Figure 20.</b> Evolution du taux de sucres totaux (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	37
<b>Figure 21.</b> Evolution du taux de sucres totaux (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) .....	37
<b>Figure 22.</b> Evolution du taux de saccharose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	38
<b>Figure 23.</b> Evolution du taux de saccharose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) .....	38
<b>Figure 24.</b> Evolution du taux de glucose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha #3 en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	39
<b>Figure 25.</b> Evolution du taux de glucose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) ...	39
<b>Figure 26.</b> Evolution du taux de fructose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	40
<b>Figure 27.</b> Evolution du taux de fructose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) ...	40
<b>Figure 28.</b> Evolution du taux d'éthanol (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	41
<b>Figure 29.</b> Evolution du taux d'éthanol (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (ND : non détecté) .....	41
<b>Figure 30.</b> Evolution du taux d'acide acétique (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	42
<b>Figure 31.</b> Evolution du taux d'acide acétique (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (ND : non détecté) .....	42
<b>Figure 32.</b> Evolution du taux d'acide lactique (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	43
<b>Figure 33.</b> Evolution de la clarté L* des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3 ; T test; ****, P < 0.0001 ; ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05; ns, non-significatif) .....	44
<b>Figure 34.</b> Evolution de la clarté L* des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	44
<b>Figure 35.</b> Evolution de la composante chromatique a* des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	45
<b>Figure 36.</b> Evolution de la composante chromatique a* des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	45
<b>Figure 37.</b> Evolution de la composante chromatique b* des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3) .....	46

<b>Figure 38.</b> Evolution de la composante chromatique b* des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (moyenne ± écart-type ; n=3).....	46
<b>Figure 39.</b> Photographie illustrant la couleur des boissons #2.1 (50g/L en kasha) et #2.2 (10g/L) série 5 en fin de F2.....	46
<b>Figure 40.</b> Représentation graphique de la proportion des familles de COV (%aire) du sobacha (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha).....	49
<b>Figure 41.</b> Comparaison qualitative <sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons de sobacha (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha).....	49
<b>Figure 42.</b> Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#3.1 : 50g/L en kasha) au cours de la fermentation .....	53
<b>Figure 43.</b> Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#3.2 : 10 g/L en kasha) au cours de la fermentation .....	53
<b>Figure 44.</b> Représentation graphique des variables COV (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L en kasha) et des clusters d'échantillons dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les ellipses jaunes font référence à celles obtenues dans la dimension 3) ....	54
<b>Figure 45.</b> Représentation graphique des variables COV (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L en kasha) dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan).....	55
<b>Figure 46.</b> Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#2.1 : 50g/L en kasha) au cours des fermentations successives (série).....	60
<b>Figure 47.</b> Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#2.2 : 10g/L en kasha) au cours des fermentations successives (série).....	60
<b>Figure 48.</b> Comparaison qualitative <sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons de l'expérience #2 (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha).....	61
<b>Figure 49.</b> Comparaison qualitative <sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons #2 (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha) de la série 5 Thé .....	61
<b>Figure 50.</b> Comparaison qualitative <sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons d'hakko sobacha (#3) (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L en kasha) et de kombucha <sup>21</sup> .....	62
<b>Figure 51.</b> Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3 ; T test; ****, P < 0.0001 ; ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05; ns, non-significatif) .....	63
<b>Figure 52.</b> Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) de standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL) .....	63
<b>Figure 53.</b> Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha) et de fermentations successives (série).....	64
<b>Figure 54.</b> Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3 ; T test; ****, P < 0.0001 ; ***, P < 0.001; **, P < 0.01; *, P < 0.05; ns, non-significatif) .....	65
<b>Figure 55.</b> Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) de standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL) .....	65
<b>Figure 56.</b> Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) des échantillons d'hakko sobacha #2 en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série).....	65
<b>Figure 57.</b> Représentation graphique des échantillons de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 (ACP) classés par couleur en fonction de la variable Genre.....	66
<b>Figure 58.</b> Représentation graphique des échantillons de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 (ACP) classés par couleur en fonction de la variable Tranche d'âge .....	66
<b>Figure 59.</b> Représentation graphique des variables de l'évaluation hédonique et des clusters d'échantillons dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence à la boisson #3.1 (50g/L kasha) et celles suivies	

d'un « 2 » la boisson #3.2 (10g/L kasha) ; les ellipses jaunes font référence à celles obtenues dans la dimension 3)..... 67

**Figure 60.** Représentation graphique des variables de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence à la boisson #3.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » la boisson #3.2 (10g/L kasha)) ..... 68

**Figure 61.** Classification hiérarchique des échantillons de l'évaluation hédonique en clusters dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan) ..... 69

**Figure 62.** Représentation graphique des variables du profil flash et des clusters d'échantillons dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence aux boissons #2.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » aux boissons #2.2 (10g/L kasha)) ..... 70

**Figure 63.** Représentation graphique des variables du profil flash dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence aux boissons #2.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » aux boissons #2.2 (10g/L kasha)) ..... 71

**Figure 64.** Classification hiérarchique des échantillons du profil flash en clusters dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan) ..... 71

## Liste des tableaux additionnels

<b>Tableau additionnel 1.</b> Mesures de pH des échantillons #2.1 (/ =non mesuré) .....	93
<b>Tableau additionnel 2.</b> Mesures de pH des échantillons #2.2 (/ =non mesuré) .....	93
<b>Tableau additionnel 3.</b> Moyennes et écart-types des mesures de pH des échantillons #3 (n=3 ; / =non mesuré) .....	93
<b>Tableau additionnel 4.</b> Dosages par spectrophotométrie des composés majoritaires effectués sur les échantillons #1 et #2 (/ =non mesuré).....	94
<b>Tableau additionnel 5.</b> Moyennes et écarts-type des dosages par spectrophotométrie des composés majoritaires effectués sur les échantillons #3 (n=3 ; / = non mesuré).....	94
<b>Tableau additionnel 6.</b> Mesures de colorimétrie (dimension LAB) effectuées en 3 répétitions sur les échantillons de l'expérience #3 (n=3) .....	96
<b>Tableau additionnel 7.</b> Moyennes et écarts-types des mesures de colorimétrie (dimension LAB) effectuées sur les échantillons de l'expérience #2 (n=3).....	97
<b>Tableau additionnel 8.</b> Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #3.1 .....	98
<b>Tableau additionnel 9.</b> Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #3.2 .....	105
<b>Tableau additionnel 10.</b> Moyennes et écarts-types des mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des échantillons de l'expérience #1 et #3 (n=3 ; / =non mesuré).....	113
<b>Tableau additionnel 11.</b> Mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des échantillons de l'expérience #2 .....	113
<b>Tableau additionnel 12.</b> Mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL).....	113
<b>Tableau additionnel 13.</b> Moyennes et écarts-types des mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des échantillons de l'expérience #1 et #3 (n=3 ; / =non mesuré) .....	114
<b>Tableau additionnel 14.</b> Mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des échantillons de l'expérience #2 .....	114
<b>Tableau additionnel 15.</b> Mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL).....	115

## Liste des figures additionnelles

<b>Figure additionnelle 1.</b> Représentation de l'espace chromatique $L^*a^*b^*$ .....	96
---	----

## Liste des abréviations

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
MO	Microorganisme
SCOBY	<i>Symbiotic culture of bacteria and yeast</i>
F1	Première fermentation
F2	Seconde fermentation
AAB	<i>Acetic acid bacteria</i>
HSGC	<i>Headspace gas chromatography</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
DPPH	2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle
FRAP	<i>Ferric reducing oxidant power</i>
AGE	Produits finaux de glycation avancée
LOX	Lipoxygénase
BSA	<i>Bovin serum albumin</i>
COX-2	Cyclooxygénase-2
HR	Humidité relative
UFC	Unité formant colonie
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
COV	Composé organique volatil
GC-MS	<i>Gas chromatography – Mass spectrometry</i>
HS-SPME	<i>Headspace – solid method microextraction</i>
SPME	<i>Solid phase microextraction</i>
SDE	<i>Simultaneous distillation – extraction</i>
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i>
PDMS	Polydiméthylsiloxane
J	Jour
ACN	Acétonitrile
OAV	<i>Odor activity value</i>
ACP	Analyse en composantes principales
ISO	Organisation internationale de normalisation



# État de l'art

## I. La fermentation dans le domaine de l'agro-alimentaire

### 1. Définition de la fermentation

La fermentation est la transformation naturelle d'une substance organique sous l'action d'enzymes produites par des microorganismes. Cette réaction biochimique de conversion de l'énergie chimique contenue dans une source de carbone (glucose majoritairement) en une autre forme d'énergie est directement utilisable par la cellule et ce, en l'absence de dioxygène<sup>1</sup>. La fermentation est la méthode la plus ancienne et la plus économique de production et de conservation des aliments<sup>2</sup>.

C'est au cours du XIX<sup>ème</sup> siècle que deux événements ont modifié la manière dont les fermentations alimentaires étaient réalisées ainsi que la compréhension du processus. Premièrement, la révolution industrielle a entraîné la concentration de grandes masses de population dans les villes. En conséquence, les aliments ont dû être fabriqués en grande quantité, nécessitant l'industrialisation du processus de fabrication. En deuxième lieu, l'épanouissement de la microbiologie en tant que science dans les années 1850 a formé la base biologique de la fermentation et le procédé fut réellement compris pour la première fois<sup>3</sup>. Dès lors, le procédé de fermentation fut développé à nouveau et utilisé à travers le monde<sup>4</sup>. De plus, c'est un moyen naturel de réduire le volume de matière à transporter, d'éliminer les composants indésirables, d'améliorer la valeur nutritive et l'apparence des aliments, de réduire l'énergie nécessaire à la cuisson et d'améliorer la qualité du produit<sup>5</sup>. Ces activités de fermentation sont utilisées dans la production d'aliments et de boissons, définis comme des produits ayant été subordonnés par l'activité de micro-organismes ou d'enzymes pour provoquer des modifications biochimiques désirées. Les micro-organismes responsable peuvent provenir de la microflore indigène présente sur le substrat (fermentation spontanée) mais également être introduits en guise de cultures starters (fermentation dirigée)<sup>6</sup>.

Ainsi, l'exploitation de la fermentation permet la conservation et la transformation de denrées alimentaires, afin d'en améliorer leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques<sup>7</sup>. De plus, l'inactivation de facteurs antinutritionnels, l'amélioration de la digestibilité et l'ingestion de microorganismes vivants pouvant interagir avec le microbiote intestinal sont des caractéristiques faisant des aliments fermentés un atout pour la santé. Ce bénéfice santé explique en grande partie le regain d'intérêt actuel du consommateur pour les produits fermentés. Ces derniers sont produits dans le monde à l'aide de diverses techniques de fabrication, de matières premières et de micro-organismes.

Les principaux types de fermentation sont les fermentations alcoolique, lactique et acétique<sup>7</sup>. Ils sont classés en fonction des « déchets » produits et des ferments impliqués. La fermentation alcoolique (le vin et la bière par exemple) entraîne la production d'éthanol (et du dioxyde de carbone) en milieu anaérobie et les levures sont les organismes prédominants. La fermentation lactique (pour les produits laitiers, les céréales, et la lactofermentation) est principalement réalisée par des bactéries lactiques, en milieu anaérobie : elle conduit à la formation d'acide lactique. Un deuxième groupe de bactéries importantes dans les fermentations alimentaires sont les producteurs d'acide acétique du genre *Acetobacter* ; ces derniers convertissent l'alcool en acide acétique en présence d'un excès d'oxygène (milieu aérobie). Les fermentations propionique et malolactique (plus anecdotiques) assurées par les bactéries, sont des sous-catégories des fermentations lactique et alcoolique respectivement. La fermentation propionique (fabrication du fromage essentiellement) utilise une grande diversité de substrats tels que les sucres, le glycérol ainsi que les acides lactique et malique<sup>8</sup>. La fermentation malolactique (vin et cidre essentiellement) convertit quant à elle l'acide malique en acide lactique.

## 2. Microbiologie de la fermentation

La diversité des microorganismes retrouvés dans les denrées fermentées est considérable et présentée en Table 1<sup>9</sup>. Ils peuvent être classés en deux types de flores<sup>10</sup>. Premièrement, la flore *utile* ou *positive*, que l'on cherche à favoriser et qui induit les différents processus de fermentation ; elle peut se trouver naturellement dans l'aliment, ou être ajoutée lors des procédés de fabrication. Deuxièmement, la flore *indésirable* ou *négative*, que l'on cherche à inhiber, cette fois-ci à l'origine de la *putréfaction*. Elle-même se divise en deux catégories. D'une part, la flore d'altération correspond aux microorganismes pouvant se développer et entraîner des changements physiques et chimiques dans l'aliment, conduisant alors à des odeurs et saveurs désagréables, à la formation de mucosités, à l'accumulation de gaz, et à la libération de liquide. Il y a alors dégradation de la qualité gustative et/ou esthétique de l'aliment considéré. D'autre part, la flore pathogène regroupe les microorganismes nuisibles pour la consommation humaine, et ce à faible concentration. En cas d'ingestion, l'aliment peut être source d'intoxication alimentaire<sup>11,12</sup>.

**Tableau 1.** Exemples de denrées fermentées en lien avec le substrat et les microorganismes impliqués dans la fermentation (adaptation de Sharma et al. (2020)<sup>9</sup>)

Aliments/Boissons fermentées	Substrats utilisés	Microorganismes impliqués dans la fermentation
<u>Produits laitiers</u> Caillé, Yogourt, Fromage, Yakult, Kéfir	Lait et Caséine du lait	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. thermophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<u>Aliments à base de légumes</u> Kimchi, Tempeh, Natto, Miso, Choucroute	Soja, Chou, Gingembre, Concombre, Brocoli, Radis	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Thermotoga sp.</i> , <i>L. hokkaidonensis</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Bifidobacterium dentium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Weissella confusa</i> , <i>Candida sake</i>
<u>Aliments à base de céréales</u> Bahtura, Ambali, Chilra, Dosa, Kunu-Zaki, Marchu	Blé, Maïs, Sorgho, Millet, Riz	<i>L. pantheris</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Trichosporon pullulans</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Delbrueckii hansenii</i> , <i>Deb. tamari</i>
<u>Boissons</u> Vin, Bière, Kombucha, Sake	Raisins, Riz, Céréales	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Acetobacter pasteurianus</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Acetobacter xylinus</i> , <i>Komagataeibacter xylinus</i>
<u>Aliments à base de viande</u> Sucuk, Salami, Arjia, Jama, Nham	Viande	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Leuconostoc gelidium</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>L. divergens</i> , <i>L. carnis</i> , <i>E. cecorum</i> , <i>B. lentus</i>

Traditionnellement, le terme « ferment » se définit comme un « agent microbien produisant la fermentation d'une substance ». Ils font donc partie de la flore utile. L'enjeu principal en agroalimentaire est donc de sélectionner la flore utile et d'éliminer la flore indésirable<sup>13</sup>. Pour ce faire, les conditions spécifiques de fermentation telles que la température, le pH, la pression osmotique (intimement liée à la concentration en sucre), le taux d'oxygène et la tolérance alcoolique vont permettre d'orienter la fermentation (au détriment de la putréfaction) en favorisant le développement de certaines espèces par rapport à d'autres<sup>14</sup>. En effet, les germes pathogènes et spores (*Clostridium sp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*) ne peuvent se développer à des pH inférieurs à 4,5 tandis que l'optimum de croissance des MO acidophiles bénéfiques (bactéries acétiques et lactiques, levures, moisissures) se situe dans ces valeurs<sup>15</sup>.

### **3. Développement d'aliments bio-fonctionnels respectueux de la santé du consommateur**

La demande croissante de mise au point d'aliments fonctionnels sur le marché, c'est-à-dire satisfaisant la faim et l'apport de nutriments, mais également permettant la prévention de maladies chroniques et l'amélioration de la santé physique et mentale, est en constante augmentation. Les probiotiques (apport en MO bénéfiques dans le microbiote intestinal) en sont un exemple de produit alimentaire largement consommé<sup>16,17</sup>. En effet, ils représentent 60 à 70% du marché des aliments fonctionnels<sup>18</sup>. Les prébiotiques quant à eux, sont des fibres alimentaires à courte chaîne non digestibles par les enzymes du métabolisme humain mais consommées par les bactéries bénéfiques présentes dans l'intestin de celui-ci<sup>19</sup>. Ainsi, en plus de stimuler la croissance de la microflore bénéfique, ils ont des effets directs sur la satiété et la barrière intestinale. Une consommation régulière induit un effet bénéfique sur la santé de l'hôte. De plus, le marché des probiotiques est en pleine expansion, ouvrant de nouvelles opportunités de substrats non laitiers. Ainsi, les substrats céréaliers sont des candidats prometteurs pour la croissance de souches lactobacilles et bifidobactéries. En effet, la tolérance des micro-organismes aux conditions spécifiques du tube digestif est améliorée par les composés du substrat céréale, permettant une croissance simultanée de plusieurs micro-organismes probiotiques<sup>16</sup>.

D'autre part, le kombucha a acquis une immense popularité ces dernières années en raison de ses nombreux avantages pour la santé. Il s'agit d'un thé fermenté pétillant, contenant un faible taux de sucre et présentant une alternative saine aux sodas industriels. Ainsi, les effets thérapeutiques de cette boisson sont dérivés de la composition chimique de celle-ci, et principalement des polyphénols et des métabolites secondaires produits lors de la fermentation. Cependant, les aspects de sécurité de la boisson doivent également être pris en compte lors de la qualification de la boisson en tant qu'aliment fonctionnel<sup>20</sup>.

Le sarrasin est utilisé comme plante médicinale efficace dans la thérapie traditionnelle chinoise, dans le traitement de nombreuses maladies depuis plus de 1000 ans<sup>21</sup>. De nos jours, il s'est imposé comme matière première et additif alimentaire fonctionnel en raison de ses propriétés nutritionnelles bénéfiques. Dès lors, la formulation d'un aliment bio-fonctionnel basé sur le sarrasin comme substrat fermentescible (via une fermentation de type kombucha) s'avère être une alternative originale et prometteuse aux sodas artificiels.

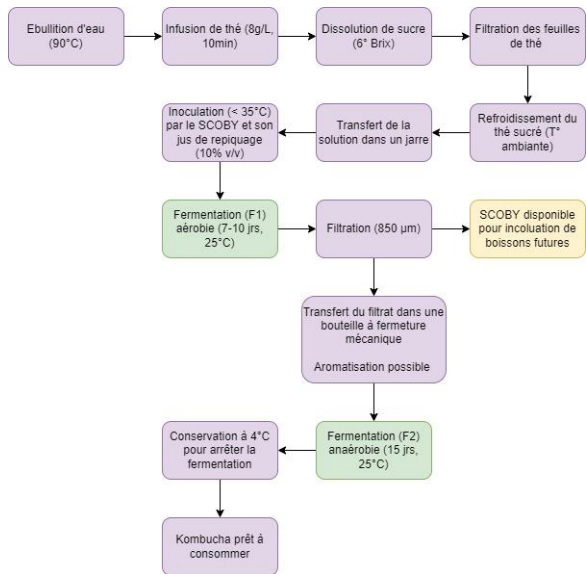
## **II. Le kombucha, boisson fermentée santé à base de thé**

### **1. Description du kombucha**

Le *kombucha* (du japonais « Algue de thé ») est une boisson ayant les caractéristiques d'un aliment fonctionnel. Originnaire de la Chine, de la Corée et du Japon (220 avant J-C), elle est populaire pour ses propriétés détoxifiantes, anti-oxydantes et énergisantes mais également contre les problèmes digestifs<sup>17,22</sup>. Cette boisson rafraîchissante (Figure 1), ressemblant à un cidre de pomme pétillant, provient de la fermentation du thé sucré, provoquée par l'activité de bactéries et de levures<sup>23</sup>. Cette association est une culture symbiotique appelée SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), qui désigne plus communément la substance gélatineuse qui se développe à la surface du kombucha en cours de fermentation<sup>24</sup>.



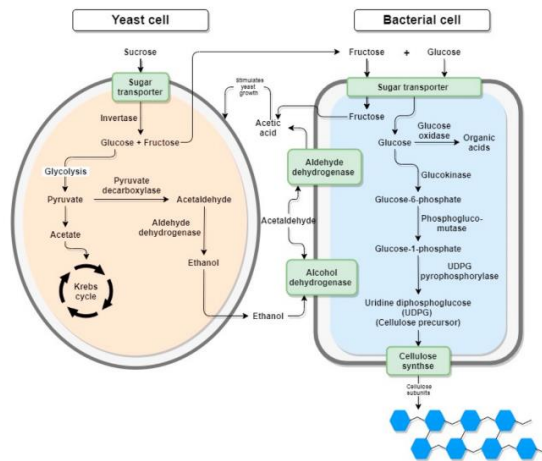
**Figure 1.** Illustration d'une boisson fermentée à base de thé (kombucha) et de son biofilm (SCOBY)<sup>24</sup>



**Figure 2.** Diagramme de flux simplifié de la préparation d'une boisson type kombucha (adaptation de Watawana et al. (2015)<sup>20</sup>)

Aujourd'hui, le kombucha est une des boissons fermentées les plus populaires parmi de nombreux aliments fermentés traditionnels<sup>25,26</sup>. La fermentation type « kombucha » est une combinaison des fermentations alcoolique, lactique et acétique puisque plusieurs levures et bactéries coexistent dans le milieu et le produit de l'un est le substrat de l'autre<sup>25</sup>. Les principaux acides organiques synthétisés lors de la fermentation sont l'acide lactique (acidité douce, telle que le yaourt) et l'acide acétique (souvent associé au goût du vinaigre). La boisson est généralement fermentée une première fois pendant 7 à 10 jours en milieu aérobie (Figure 2). Les bactéries acétiques développent une pellicule cellulosique (biofilm) flottant à la surface du liquide fermenté, et dont les rôles sont multiples : barrière physique avec l'air, inoculation d'un nouveau kombucha<sup>27</sup>. L'éthanol et l'acide acétique présents dans le kombucha seraient impliqués dans l'activité antimicrobienne du jus contre les bactéries pathogènes, offrant ainsi une protection supplémentaire au SCOBY contre la contamination du champignon du thé<sup>28</sup>. Bien que de l'éthanol soit produit au cours de la fermentation, le kombucha n'est pas considérée comme une boisson alcoolisée car le taux d'alcool est inférieur à 1,2% : seuil légal à partir duquel une boisson est considérée comme alcoolisée (*Article 16 de la Loi du 7 janvier 1998 portant sur la structure et les taux des droits d'accise sur l'alcool et les boissons alcoolisées*)<sup>29</sup>.

Suite à l'inoculation du thé sucré par ensemencement avec le SCOBY et son jus de repiquage, les levures hydrolysent le saccharose en glucose et en fructose, produisant de l'éthanol comme métabolite principal<sup>13,30</sup>, tandis que les bactéries acétiques (AAB) convertissent le glucose en acide gluconique et le fructose en acide acétique<sup>24</sup> (Figure 3). En d'autres termes, le métabolisme de la levure est capable de produire de l'éthanol qui est ensuite oxydé en acétaldéhyde par l'homologue bactérien de cette colonie<sup>31</sup>. Les levures préfèrent le glucose comme substrat lors de la production d'éthanol<sup>22</sup>. Les deux métabolites principaux catalysent les réactions principales<sup>32</sup>. Ainsi, l'acide acétique produit par les AAB a la capacité de stimuler la production d'éthanol par la levure, et l'éthanol à son tour peut faciliter la croissance et la production d'acide acétique par les AAB. De plus, ces dernières dominent généralement la communauté bactérienne de kombucha, entraînant le processus de fermentation<sup>27</sup>. Une quantité résiduelle de fructose reste non fermentée pendant ce processus<sup>22</sup>. D'autre part, parmi les principaux constituants du kombucha, l'acide gluconique est considéré comme le principal agent thérapeutique<sup>33</sup>. Une seconde fermentation de carbonatation (15 jours en conditions anaérobies) induit l'effervescence de la boisson<sup>25</sup>.



**Figure 3.** Schéma des mécanismes réactionnels du métabolisme des substrats par le SCOBY <sup>24</sup>

Jusqu'à présent, peu d'espèces d'AAB ont été identifiées par des études dépendantes de la culture : les espèces d'*Acetobacter* dominent généralement<sup>28,34</sup>, les genres *Gluconacetobacter* et *Lactobacillus* ont parfois été isolés<sup>35</sup>. Cependant, les AAB sont connus pour être particulièrement difficiles à isoler par des approches dépendantes de la culture<sup>36</sup>. Parmi les AAB, *Acetobacter xylinum* (reclassé en *Gluconacetobacter xylinus*<sup>37</sup>) est considéré comme le producteur de cellulose de kombucha le plus efficace<sup>38</sup>. De nombreuses espèces de levures ont également été identifiées, principalement *Zygosaccharomyces spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Dekkera spp.* et *Pichia spp.*<sup>39-41</sup>.

Depuis peu, les levures non-*Saccharomyces* sont de plus en plus utilisées dans l'industrie dans les fermentations mixtes afin d'enrichir le profil aromatique, d'augmenter la complexité et la cinétique du produit final<sup>25,42</sup>. Les interactions microbiennes entre les levures *Saccharomyces* et non-*Saccharomyces* semblent être une option avantageuse dans le processus de fermentation mixte, ayant plusieurs avantages comme d'éviter les risques de blocage de la fermentation, l'ajout d'arômes et de saveurs, la modification de paramètres indésirables, entre autres<sup>43</sup>. Dans ce sens, l'interaction des levures de kombucha s'est avérée être un consortium qui génère des caractéristiques finales souhaitables.

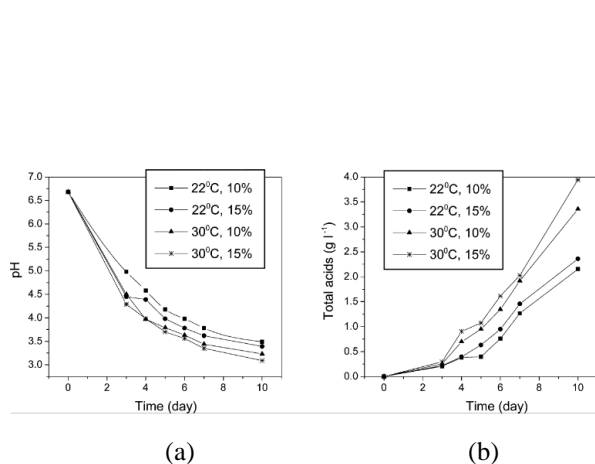
D'un point de vue analytique, la chromatographie en phase gazeuse dans l'espace de tête (HSGC) est une technique d'analyse efficace pour la détermination de la concentration en éthanol dans les boissons fermentées<sup>32,44</sup>. Le couplage possible de cette dernière à un spectromètre de masse permet la détection du contenu en éthanol dans les échantillons<sup>45</sup>. La détermination des taux d'acides organiques s'effectue notamment par chromatographie en phase liquide (HPLC) (filtration et concentration préalables) avec étalonnage externe pour la quantification<sup>46,47</sup>. La même méthode est employée pour la détermination des sucres<sup>48,49</sup> et de l'alcool<sup>45,50</sup> présents dans les boissons fermentées. La méthode de dosage des molécules d'intérêt par spectrophotométrie est à ce jour utilisée dans l'analyse de boissons fermentées, la calibration étant mise au point en fonction des spécificités de la boisson considérée. Basée sur des réactions enzymatiques de détermination d'acides organiques, de sucres et d'alcool dans les produits alimentaires, elle assure une rapidité et précision d'analyse des composants développés dans les échantillons.

Enfin, la limite légale pour être considérée comme une boisson non alcoolisée (telle que le kombucha) est de 1,2 % (v/v) d'alcool. Au-delà de ce taux, les boissons sont considérées comme alcoolisées et sont soumises aux réglementations d'Etat<sup>29</sup>. Par ailleurs, le remplacement du substrat de départ qu'est le thé par le sobacha (infusion de graines de sarrasin torréfiées), permettrait l'élimination de toute molécule active à effet thérapeutique (telle que la caféine du thé) et éviterait les effets de ces dernières sur le métabolisme<sup>51</sup>.

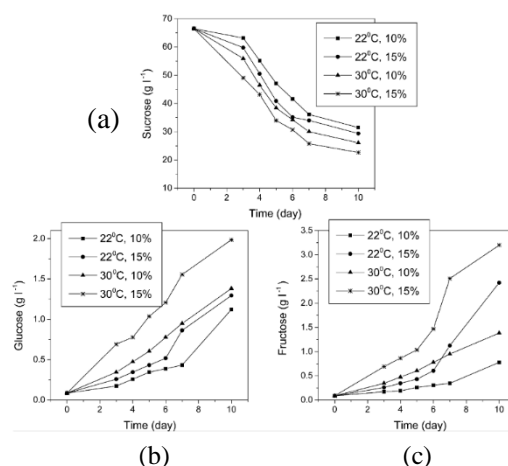
## 2. Facteurs de variation et paramètres d'analyse des boissons fermentées

De multiples facteurs peuvent affecter la concentration des différents constituants présents dans les boissons fermentées non alcoolisées. Ainsi, les teneurs initiales en matrice (substrat de départ) et en sucre<sup>52</sup>, la durée de fermentation<sup>53</sup>, la température d'incubation<sup>46</sup> et la nature de la culture de kombucha<sup>54</sup> influencent majoritairement la concentration des composants de cette boisson complexe<sup>29</sup>. Lonâr et al. (2006) souligne que la durée de fermentation est le paramètre le plus influent sur la composition des produits de la fermentation, suivi de la température et de la concentration en jus de repiquage<sup>17</sup>.

Dans un premier temps, le pH est un facteur important permettant d'assurer la stabilité microbienne face aux contaminations alimentaires. Ainsi, un pH inférieur à 3,8 permet le non-développement des microorganismes pathogènes<sup>18</sup>. Le pH diminue au cours de la fermentation, les bactéries et les levures métabolisant le saccharose en un certain nombre d'acides organiques (Figures 4 et 5) augmentant l'acidité totale<sup>46</sup>. Ce facteur va également indirectement influencer le goût de la boisson, qui présentera une acidité plus moins prononcée et qui d'autre part exhaustera certains arômes<sup>7</sup>.



**Figure 4.** Evolution du pH (a) et des acides totaux (g/L) (b) en fonction de la durée de fermentation du kombucha, de la température et de la concentration de l'inoculum<sup>17</sup>



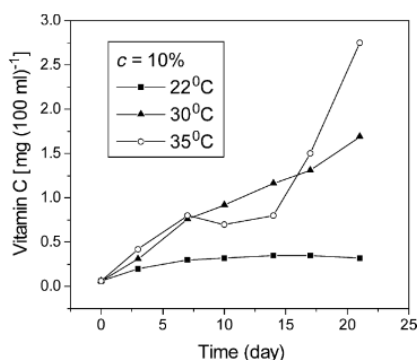
**Figure 5.** Evolution des sucres (g/L) (saccharose (a) ; glucose (b) et fructose (c)) en fonction de la durée de fermentation du kombucha, de la température et de la concentration de l'inoculum<sup>17</sup>

Par extension, l'acidité titrable est l'approximation de l'acidité totale par mesure des ions hydrogène associés et dissociés : induisant ainsi les variations opposées sur la boisson de celles considérées pour le pH<sup>18</sup>. Ainsi, la production d'acides organiques pendant la fermentation abaisse le pH du kombucha<sup>55</sup>. Il est à noter qu'un pH bas peut contribuer à une diminution de la qualité sensorielle générale de la boisson à un niveau inacceptable<sup>56</sup>. Ainsi, un vinaigre, dont le pH est inférieur à 3 se consomme comme un condiment et non comme une boisson.

Concernant le saccharose ajouté comme substrat lors de la préparation du kombucha, une concentration d'environ 50g/L donne généralement une teneur optimale à la fois en éthanol et en acide lactique en fin de fermentation<sup>46</sup>. En outre, la teneur en substrats solubles est fonction de l'extraction de sucres libres et d'acides aminés à partir de la matrice fermentescible de départ. Ainsi, la quantité d'acides aminés libres apportent un goût sucré et amer. Bien que l'amertume soit généralement décrite comme peu appréciée par le palais, certains échantillons tolèrent des petites quantités, voire l'apprécient<sup>18</sup>. De plus, la couleur de la boisson fermentée est purement liée au substrat de départ<sup>18</sup>.

Comme explicité précédemment, le kombucha présente une activité anti-oxydante importante et induit la réduction du stress oxydatif provoquant le vieillissement des cellules. Un antioxydant est dès lors toute substance présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, retardant ou inhibant significativement l'oxydation du substrat<sup>57</sup>. Cette bio-activité pourrait être plus largement définie selon les différents mécanismes pouvant entrer en jeu (1) les propriétés de piégeage des molécules, (2) la liaison des métaux pro-oxydants et (3) l'inhibition des enzymes pro-oxydantes<sup>20</sup>.

Plusieurs méthodes d'évaluation du pouvoir antioxydant sont d'application sur les boissons fermentées<sup>32,43</sup> : le piégeage des radicaux libres du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), la méthode FRAP (*Ferric reducing antioxydant power*), celle de réduction du Fer ainsi que du blanchiment des caroténoïdes. Ces quatre méthodes aux mécanismes différents sont complémentaires<sup>58-60</sup>. L'établissement d'un étalonnage externe permet la quantification des antioxydants (Figure 6) dans la matrice considérée, en rapport à des molécules standards de concentration connues<sup>17</sup>.



**Figure 6.** Evolution du taux d'acide ascorbique en fonction de la durée de fermentation du kombucha et de la température <sup>17</sup>

### III. Le sobacha : infusion de kasha provenant du Japon

#### 1. Description du kasha et du sobacha

Le thé de sarrasin appelé *sobacha* (du japonais « soba », sarrasin et « cha », thé) est une infusion largement consommé au Japon. Le sarrasin (Figure 7) est une dicotylédone ancienne cultivée dans de nombreuses régions du monde pour ses graines (Figure 8), et de nos jours également pour ses feuilles<sup>61</sup>. Cette plante appartient au genre *Fagopyrum* de la famille des Polygonaceae<sup>62</sup>. Deux espèces de sarrasin sont couramment cultivées dans le monde depuis des siècles : le sarrasin commun (*Fagopyrum esculentum* Moench 1794) et le sarrasin de Tartarie (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn 1790)<sup>21,63</sup>. Le sarrasin est cultivé pour la première fois en Asie, vers 6000 avant J-C<sup>64</sup>. La domestication a lieu dans la province chinoise du Yunnan en bordure du plateau tibétain et sur les collines himalayennes. De là, il se répand en Asie centrale et au Tibet, puis au Moyen-Orient et en Europe<sup>65,66</sup>. Le sarrasin est utilisé pour ses propriétés médicinales et nutritives. De plus, c'est une matrice alimentaire qui présente de nombreux avantages pour la santé. Il permet l'abaissement du taux de cholestérol plasmatique, la neuroprotection, possède des effets anticancéreux, anti-inflammatoires, antidiabétiques et permet une réduction de l'hypertension<sup>67</sup>. Lorsqu'il est consommé avec modération, le sarrasin n'est pas associé à des effets nocifs sur la santé. Qualifié de pseudo-céréale<sup>68</sup>, le sarrasin est une denrée intéressante pour les personnes cœliaques (souffrant de sensibilité voire d'intolérance au gluten). Cependant, certaines personnes peuvent être allergiques au sarrasin<sup>69</sup>.





**Figure 7.** Illustration des parties aériennes (fleurs et fruits) du sarrasin commun<sup>67</sup>



**Figure 8.** Illustration de graines de sarrasin commun<sup>67</sup>

Ainsi, le sobacha est un produit de santé populaire dans les pays asiatiques et européens<sup>70-72</sup>. En Corée, le thé de sarrasin est connu sous le nom de *memil-cha* et en Chine, *kuqiao-cha*. En outre, il est important de considérer la manière dont la transformation du sarrasin en thé affecte les composés bioactifs du grain<sup>67</sup>. Ainsi, avant d'être retirées de leur coque, les graines entières crues sont trempées dans l'eau, cuites à la vapeur et séchées. Ensuite, les gruaux décortiqués sont torréfiés (Figure 9) pour obtenir le kasha qui sera utilisé pour faire le thé<sup>73</sup>. Les conséquences de ces techniques de traitement thermique sur les protéines du sarrasin sont influencées par la teneur en lipides du sarrasin. Alors que les lipides permettent aux protéines du sarrasin à maintenir leur stabilité thermique, ils peuvent également provoquer la dénaturation des globulines du sarrasin. Ainsi, pour assurer la conservation des globulines lors du traitement thermique (partie instable des protéines avec la chaleur ; présentant des qualités nutritionnelles et technofonctionnelles dans l'infusion), il est nécessaire qu'une quantité minimale de lipides (6,5 %) soit présente dans le grain<sup>56</sup>. Le procédé physico-chimique d'hydrolyse des liaisons intermoléculaires de l'amidon du sarrasin en présence d'eau et de chaleur permet aux sites de liaisons hydrogène de se lier aux molécules d'eau. Ainsi, les nutriments et les sucres simples composant la graine de sarrasin sont rendus disponibles dans l'infusion.



**Figure 9.** Illustration de kasha (graines de sarrasin torréfiées prêtes à infuser)<sup>72</sup>

L'infusion s'effectue majoritairement sur base de kasha (graines de sarrasin torréfiées, prêtes à infuser), mais également à base de feuilles ou de fleurs grillés provenant de la plante de sarrasin. Il est à noter que les graines restent la source principale de nutriments et d'arômes retrouvés ensuite dans l'infusion<sup>67</sup>. De plus, les coques de sarrasin, un sous-produit dérivé de la production de produits à base de sarrasin, peuvent également être utilisées pour élaborer des infusions<sup>74</sup>. L'ajout de thés au sobacha lors de l'infusion est une pratique courante, majoritairement élaborée pour des raisons gustatives (ajout d'arômes de thé)<sup>32</sup>.



Boire du thé de sarrasin présente de nombreux avantages pour la santé, notamment en améliorant la santé cardiaque, en prévenant les complications rénales, en réduisant le risque de cancer et en encourageant la perte de poids. Les fibres solubles (pectine et autres polysaccharides principalement) libérées lors de l'infusion participent à la normalisation de la glycémie, de l'insulinémie ainsi que de la cholestérolémie<sup>66</sup>. Les fibres insolubles quant à elles permettent la mise en place d'un transit digestif optimal. La teneur en minéraux tels que le magnésium permet la réduction du stress oxydatif. Le thé de sarrasin contient peu de calories et constitue donc un substitut aux thés<sup>34</sup>. De plus, le sobacha peut être consommé en grande quantité puisqu'il ne contient pas de molécule active stimulante (en comparaison à la théine- ou caféine- présente dans le thé) et peut avoir un effet bénéfique sur les patients souffrant d'insuffisance veineuse chronique, empêchant la formation d'œdème<sup>75</sup>. Outre ses bienfaits pour la santé, le thé est apprécié pour le plaisir : cette infusion de graines torréfiées présente des arômes légers et particuliers de praline et de noisette grillée<sup>44</sup>.

## 2. Propriétés de l'infusion sobacha

Le sobacha présente les activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes du sarrasin. En effet, les molécules telles que la rutine, la quercétine (Figure 10) et les C-glucoflavones sont présentes dans la coque de sarrasin et sont libérées par hydrolyse lors du processus d'infusion. En revanche, leur teneur phénolique globale varie en fonction de l'espèce de sarrasin utilisée<sup>67</sup> (supérieure pour *Fagopyrum esculentum* au détriment de *Fagopyrum tataricum*<sup>74-76</sup>) et du processus d'infusion<sup>65</sup>. Il est à noter qu'à titre d'exemple, cette teneur est légèrement inférieure à celle des feuilles de thé vert. Les principaux flavonoïdes (groupe majeur d'antioxydants naturels) contenus dans le sobacha sont la rutine et la vitexine. La rutine (quercétine-3-rutinoside) est un métabolite végétal glycoside de flavonol. Il joue le rôle de protecteur contre le rayonnement ultraviolet et présente des activités anti-inflammatoires et antimicrobiennes<sup>21</sup>. De plus, la rutine dilate les vaisseaux sanguins, diminue la perméabilité capillaire et abaisse la tension artérielle, ce qui la rend efficace dans le traitement de divers problèmes circulatoires<sup>67</sup>. En comparaison au thé vert, l'infusion de sarrasin a un potentiel antioxydant supérieur et une activité inhibitrice inférieure contre le développement de produits finaux de glycation avancée (AGE), toxines présentant un risque non négligeable sur le métabolisme<sup>72</sup>. Il est à noter que ces teneurs sont supérieures dans l'infusion de sarrasin de Tartarie<sup>71,77</sup> en comparaison à l'infusion de sarrasin commun<sup>72</sup>. De plus, le goût amer des gruaux de sarrasin de Tartarie est attribué à ces composants antioxydants<sup>21</sup>.

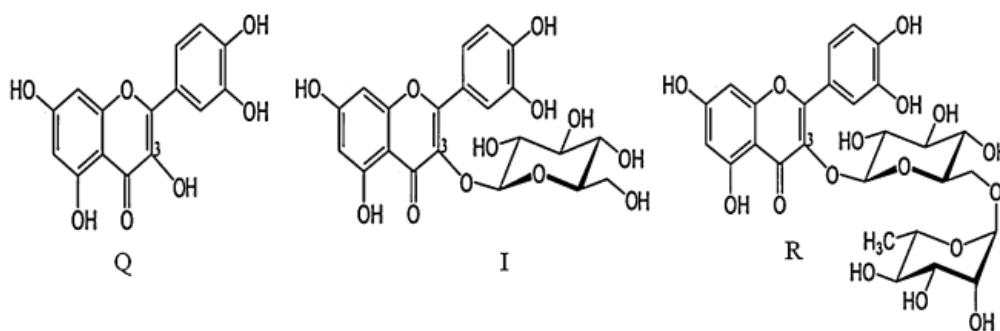


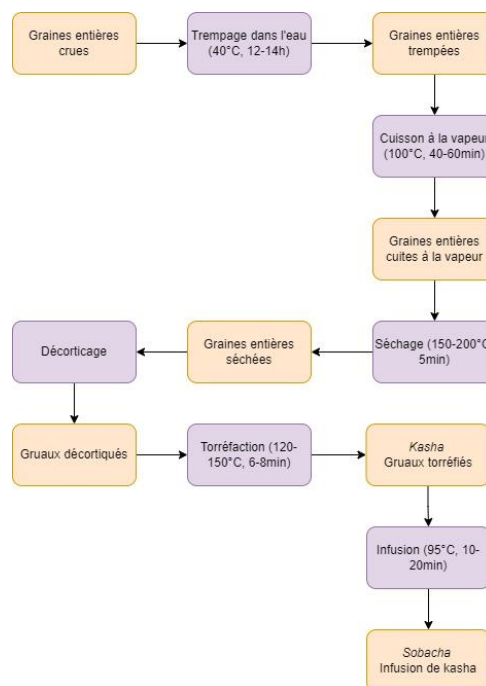
Figure 10. Structures chimiques des molécules de quercétine (Q), isoquercétine (I) et rutine (R) <sup>43</sup>

Concernant le traitement thermique appliqué dans la préparation du sobacha, le plus dommageable pour la conservation des propriétés anti-oxydantes s'avère être le traitement à la vapeur sous pression (en regard du chauffage par micro-ondes et de la torréfaction)<sup>71</sup>. Ce dernier implique des changements dans la composition chimique du grain et affecte les propriétés fonctionnelles de certains composés bioactifs. Ainsi, les méthodes de traitement pourraient être optimisées afin de produire une infusion de sarrasin avec une concentration supérieure en composés actifs bénéfiques.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire dans le cas d'échantillons aqueux s'effectue principalement par le test d'inhibition de la lipoxigénase (LOX), enzyme responsable du processus d'inflammation des cellules<sup>78-80</sup>. Par ailleurs, la méthode d'inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine sérique bovine (BSA) relatant de la capacité de l'échantillon considéré à protéger les protéines de la dénaturation est également utilisée. La technique alternative d'inhibition de la cyclooxygénase-2 (COX-2) permettrait la certification d'une activité anti-inflammatoire potentielle de boissons pour la santé humaine<sup>81</sup>. Les méthodes utilisées concernant l'évaluation du pouvoir antioxydant sont similaires à celles référencées pour l'étude des boissons fermentées (cf. II. 2.)

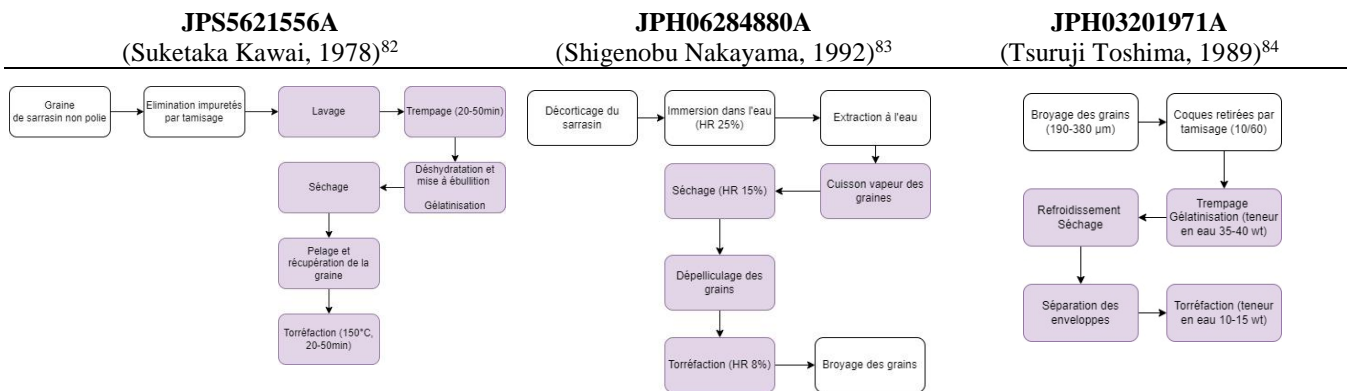
### 3. Les procédés de traitement des graines destinées à l'infusion (analyse des brevets disponibles)

Les procédés et le savoir-faire concernant l'élaboration du sobacha (Figure 11) sont brevetés et majoritairement originaires de la Chine et du Japon. C'est dans ces pays-là que l'on trouve les infusions les plus foncées, signe de leur richesse en nutriments. En effet, l'accessibilité des molécules composant la matrice permet le développement aromatique de celle-ci.



**Figure 11.** Diagramme de flux simplifié du procédé de préparation de sobacha (adaptation de Qin et al. (2011)<sup>70</sup>)

Ainsi, le traitement des graines destinées à l'infusion peut présenter de légères variations corrélées à l'évolution du savoir-faire japonais au fil du temps d'une part, et des procédés d'industrialisation d'une autre part (Figure 12).



**Figure 12.** Diagrammes de flux simplifiés soulignant l'évolution de la préparation des kasha référencés dans les brevets (étapes colorées similaires et essentielles)<sup>82-84</sup>

Puisque l'Europe est le plus grand producteur et consommateur de sarrasin (53,1%), suivi de l'Asie (38,6%), une maîtrise du processus de préparation du kasha pourrait s'avérer intéressante afin de créer un marché local, maîtriser la qualité et limiter les importations. D'autre part, aucun brevet n'est déposé quant à la fermentation de cette infusion, ce travail s'inscrit donc dans une démarche d'innovation.

## IV. Développement d'une boisson fermentée santé : l'*Hakko sobacha*

### 1. Fermentation sur matrice de type céréale

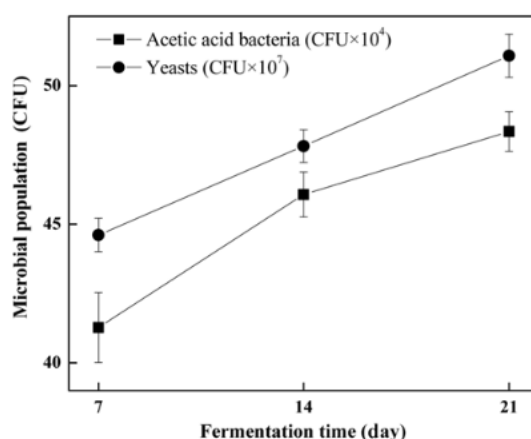
Les céréales sont considérées comme l'une des plus importantes sources de protéines alimentaires, de glucides, de vitamines, de minéraux et de fibres dans le monde. Cependant, la qualité nutritionnelle des céréales et les propriétés sensorielles de leurs produits sont parfois inférieures à celles de denrées animales riches telles que le lait et les produits laitiers. Les principales causes sont la teneur plus faible en protéines, la carence ou le faible taux de certains acides aminés essentiels (lysine notamment<sup>85</sup>), et la présence de facteurs antinutritionnels (acide phytique, tanins et polyphénols)<sup>2</sup>. En revanche, la nature des grains est une alternative aux produits laitiers principalement d'origine animale.

Dans ce cadre, la fermentation peut améliorer le statut nutritionnel des produits céréaliers. De manière générale, la fermentation naturelle des céréales entraîne une diminution du taux de glucides ainsi que de certains poly- et oligosaccharides non digestibles. Certains acides aminés peuvent être synthétisés et la disponibilité des vitamines du groupe B peut être améliorée<sup>21</sup>. La fermentation fournit également des conditions optimales pour la dégradation enzymatique du phytate qui est présent dans les céréales sous forme de complexes avec des cations polyvalents tels que le fer, le zinc, le calcium, le magnésium et les protéines<sup>2,44,86,87</sup>. Ainsi, par la fermentation de ces matrices, il est possible d'optimiser leur profil nutritionnel ainsi que leurs aspects fonctionnels et sensoriels et ce, de façon simple et économique. En effet, la fermentation entraîne une amélioration générale de la durée de conservation, de la texture, du goût et de l'arôme du produit final<sup>85</sup>. Au cours de la fermentation des céréales, plusieurs composés volatils se forment, contribuant à un mélange complexe d'arômes dans les produits<sup>2</sup>. À titre d'exemple, la présence d'arômes représentatifs de l'acide diacétyl acétique et de l'acide butyrique rend les produits fermentés à base de céréales plus appétissants<sup>85</sup>.

Les bactéries impliquées dans les processus de fermentation les plus courantes sont les genre *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*. D'autre part, les genres de champignons *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichothecium* sont les plus fréquemment retrouvés dans les produits céréaliers fermentés. Les levures de fermentation généralement utilisées sont des espèces de *Saccharomyces*, qui entraînent une

fermentation alcoolique<sup>88</sup>. Le type de flore bactérienne se développant de manière spontanée dans chaque aliment fermenté dépend de l'activité de l'eau, du pH, de la concentration en sel, de la température et de la composition de la matrice alimentaire<sup>26</sup>.

Ainsi, pour le kombucha, la flore totale microbienne présente se situe en moyenne entre  $10^5$  et  $10^7$  UFC/mL ou g de produit (Figure 13). Par ailleurs, la teneur en microorganismes requise dans une boisson fermentée pour que cette dernière soit considérée comme probiotique s'élève à  $6 \log_{10}$  UFC/mL (basée sur une consommation de 100mL)<sup>18</sup>. La plupart des souches de probiotiques isolées au sein de l'intestin humain appartiennent au groupe des bactéries lactiques (LAB), dont les espèces de *Lactobacillus* sont les plus importantes<sup>85</sup>.



**Figure 13.** Nombre total de bactéries et de levures (UFC) cultivées à partir de kombucha en fonction de la durée de fermentation <sup>39</sup>

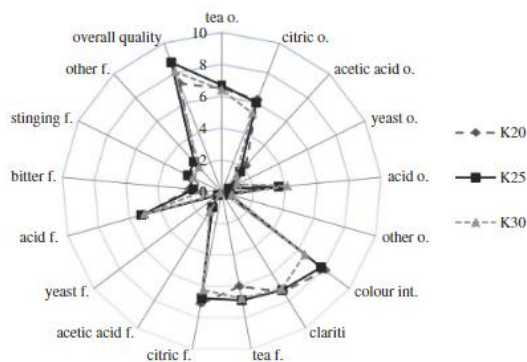
Ainsi, les boissons fermentées fonctionnelles à base de céréales deviennent de plus en plus attrayantes car elles constituent des alternatives saines pour les consommateurs intolérants au lactose ainsi qu'au gluten mais également pour ceux devant éviter certains allergènes<sup>69</sup>. Le sobacha, matrice céréalière innovante et prometteuse de par ses effets bénéfiques sur la santé, pourrait être fermentée afin de potentiellement décupler les effets bénéfiques en ajoutant ceux de la fermentation. En outre, le néologisme *Hakko sobacha* révélerait le caractère fermenté de l'infusion, *hakko* signifiant *fermenté* en japonais. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier la stabilité du procédé fermentaire dans le temps et la répétabilité celui-ci afin d'assurer une qualité constante de cette nouvelle boisson. En effet, il s'agit de suivre l'évolution de la communauté microbienne au cours de fermentations successives afin de caractériser la répétabilité du procédé et/ou l'adaptation du microbiote au substrat. Enfin, ce type d'étude n'a pas encore été réalisé à ce jour et permettrait de souligner les besoins en nutriments et les facteurs limitants à la fermentation.

## 2. Développement d'arômes au cours de la fermentation et variations des profils aromatiques

Les classes d'arômes intéressantes dans cette étude sont celles présentes dans les boissons fermentées ainsi que des arômes empyreumatiques correspondant aux notes torréfiées et grillées présents dans le sobacha. Ces derniers se développent à l'issue de la caramélisation des sucres et de la déamination des acides aminés<sup>89</sup>.

La composition et la concentration des composés organiques volatils (COV) mesurées varient selon les étapes de fermentation du kombucha. Les composés aromatiques du kombucha peuvent être divisés en trois catégories selon leur origine : les constituants de la matrice (thé) et ses ingrédients dérivés, les substrats source de saccharides et les métabolites produits par le SCOBY pendant la fermentation<sup>21</sup>. Les COV principaux sont classés en 6 familles différentes, à savoir les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides, les esters et les benzénoïdes. Ils se forment tout au long du processus de fermentation selon une cinétique propre : certains arômes augmentent et d'autres diminuent, faisant ainsi varier la saveur

du kombucha sur la période de fermentation considérée<sup>21</sup>. L'étude des arômes permet l'établissement de profils sensoriels dans le but de caractériser la perception de ces boissons fermentées par le consommateur (Figure 14). L'appréciation des boissons par le juge est majoritairement liée aux arômes formés lors du processus de fermentation considéré, la température de développement de ceux-ci, mais également leur odeur, intensité et goût. En effet, le profil sensoriel est influencé par la température de fermentation traduisant notamment une variation de la production des composés aromatiques et de l'acidité<sup>21</sup>.



**Figure 14.** Profils sensoriels de boissons de type kombucha établis en fonction de la température de fermentation (K20-K25-K30 : échantillons de kombucha fermentés à 20-25 et 30°C ; o: odeur, int: intensité et f: flaveur)<sup>21</sup>

Il est à noter que les quantités produites de COV varient également selon une matrice céréale de départ et les souches microbiennes utilisées<sup>18</sup>. En effet, de multiples métabolites sont produits par les systèmes enzymatiques complexes des bactéries lactiques sur les substrats de type céréale: acétaldéhyde (flaveur fruitée attribuée à la pomme verte, molécule produite par différents LAB) et di-acétyle (donnant le goût de yaourt/boisson au malt notamment), d'autres composés volatils tels que l'acétone, l'éthanol (teneurs moindres en présence de LAB en comparaison aux cultures levures/bactéries), l'acétate d'éthyle (produit plus tardivement dans la fermentation, flaveur d'ananas et avec des teneurs supérieures en présence de LAB en comparaison aux cultures de type kéfir)<sup>16</sup>. De manière plus spécifique, pour le sobacha, certaines molécules de la famille des pyrazines peuvent être présentes. Celles-ci sont formées au cours de la réaction de Maillard lors du processus de chauffage de préparation de kasha ; les pyrazines contribuent à l'arôme unique de grillé de nombreux produits alimentaires chauffés<sup>90</sup>. Il faut également considérer que les composés aromatiques du sarrasin commun sont affectés par les conditions de stockage et de broyage<sup>70</sup>.

Par ailleurs, l'accumulation de métabolites au cours de la fermentation induisent le développement de multiples molécules exhaustives de goût (sapide, fruité, ...) <sup>21</sup>. En revanche, il n'existe pas de lien entre l'acceptabilité des boissons et une viabilité plus importante en microorganismes<sup>18</sup>. Zhao et al. (2018) ont étudié le lien entre les propriétés physicochimiques (le pH, l'acidité totale, les changements de population microbienne, les polyphénols du thé et les catéchines) et la dynamique chimique de la flaveur du kombucha en fonction du temps par des méthodes telles que la GC-MS<sup>21</sup>. Une telle étude aide à la compréhension de la corrélation entre la dynamique chimique produite par la fermentation et le développement des arômes et des molécules sapides du kombucha. Les composants aromatiques volatils du kombucha au cours de la fermentation sont extraits par HS-SPME puis analysés par GC-MS<sup>21</sup>. Quant au sobacha, l'identification et la quantification des volatils présents ont également déjà été réalisés par GC-MS et selon trois méthodes d'extraction préalables : SPME (*Solid-method micro extraction*), extraction au méthanol et SDE (*Simultaneous distillation-extraction*, méthode de Likens-Nickerson)<sup>70</sup>.

Une méthode alternative de préparation des échantillons en extrayant les volatils par sorption sur un barreau magnétique (SBSE) permettrait une étude plus spécifique des arômes identifiés par GC-MS<sup>40,91,92</sup>. Cette nouvelle technique est en essor puisque c'est une méthode efficace de prétraitement des échantillons ; largement utilisée pour la concentration des analytes dans les échantillons environnementaux, alimentaires, pharmaceutiques et les substances volatiles<sup>40</sup>. En effet, cette technique ne requiert pas de solvant et permet la concentration des arômes par effets de salting-in/salting-out entre le milieu aqueux représenté par la boisson et le barreau magnétique (couche de PDMS de captage des COV)<sup>93</sup>.

## Matériel et méthode

### I. Préparation du sobacha

Le sobacha est obtenu par infusion<sup>44</sup> de graines de kasha (graines de sarrasin torréfiées ; Shizuoka, Japon). Le kasha, à des concentrations de 10 et 50 g/L, et l'eau (minérale naturelle, Ordal) préalablement portée à 92°C sont mélangés puis scellés dans un sac sous-vide. Les infusions sont ensuite prolongées pendant 5, 10 et 20 minutes dans un bain thermostaté à 92°C (Thermoplongeur Lacor ; Buffalo 1500 W). Ces différents temps d'infusion sont appliqués afin de sélectionner les caractéristiques intéressantes en tenant compte de différents paramètres (développement de l'intensité du goût praliné/noisette torréfié, couleur, apparition « d'off-flavors », rendement de fermentation...) influençant le produit final. Les infusions sont ensuite filtrées et refroidies à température ambiante jusqu'à une température inférieure à 35°C. Le filtrat est ensuite utilisé pour la fermentation, les résidus de graines de kasha<sup>1</sup> sont quant à eux éliminés.

### II. Préparation de l'hakko sobacha

Sur base du protocole élaboré ci-dessus (cf. I.), des solutions de sobacha (modalités de concentrations en kasha 10 et 50 g/L et temps d'infusion de 20 min) sont préparées en 3 répétitions. Après refroidissement des infusions (à moins de 35°C), du sucre blanc de betterave (BeginSay) est ajouté afin d'atteindre une solution à 6°brix et le tout est placé dans des contenants en verre adaptés à la fermentation (à tête large). Un refroidissement préalable à l'ajout du SCOBY de kombucha (et de son jus de repiquage) permet d'éviter quelconque changement brusque de température, pouvant induire une dégradation du matériel biologique. Le jus de repiquage est le résultat d'une fermentation de thé vert *Chun Mee Moon Palace* et thé noir *Lien Son* (1 : 1) en concentration totale de 8 g/L en thé et est ajouté à hauteur de 10% dans la solution de sobacha. Ainsi, la première fermentation est initiée lorsque la mère de kombucha et son jus de repiquage sont placés dans l'infusion sucrée (60g/L) refroidie. Les contenants sont couverts d'une gaze maintenue par un élastique (conditions aérobies) puis placés à l'étuve (Memmert UF55 ; F-Nr : B220 0023 ; 230 V – 56/60 Hz) pour fermentation pendant 10 jours à 25°C<sup>39</sup>. Chaque jour, un volume de 8mL est prélevé et est placé à -20°C afin d'effectuer les différents dosages et de déterminer les cinétiques de fermentation. Les prélèvements correspondant aux jours de week-end ne sont pas effectués.

En fin de première fermentation (F1), le SCOBY de l'inoculum de départ et celui nouvellement formé sont retirés et conservés en bocal hermétiquement fermé dans une faible quantité de hakko sobacha formé. Le reste du hakko sobacha est divisé en deux : une partie est conservée au froid positif (4°C) afin d'effectuer des analyses sensorielles (cf. partie IV.4), et le reste est conservé à -20°C pour les analyses physico-chimiques (cf. partie IV.6). Dans les deux cas, la fermentation est très fortement ralentie par la température basse.

---

<sup>1</sup> Dans une démarche « zéro déchet », les grains éliminés après infusion sont séchés à 70°C pendant 24h puis mixés finement pour obtenir une farine pouvant être utilisée dans la confection de biscuits sablés par exemple.

Une seconde fermentation (F2) permettant la production d'une pétillance naturelle du hakko sobacha est mise en œuvre en conservant la boisson dans une bouteille à fermeture mécanique pendant 15 jours supplémentaires à 25°C. Pour finir, l'hakko sobacha est conservé au froid positif afin de ralentir fortement la fermentation et conserver la boisson.

### **III. Évaluation de la stabilité et de la répétabilité de la boisson par fermentations successives**

Afin de déterminer la capacité du microbiote de kombucha de se développer dans une matrice de sobacha et d'étudier l'impact de fermentation successives à partir d'hakko sobacha, des fermentations successives sont réalisées. Par le même procédé explicité précédemment (cf. II), la première fermentation (effectuée en 2 modalités : 10 et 50 g/L de kasha, infusion de 20 min) est réalisée en utilisant un SCOBY et son jus de repiquage de type kombucha (provenant d'une matrice thé vert *Chun Mee Moon Palace* - thé noir *Lien Son* (1:1) en concentration totale en thé de 8 g/L) ; pour les  $n$ -fermentations suivantes ce sont le SCOBY et le jus de repiquage du hakko sobacha précédent ( $n-1$ ) qui servent d'inoculum. Mis à part cette différence, l'expérience est conduite pour chaque série jusqu'en F1 (7 jours). Les conditions de préparation et de fermentation suivent le schéma décrit précédemment (cf. II).

Différents paramètres sont évalués afin de déterminer la réalisation optimale des fermentations tels que la cinétique de la baisse de pH, les dosages de sucres, d'éthanol et d'acide organiques, la qualité du SCOBY, les cinétiques de développement des composés aromatiques volatils, et les évaluations organoleptiques. Mise à part les mesures de pH effectuées tous les jours de F1, le reste des analyses mentionnées est envisagé en fin de F1 (J7).

Dans l'étude de l'évolution de la boisson de départ par auto-inoculation de celle-ci en six séries (équivalent à 7 semaines d'expérience), la ré-inoculation dans un substrat de thé est envisagée afin d'observer si la boisson retrouve ses caractéristiques de départ. Concrètement, c'est à l'avant dernier batch (série 5) que cette dimension est considérée. En outre, les comparaisons des aspects des SCOBY, des mesures de pH et de volatils entre la « série 5 Thé » et les séries 1 à 6 seront considérés.

En fin de F2, un volume de 20mL est conservé à -20°C afin d'effectuer les analyses des COV par GC-MS (cf. IV.4) ; le reste est conservé à 4°C pour des analyses sensorielles (cf. IV.6).

## **IV. Caractérisation physico-chimique de l'hakko sobacha**

### **1. Mesures de pH**

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (HACH BeRight ; SensION+ pH1 ; S/N 605069 ; IP67). Le suivi cinétique du pH au cours de la F1 est réalisé par mesure direct dans le milieu de fermentation et ce, toutes les 24h. Les mesures correspondant aux jours de week-end sont effectuées sur un échantillon et sont ensuite approximées par une courbe de tendance linéaire pour le reste des expériences. Une mesure est également effectuée en fin de F2 (correspondant à J25) lorsque celle-ci est envisagée. Un test t de Student est réalisé afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les modalités de concentration testées ( $n=3$  ;  $\alpha = 95\%$ ) et la durée de fermentation.

### **2. Dosages des composants principaux par spectrophotométrie**

La quantification des composants principaux, à savoir l'éthanol (EtOH), les sucres (glucose, fructose, saccharose et sucres totaux) et les acides (acétique et lactique) est réalisée par spectrophotométrie (Molecular devices SpectraMax ABSPlus - SN : ABP00716) à l'aide de kits enzymatiques colorimétriques. Les principes chimiques de ces tests et les protocoles détaillés d'utilisation des kits enzymatiques de dosage Enzytec de chez R-Biopharm sont présentés en annexes

(cf. Annexe 1). Pour ces quantifications, l'échantillon est dilué dans du tampon phosphate 200mM pH 7 (excepté pour l'acide lactique où le tampon phosphate est à pH 8). Ces dosages sont réalisés sur les échantillons de F1 collectés quotidiennement entre J0 et J10 et à J15 pour la F2 afin d'obtenir les cinétiques de production/conversion de ces molécules d'intérêt. Les dosages sont également envisagés pour chaque série de fermentations successives et ce, en fin de F1 (J7). Un test t de Student est effectué afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les modalités de concentration testées ( $n=3$  ;  $\alpha = 95\%$ ) et la durée de fermentation. De plus, un dosage de l'éthanol est effectué en fin de fermentation afin de contrôler que l'on se situe à des teneurs inférieures à 0,5% <sup>50</sup>.

### 3. Analyses colorimétriques

Des mesures colorimétriques (dimension Lab) sont effectuées sur les échantillons. L'appareil de mesure (Directional 45/0 ColorFlex EZ, HunterLab) préalablement calibré effectue en 3 répétitions une mesure de la couleur de l'échantillon considéré. Pour ce faire, un volume de 10mL d'échantillon est inséré dans une cellule de verre (HunterLab 04-7209-00, de hauteur 45 mm) et est placé au centre de l'appareil de mesure. Les 3 répétitions sont réalisées en déplaçant légèrement la cellule vers la gauche et vers la droite par rapport à sa position initiale, permettant de calculer une moyenne et un écart-type. L'évolution de la couleur des échantillons au cours de la cinétique de fermentation est obtenue et cela pour les échantillons présentant différentes concentrations en kasha et différentes durées de fermentation. Un test t de Student est effectué afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les modalités de concentration testées ( $n=3$  ;  $\alpha = 95\%$ ) et la durée de fermentation.

### 4. Analyses des composés organiques volatils par GC-MS

Les composés organiques volatils sont caractérisés par GC-MS<sup>70,91,93</sup>. Au préalable, les COV sont captés par sorption sur barreau magnétique (SBSE) enrobé de PDMS comme résine d'adsorption. Au préalable, les barreaux magnétiques sont conditionnés dans 10mL d'une solution d'ACN/H<sub>2</sub>O (50/50 v/v) sous agitation magnétique pendant 2h ; puis les barreaux magnétiques sont rincés à l'eau distillée et partiellement séchés avant d'être séchés sous flux d'azote pendant 2h à 260°C (Température initiale de 40°C, flux de 10°/min, pression de 2 bars) dans un tube de thermo désorption.

Pour l'analyse des échantillons, ces derniers sont préalablement décongelés au bain-marie (30°C) et homogénéisés ; une prise d'échantillon de 5mL est transférée dans un vial, dans lequel se trouve environ 1g de NaCl 20% w/w ; un SBSE conditionné est alors placé dans chaque vial et mis sous agitation magnétique pendant 2h. Le barreau magnétique est ensuite rincé à l'eau distillée et partiellement séché puis enfin séché par thermo désorption. L'analyse des COV est effectuée par chromatographie en phase gazeuse (GC Agilent Technologies 7890A) couplée à la spectrométrie de masse (5975C inert XL EI/CI MSD).

L'injection s'effectue en splitless mode avec un débit de 1,2mL/min. La colonne utilisée est une HP-5MS (5% Phényl Méthyl Polysiloxane) de dimensions 30 m X 250  $\mu$ m X 0,25  $\mu$ m Le gradient de température du four est le suivant : 40°C pendant 2 min puis 6°C/min jusqu'à 300°C pendant 5 min. La durée totale d'analyse est de 50 min. 1  $\mu$ L de 1-heptanol à une concentration de 100 mg/L (dans l'éthanol) est ajouté à chaque échantillon comme standard interne. Les indices de Kovats sont calculés sur base d'un mélange de *n*-alcane entre C<sub>6</sub>–C<sub>30</sub><sup>16,94</sup>.

Les chromatogrammes des échantillons sont analysés avec le logiciel Mass Hunter Analysis et l'identification des COV est réalisée par comparaison à la librairie spectrale NIST08. Afin d'alléger l'identification des composés et le traitement des données, les filtres suivants sont appliqués sur les données brutes : facteur de correspondance (pourcentage de probabilité d'identification correcte du composé considéré)  $\geq 75\%$  et aire maximale sous la courbe  $\geq 5\%$ . La quantification relative des volatils est envisagée par détermination de la proportion (% d'aire sous la courbe) de chaque composé dans l'échantillon considéré. L'étude des OAV (*odor activity value*) renseignés dans la littérature permet d'étudier la contribution des volatils à l'arôme de la boisson (ratio entre l'aire du pic et le seuil de perception du volatil considéré). L'analyse statistique des échantillons effectués en 3 répétitions s'effectue par une ACP (logiciel Rstudio) permettant l'étude de la variabilité des échantillons en fonction des modalités testées. Cette analyse permet de prendre en compte les différences interindividuelles. Pour finir, une étude de la comparaison qualitative<sup>95</sup> des COV obtenus au cours des fermentations successives d'une part, et d'autre part des COV d'un échantillon de kombucha de



référence afin d'évaluer les convergences et similitudes de volatils avec l'hakko sobacha sont envisagées.

## 5. Analyses des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires de la boisson par spectrophotométrie

Les activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires<sup>42,59,78</sup> des échantillons obtenues en selon le protocole établi au point II sont mesurées par spectrophotométrie (Molecular devices SpectraMax ABSPlus - SN : ABP00716).

L'activité anti-oxydante est déterminée par la méthode de piégeage des radicaux libres du DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) : la présence d'un antioxydant limitera l'oxydation spontanée du DPPH, et ce d'autant plus que son pouvoir antioxydant sera élevé. Le milieu réactionnel se compose d'1mL d'échantillon considéré, d'1mL de solution méthanoïque de DPPH (Alfa Aesar, Thermo Fisher, Germany) (0,004% w/v). Il est incubé à 25°C pendant 30 min puis l'absorbance est mesurée à 517 nm (longueur d'onde d'adsorption du DPPH oxydé). Chaque test est effectué en 3 répétitions pour chaque échantillon. Deux antioxydants de référence sont employés : le Trolox et l'acide ascorbique, dont les concentrations sont déterminées par étalonnage externe. Le pourcentage d'inhibition (I%) des radicaux libres du DPPH est déterminé comme suit :  $\%I_{DPPH} = (Abs_{blanc} - Abs_{éch}) / (Abs_{blanc}) * 100$  Où  $Abs_{blanc}$  correspond l'absorbance du milieu réactionnel sans l'échantillon et  $Abs_{éch}$  celle du milieu réactionnel contenant l'échantillon test. Un test t de Student est effectué afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les modalités de concentration testées (n=3 ;  $\alpha = 95\%$ ) et la durée de fermentation.

L'activité anti-inflammatoire<sup>78</sup> est déterminée par le test de l'inhibition de la COX-2 : suppression de l'activité de l'enzyme responsable de l'inflammation des cellules humaines. Le mélange réactionnel comprend 100  $\mu$ L d'échantillon considéré (test effectué en 3 répétitions pour chaque échantillon), 35  $\mu$ L (1000 UFC/mL) de solution de cyclooxygénase 2 (Sigma, Darmstadt, Germany) et 800  $\mu$ L de solution tampon borate 0,2 M (pH de 9). Le mélange est incubé à 25°C pendant 15min dans une cellule d'1mL. La réaction est initiée par l'ajout de 35  $\mu$ L de solution substrat (acide linoléique 250  $\mu$ M), et l'absorbance est mesurée à 234 nm (Molecular devices SpectraMax ABSPlus - SN : ABP00716). Les standards inhibiteurs utilisés sont la quercétine et la rutine, dont les concentrations sont déterminées par étalonnage externe. Ainsi, le pourcentage d'inhibition de l'activité de la COX-2 se calcule comme suit :  $\%I_{COX-2} = (Abs_{blanc} - Abs_{éch}) / (Abs_{blanc}) * 100$  Où  $Abs_{blanc}$  correspond à l'absorbance du milieu réactionnel sans l'échantillon et  $Abs_{éch}$  celle du milieu réactionnel contenant l'échantillon test. Un test t de Student est effectué afin de déterminer s'il existe une différence significative entre les modalités de concentration testées (n=3 ;  $\alpha = 95\%$ ) et la durée de fermentation.

## 6. Analyses sensorielles

Les analyses sensorielles<sup>21</sup> visent à quantifier l'appréciation et à évaluer les caractéristiques organoleptiques du produit considéré par le biais des cinq sens : la vue, l'odorat, le toucher, le goût et l'ouïe. Les analyses sensorielles effectuées dans le cadre de ce travail sont les suivantes : test discriminatif (triangulaire), test d'appréciation (hédonique) et profil flash.

Concernant les 2 premiers tests, un minimum de respectivement 24 et 60 consommateurs « naïfs » sont requis. Pour ce faire, une invitation de recrutement est envoyée aux membres du personnel ainsi qu'aux étudiants de la faculté de Gembloux Agro-bio Tech. Les expérimentations se déroulent dans le local d'Analyse Sensorielle de l'université (Service de Sciences des aliments et Formulation). Cette salle de dégustation comprend 8 cabines individuelles normalisées (couleurs, odeurs et éclairage). À chaque début de test, un formulaire (cf. Annexe 2) est distribué aux sujets ; il comprend (i) des questions relatives à leur profil, (ii) les tests triangulaire et hédonique, (iii) des questions relatives à leurs habitudes de consommation. Les échantillons d'intérêt sélectionnés pour les 2 tests sont apportés via le passe-plat lorsque le sujet est prêt (commande d'appel). Pour chaque sujet, de l'eau et des biscottes sont fournies dans le but de favoriser le retour à un goût neutre pour le palais ainsi qu'une hydratation continue.

En effet, les différences potentielles à percevoir étant principalement basées sur la modalité de concentration des échantillons en sarrasin, ces derniers sont présentés du moins au plus concentré afin de permettre au juge de goûter un panel de produits sans éprouver de signe de saturation.

i. Test discriminatif triangulaire

L'épreuve discriminative permet de tester l'hypothèse de l'identité entre deux produits. Elle est utilisée dans ce cas-ci lorsque les différences entre les produits sont faibles. Le principe du test triangulaire (Norme française ISO 4120 :2004) est la comparaison de plusieurs échantillons et la reconnaissance d'échantillons identiques. Les échantillons sont présentés de façon homogène afin de ne pas induire de biais dans les résultats.

La décision d'acceptation ou non de l'hypothèse de départ se base sur la proportion de réponses correctes pondérée par la probabilité de réponses correctes dues au hasard. Pour l'interprétation statistique, le nombre de réponses correctes est comparé à la valeur de la table dérivant de la loi binomiale.

ii. Évaluation hédonique

Ce test (Norme française ISO 5492 :2008) reflète la manière dont un produit est accepté par un panel de consommateurs. Il se rapporte au caractère plaisant ou déplaisant d'un produit considéré. Dans le cadre de ce travail, un test hédonique non spécifique est envisagé en deux parties. Dans un premier temps, une mesure d'acceptabilité permet d'évaluer l'appréciation du produit sur une échelle de critères. Ensuite, une mesure de préférence est envisagée par un test par paire. La présentation des échantillons s'effectue de manière monadique puis en simultané, respectivement. Le traitement des données s'effectue statistiquement par une ACP (logiciel Rstudio) en ayant préalablement converti les catégories descriptives en notations numériques. Cette analyse permet de prendre en compte les différences interindividuelles.

iii. Profil flash

Les sujets interrogés (recrutement interne) dans ce type d'analyse descriptive sont naïfs. La population est donc précise et non représentative des consommateurs. Ce test (Norme française ISO 13299 :2016) requiert un minimum de 6 sujets semi-entraînés, ayant des connaissances développées sur les produits fermentés ainsi qu'une capacité de description et un vocabulaire étendu. Les échantillons sont présentés simultanément et dans le même ordre pour tous les juges.

Le principe de départ réside en la définition de manière individuelle d'une liste (cf. Annexe 3) de descripteurs sensoriels (odeur, goût, couleur, ...) permettant à chaque juge de distinguer les échantillons les uns des autres, après les avoir goûté dans un ordre déterminé, identique pour chaque juge. La mise en commun des listes de descripteurs donne l'opportunité à tous les juges de réviser leur liste personnelle, si nécessaire. En effet, le but de cette opération n'est pas d'obtenir un consensus mais d'aider les juges à trouver les justes termes reflétant au mieux leurs sensations. Le juge considéré peut ajouter un ou plusieurs descripteurs à sa liste de départ, remplacer un descripteur par un autre terme plus adapté, ou encore n'effectuer aucune modification. Finalement vient le classement par rang des 8 produits évalués pour chacun des descripteurs sensoriels caractérisés précédemment au niveau individuel.

Le traitement statistique considéré est l'ACP (Rstudio), prenant en compte les différences interindividuelles. Une conversion préalable des classements en valeurs chiffrées est envisagée afin de faciliter le traitement des résultats.

# Résultats et discussions

## I. Présentation du schéma expérimental

L'ensemble des expériences réalisées au cours de cette étude sont reprises par ordre chronologique à la Figure 15. L'expérience #1, vise à déterminer les meilleurs paramètres de préparation du sobacha, c'est-à-dire le procédé d'infusion des graines de kasha, afin d'obtenir une matrice optimale pour la suite des expérimentations. Les paramètres étudiés sont, d'une part, la concentration en graines de kasha (10 et 50 g/L) et d'autre part, le temps d'infusion de celles-ci (5, 10 et 20 minutes). Concernant les durées d'infusion, la durée la plus longue a été sélectionnée pour la suite des expérimentations afin de privilégier un sobacha ayant potentiellement le maximum de nutriments et de métabolites aromatiques pour la fermentation. Les deux concentrations seront utilisées pour les phases suivantes de fermentation. En outre, dans le cadre d'une démarche écologique et économique, le prix de la matière première étant élevé, le compromis impliquant une concentration faible et une durée d'infusion élevée permet l'obtention d'une infusion suffisamment concentrée en arômes et nutriments tout en restant abordable pour le consommateur, dans des perspectives de commercialisation de la boisson.

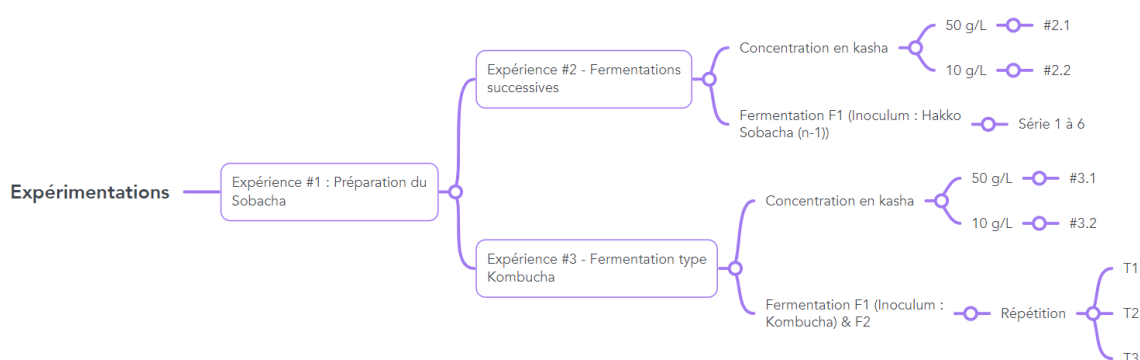


Figure 15. Schéma expérimental de l'étude

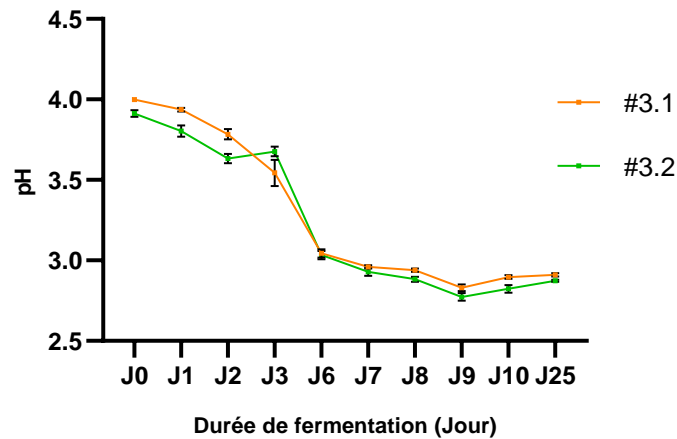
Sur base de ces modalités d'infusion (10 ou 50 g/L et 20 minutes d'infusion), la fermentation est envisagée selon deux aspects ; l'expérience #2 permet de mettre en lumière l'évolution et la stabilité de des boissons par fermentations successives (ensemencement de SCOBY et jus de repiquage successifs) tandis que l'expérience #3 permet d'évaluer la répétabilité du procédé de fermentation sur la matrice de sobacha avec un même SCOBY et jus de repiquage issus d'un kombucha. Ainsi, les chiffres précédés d'un « # » représentent l'expérience, et ceux précédés d'un « . » font référence à la concentration en kasha. Pour finir, les fermentations successives correspondent à des séries numérotées de 1 à 6 et les répétitions de l'expérience #3 sont représentées par un « T » numéroté de 1 à 3. Cette nomenclature sera appliquée dans la présentation et la discussion des résultats.

## II. Caractérisation physico-chimique de l'hakko sobacha

### 1. Mesures de pH

Les cinétiques d'évolution du pH des échantillons d'hakko sobacha au cours de la fermentation sont représentées aux Figures 16 à 18. Les données brutes sont référencées en annexe 4. De manière générale, les valeurs de pH sont proches de 4 pour les échantillons de la série #3.1 et de 3,91 pour les #3.2 (concentration plus faible en kasha) et diminue rapidement pour atteindre une valeur d'environ 3 après 5 jours de fermentation ; le pH diminue plus lentement les 5 derniers jours de la F1 pour atteindre une valeur d'environ 2,90 (2,82 pour #3.2). Le pH finalement mesuré en fin de F2 indique une légère hausse, atteignant environ 2,91 (et 2,87 pour #3.2). Le pH évolue de façon non significativement différente ( $p$ -valeur  $> 0,05$ ) en fonction de la concentration en kasha. L'étude de Zaho et al. (2018) focalisée sur la fermentation de type kombucha décrit une diminution du pH au cours de la

fermentation<sup>21</sup>. De plus, le séquençage en une première phase de diminution rapide en début de F1 (0-10 jours) suivie d'une diminution plus lente de celui-ci en fin de F1 (de 10-14 jours)<sup>13,21</sup> pour finir par une augmentation lente au cours de la F2 a également déjà été démontrée<sup>21</sup>. En revanche, le pH d'un kombucha en début de fermentation est généralement plus élevé (environ 6,7) ; pour atteindre la même valeur que celle de l'hakko sobacha en fin de F1. De plus, l'évolution de l'acidité totale est en accord avec la diminution de la valeur du pH. En effet, l'augmentation de l'acidité totale confirme que les micro-organismes produisent de nombreux acides organiques pendant la fermentation du kombucha<sup>13,21,39,46</sup>.

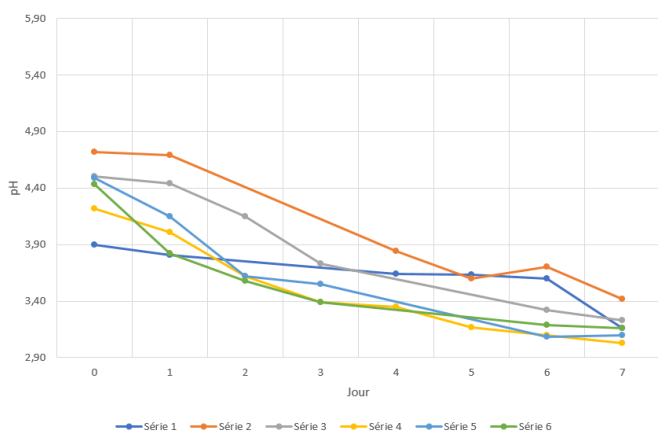


**Figure 16.** Evolution du pH des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10 g/L) et de la durée de fermentation (jour) (*moyenne ± écart-type ; n=3*)

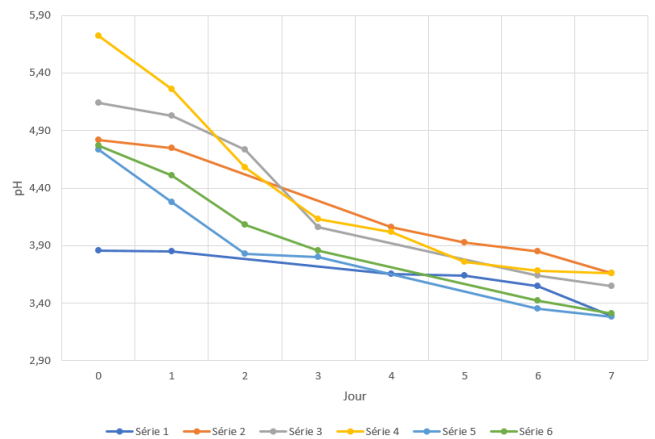
Concernant le pH des boissons obtenues au cours des fermentations successives (expérience #2), celui-ci ne semble pas être impacté par la concentration en kasha. En effet, bien que les valeurs de pH des échantillons en début de F1 soient différentes (de l'ordre de 3,90-4,24 pour les #2.1 et de 3,86-5,72 pour les #2.2) ; les valeurs de pH se rejoignent en fin de F1 (de l'ordre de 3) quelle que soit la concentration en kasha. La cinétique de diminution du pH est donc plus rapide pour l'échantillon #2.2. De plus, la diminution du pH au cours de la fermentation est approximativement linéaire pour chaque série de fermentation (excepté la série 4 #2.2 où le pH diminue de manière exponentielle). Cette exception dans la série 4 #2.2 pourrait provenir d'une erreur de manipulation au laboratoire (erreur de proportion jus de repiquage/sobacha, apport sucre, ...). L'acidification en 2 étapes explicitée précédemment (#3) n'est dès lors pas observée ici. Il est à noter qu'une descente du pH plus drastique au départ (similaire à l'expérience #3) est attendue pour la série 1 de l'expérience #2 : les échantillons étant correspondants. Ces changements de comportement dans les cinétiques pourraient être expliqués par la variation des composants du jus de repiquage au cours des séries. En effet, le jus de repiquage de départ (série 1) est un vinaigre de kombucha et devient un hakko sobacha ayant subi *in fine* de multiples fermentations (série 6). En revanche, l'acidification s'effectuant toujours en série 6, il semblerait que la fermentation soit toujours active malgré la modification de la composition du milieu. Le jus de repiquage de type hakko sobacha se veut être un starter efficace de par la présence de nutriments et microorganismes nécessaires à la fermentation. Il est à noter que comme attendu, la matrice de départ de la série 1 possède une valeur de pH inférieure en comparaison avec les autres séries, le jus de repiquage de type kombucha étant plus acide. L'acidification est plus douce (valeurs de pH plus élevées) pour les séries suivantes en présence d'hakko sobacha.

D'autres paramètres peuvent être étudiés afin d'évaluer l'évolution des fermentations successives. À titre d'exemple, l'observation visuelle de la morphologie des SCOBY au cours des fermentations successives est analysée. La Figure 19 (a et b) présente des photographies permettant d'observer l'aspect visuel du SCOBY obtenus au sein des séries 4 et 5. On observe que le SCOBY devient de plus en plus

fin à chacune des fermentations. Ce phénomène pourrait être expliqué par un ralentissement des activités de synthèse des microorganismes responsables de la production de sucres complexes (cellulose) par carence en certains nutriments ou en énergie mais encore de la réduction ou l'inhibition de la croissance de ces mêmes microorganismes. Puisque la fermentation semble ralentir au fur et à mesure des séries au vu de la réduction de la production de cellulose et la chute plus modérée du pH au cours de la F1 en comparaison aux séries précédentes, une fermentation "test" de greffe du jus de repiquage (hakko sobacha (n-1)) dans une matrice de thé est envisagée (#2 série 5 thé) afin de voir si la fermentation retrouve son rendement initial. L'aspect visuel des SCOBY correspondant à cette série est présenté par la Figure 19 (c). Un accroissement de la production de cellulose (zones blanchâtres formées en surface du SCOBY d'origine) et de l'épaisseur du SCOBY sont perceptibles. Ce regain de rendement est potentiellement lié à la matrice de type thé qui est source de nutriments (composés azotés) et permet aux microorganismes de booster leurs activités métaboliques (acidification rapide du milieu, production de cellulose, ...)<sup>24,39,49</sup>.



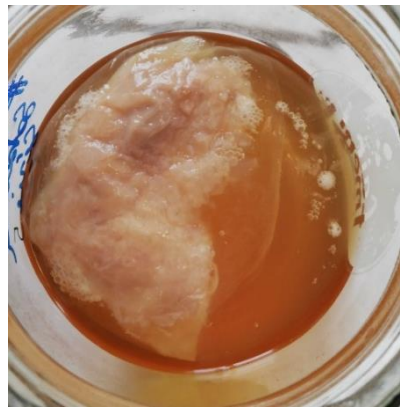
**Figure 17.** Evolution du pH des échantillons d'hakko sobacha #2.1 (concentration 50g/L de sarrasin) au cours de fermentations successives (série)



**Figure 18.** Evolution du pH des échantillons d'hakko sobacha #2.2 (concentration 10g/L de sarrasin) au cours de fermentations successives (série)



(a)



(b)



(c)

**Figure 19.** Photographie des SCOBY en cours de fermentation (a) échantillon #2.1 série 4 (b) échantillon #2.1 série 5 (c) échantillon #2.1 série 5 Thé (#2.1 correspond à 50g/L de sarrasin)

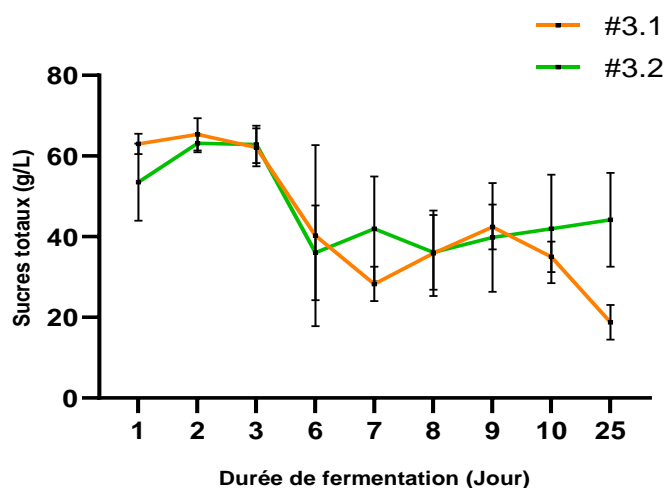


## 2. Dosages des composants principaux par spectrophotométrie

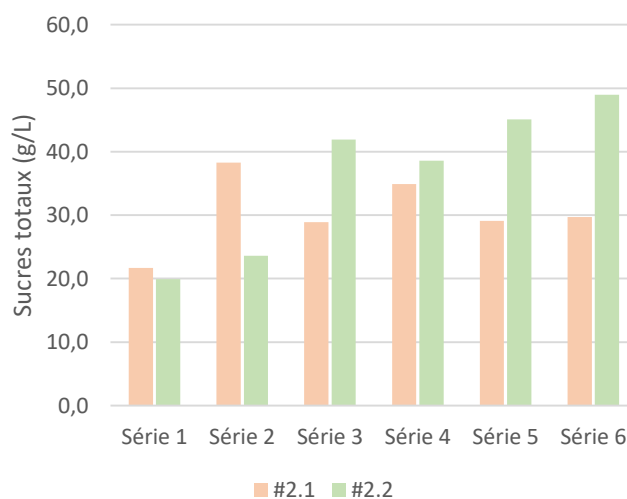
Les dosages des composants majoritaires retrouvés dans les échantillons des cinétiques de fermentation du sobacha sont présentés aux Figures 20 à 32. Les données brutes sont reprises en annexe 5.

Dans un premier temps, les sucres totaux des échantillons de l'expérience #3 diminuent au cours de la fermentation (Figure 20). Bien qu'à chaque prélèvement les teneurs en sucres soient non significativement différentes en fonction de la concentration en sarrasin ( $P > 0,05$ ), les cinétiques globales sont différentes en F1 : la concentration initiale en sucre est de l'ordre de 60 g/L (63,00g/L pour #3.1 et 53,53g/L pour #3.2) pour atteindre 35,00g/L (#3.1) et 41,93g/L (#3.2) en fin de F1 (J10). La cinétique de conversion des sucres totaux est plus rapide lorsque la concentration en sarrasin est supérieure (#3.1). La concentration en sarrasin semble donc impacter l'activité métabolique de conversion des sucres par les microorganismes lors de la première fermentation. En outre, une différence significative ( $P < 0,05$ ) du taux de sucres est observée en fin de F2 en fonction de la concentration en sarrasin (18,77g/L pour #3.1 contre 44,17g/L pour #3.2). Ces différences observées en F2 pourraient être expliquées par la modification du milieu de fermentation (réduction de la présence de bactéries acétiques/dominance de levures en conditions anaérobies poussant à la synthèse de  $\text{CO}_2$ ). Les microorganismes du milieu #3.1 pourraient disposer d'une quantité supérieure de nutriments présents dans le sobacha (amidon et sucres complexes du sarrasin, libérés dans l'infusion et partiellement hydrolysés par le microbiome) leur permettant d'acidifier davantage le milieu et donc la consommation de sucres.

Concernant l'évolution des sucres totaux lors de fermentations successives (correspondant aux mesures des taux de sucres en fin de fermentation F1 pour chaque série), elle semble varier en fonction de la concentration en sarrasin (Figure 21). En effet, la fermentation #2.1 induit un accroissement du sucre en série 2 (de 21,7 à 38,3g/L) puis une diminution/stagnation jusqu'en série 6 (29,7g/L). En revanche, le profil en sucres au cours de la fermentation #2.1 est en constante augmentation (de 19,9 en série 1 jusque 49,0g/L en série 6). Le ralentissement de l'activité métabolique des microorganismes au fil des séries #2.1 (explicité par la diminution lente du pH en II.1) peut induire une accumulation du sucre dans le milieu fermentaire.



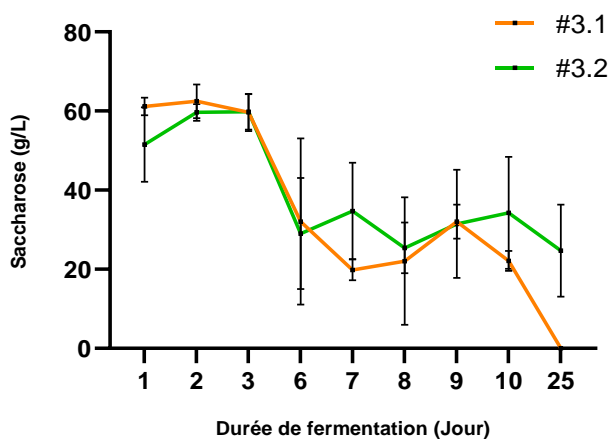
**Figure 20.** Evolution du taux de sucres totaux (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$ )



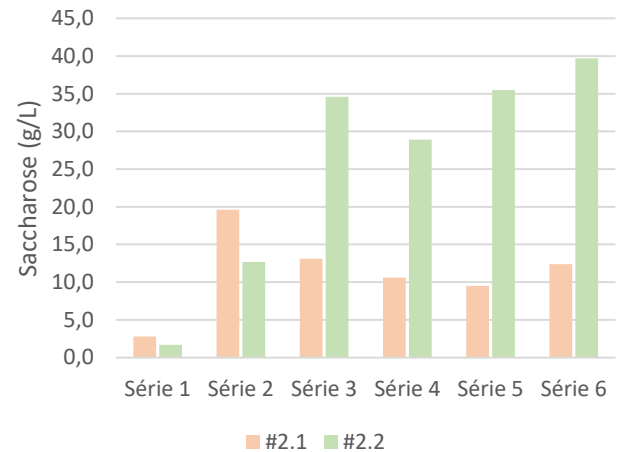
**Figure 21.** Evolution du taux de sucres totaux (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série)

D'autre part, l'évolution de la concentration en saccharose au cours de la fermentation, suit globalement les mêmes tendances qu'observées pour les sucres totaux (Figures 22 et 23). La concentration initiale en saccharose est de l'ordre de 60g/L : cette valeur correspondant à l'apport réalisé en début de fermentation. La concentration de départ en sarrasin n'impacte pas significativement le taux de

saccharose mesuré à chacun des prélèvements au cours de la cinétique ; en revanche la cinétique totale est impactée. Les concentrations de saccharose obtenues à J25 en fin de F2 sont respectivement non détectables pour #3.1 et 24,70g/L pour #3.2. Cette concentration finale en saccharose plus élevée pour une concentration inférieure en sobacha est également observée (ratios proches) pour la série 1 des fermentations successives avec des concentrations respectives en saccharose de 12,4g/L pour #2.1 et 39,7g/L pour #2.2. La différence de taux résiduel de saccharose entre les échantillons #2.1 et #2.2 s'explique de la même façon que pour l'évolution des sucres totaux, le saccharose étant, hormis les sucres présents dans le sobacha, le seul sucre ajouté avant fermentation.



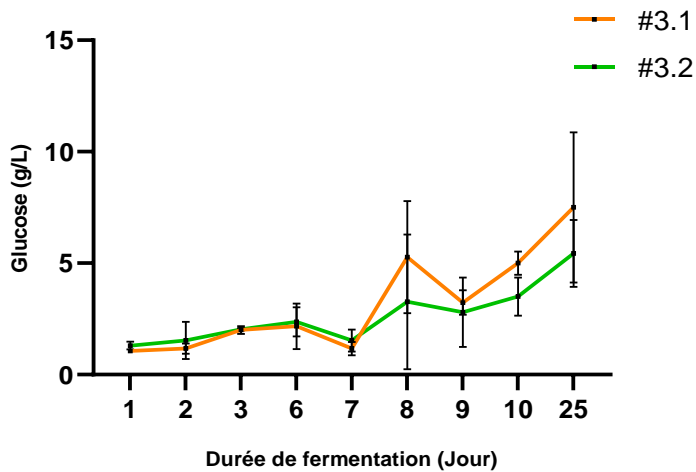
**Figure 22.** Evolution du taux de saccharose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$ )



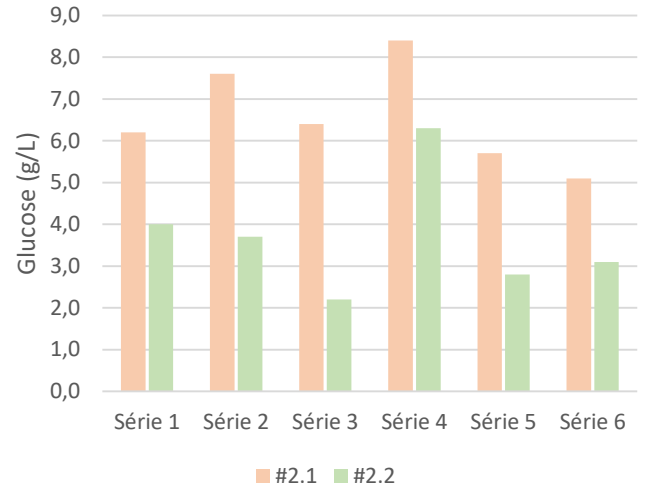
**Figure 23.** Evolution du taux de saccharose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série)

Concernant l'évolution du taux de glucose au cours de la fermentation, il augmente de manière significative ( $P > 0,05$ ) avec la concentration en sarrasin (indépendamment du prélèvement) (Figure 24). En effet, les concentrations initiales en glucose sont de 1,07 et 1,30g/L et atteignent des valeurs de 7,5 et 5,43g/L en fin de F2, pour les échantillons #3.1 et #3.2 respectivement. Cette cinétique d'évolution du taux de glucose est liée à la dégradation des du saccharose (disaccharide) en sucres simples par les microorganismes au cours de la fermentation.

L'évolution de la concentration en glucose au cours des fermentations successives semble suivre le même schéma quel que soit la concentration en sarrasin pour les deux valeurs étudiées (Figure 25). En revanche, l'évolution du glucose en début d'expérience diminue jusqu'en série 3 pour #2.2 alors qu'elle est plutôt en augmentation pour #2.1 ; en série 4 une hausse de la teneur en glucose est observée (8,4 pour #2.1 et 6,3g/L pour #2.2) pour ensuite diminuer drastiquement jusqu'en série 6 (5,1 pour #2.1 et 3,1g/L pour #2.2). Cette évolution suite au fermentation successives vers des taux de glucose plus faibles pourrait être liée au ralentissement de la fermentation au fil des séries, induisant une dégradation plus faible du saccharose et des sucres complexes jusqu'à leur accumulation dans le milieu fermentaire. De plus, la diminution des teneurs en glucose pourrait être liée à l'utilisation de celui-ci dans la synthèse de cellulose du SCOBY : cette hypothèse entre en corrélation avec l'aspect plus fin qu'adopte le SCOBY en fin de fermentation (Figure 19 a et b).



**Figure 24.** Evolution du taux de glucose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha #3 en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)

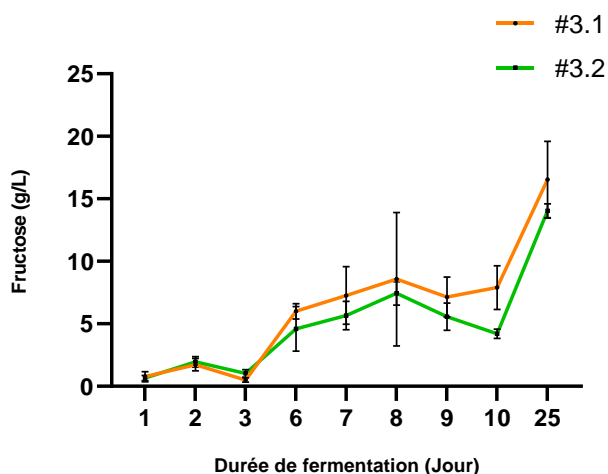


**Figure 25.** Evolution du taux de glucose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série)

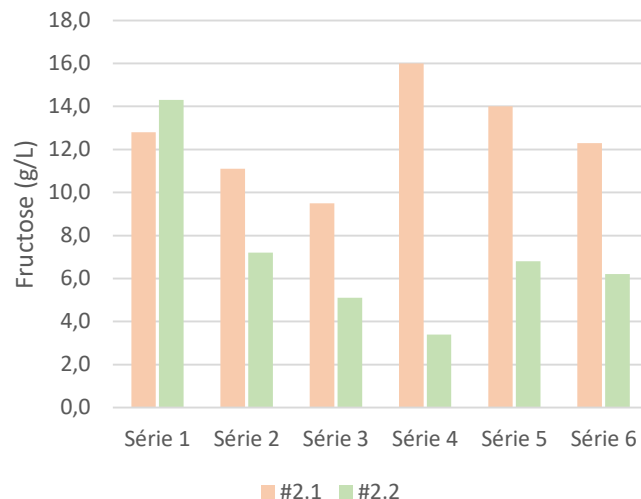
La concentration en fructose augmente au cours de la fermentation (Figure 26). Celle-ci ne présente pas de différence significative avec la concentration en sarrasin, dépendamment du jour de prélèvement ( $P < 0,05$ ). L'accroissement de la teneur en fructose est supérieur à celle du glucose. En effet, la concentration initiale en fructose s'élève à 0,77 et 0,67g/L (J1) pour atteindre 16,53 et 14,03g/L à J25, pour les échantillons #3.1 et #3.2 respectivement. Ainsi, lors de l'hydrolyse du saccharose (disaccharide donnant une unité de glucose et une de fructose), le glucose étant le substrat favorable à la synthèse d'éthanol d'une part et de cellulose du SCOBY d'autre part ; il est davantage utilisé par les microorganismes que le fructose (davantage présent dans le milieu) au cours de la fermentation<sup>47</sup>. De plus, le sobacha étant une matrice amidonnée, le fructose est très faiblement apporté par celle-ci.

L'évolution du taux de fructose au cours des fermentations successives varie en fonction de la concentration (Figure 27). Comme observé précédemment pour le glucose, le milieu fermentaire #2.1 est davantage propice à la fermentation (en comparaison au milieu #2.2). Ceci se traduit par une acidification du milieu, une dégradation des sucres complexes et une synthèse des sucres simples plus importantes lorsque la concentration en nutriments contenus dans le sobacha est supérieure (#2.1). De ce point de vue, les deux cinétiques arrivant à une même valeur de pH avec des vitesses de fermentation différentes, la valeur seuil de pH atteinte semble donc être inhibitrice. En outre, pour une même acidité, la boisson #2.1 pourrait être plus sucrée et plus alcoolisée que la #2.2. Il est à noter que pour les deux concentrations, la synthèse de sucres simples baisse à partir de la série 5 (de 12,8 à 14,0g/L pour #2.1 et de 14,3 à 6,8g/L pour #2.2), signifiant une baisse générale de la capacité fermentaire du milieu au cours du temps qui pourrait avoir son origine dans une modification du microbiome en fonction du milieu et des nutriments disponibles dans celui-ci.





**Figure 26.** Evolution du taux de fructose (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$ )

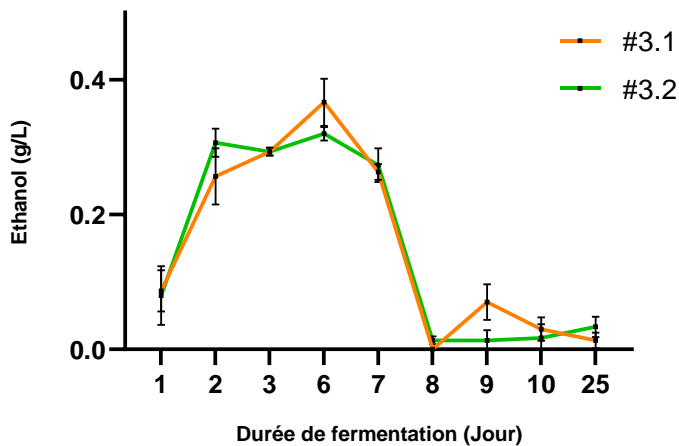


**Figure 27.** Evolution du taux de fructose (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série)

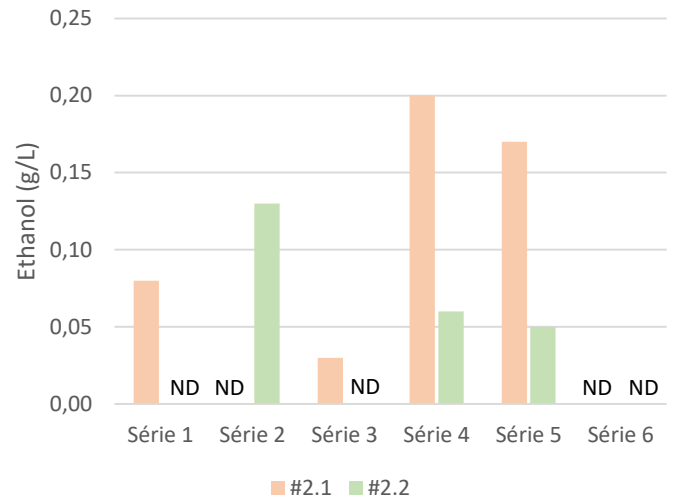
Dans un second temps, l'évolution de la concentration en éthanol au cours de la fermentation est analysée. Celle-ci évolue globalement de manière significative avec la concentration en sarrasin ( $P > 0,05$ ) (Figure 28). Le taux d'éthanol est croissant en début de fermentation et ce jusqu'à J7 (de 0,10 à 0,30g/L pour #3.1 et #3.2) pour ensuite chuter et stagner en fin de F1 ainsi qu'en F2 (0,02 et 0,03g/L pour #3.1 et #3.2 respectivement). La synthèse d'éthanol en début de fermentation F1 est une tendance observée dans la littérature<sup>96</sup>. La cinétique de production d'éthanol s'explique par l'initiation de *Saccharomyces cerevisiae* à l'activité métabolique des levures, premiers acteurs de la fermentation qui synthétisent l'éthanol grâce à la disponibilité en substrats carbonés (principalement le glucose) et azotés ainsi qu'en oxygène dans le milieu. Les interactions microbiennes entre les *Saccharomyces* et les levures non-*Saccharomyces* également présentes dans le consortium permettent, de par leur voie métabolique différente, d'empêcher les risques de blocages de la fermentation ; mais également la synthèse d'arômes et de saveurs sur le produit final<sup>25</sup>. Des acides organiques sont ensuite synthétisés par les bactéries acétiques principalement, avec pour substrat l'éthanol produit par les levures<sup>25,39,42,54</sup>.

Ces faibles taux d'éthanol contenus dans les échantillons en fin de fermentation sont, en outre, inférieurs à la limite fixée de 1,2% (v/v) de commercialisation des boissons non alcoolisées.

Concernant la cinétique de production d'éthanol dans les fermentations en série, elle varie en fonction de la concentration en sarrasin (Figure 29). En effet, la concentration en éthanol augmente à deux reprises en série 2 (0 à 0,13g/L) et en série 4 (0 à 0,06g/L) pour l'échantillon #2.2 alors qu'il n'augmente qu'une fois fortement en série 4 (0,2g/L) pour l'échantillon #2.1, débutant par une concentration non nulle en série 1 (0,08g/L). Ces tendances opposées en début de fermentation pourraient provenir d'une erreur de mesure de l'échantillon #2.1 série 1 puisque les dosages en éthanol #3.1 à J25 sont proches de 0g/L. Le reste de la cinétique met en lumière l'activité métabolique supérieure des levures à produire de l'éthanol lorsque le sobacha est plus concentré, allant de pair avec la consommation plus élevée des sucres, explicité précédemment. Cependant, les teneurs en éthanol restent faibles en comparaison à celles du kombucha par exemple<sup>25</sup> (5,5 g/L pour une teneur en saccharose initiale de 100g/L<sup>49</sup>), induisant de faibles variations des processus biologiques impliqués.



**Figure 28.** Evolution du taux d'éthanol (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)

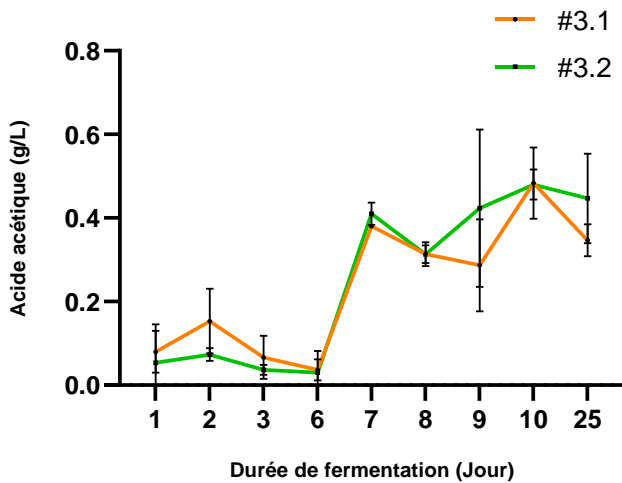


**Figure 29.** Evolution du taux d'éthanol (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (ND : non détecté)

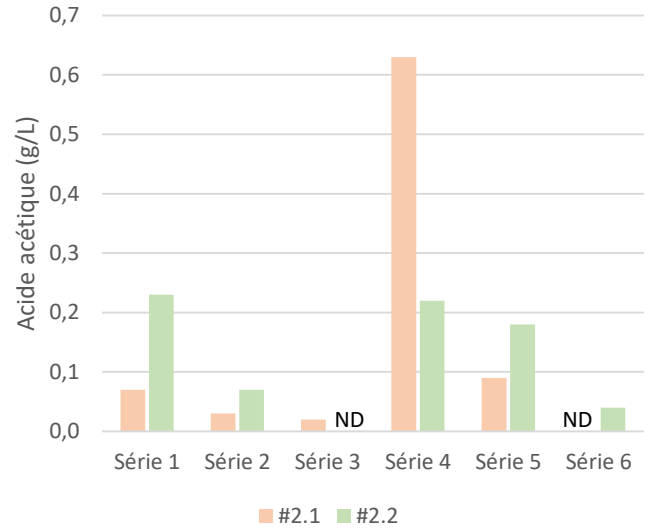
En considérant la composition du microbiome de kombucha apporté par le jus de repiquage et le SCOBY de kombucha, l'éthanol produit par les levures peut être converti via différentes voies fermentaires en acides organiques et ce, par différentes bactéries spécifiques. Dès lors, parmi ces acides organiques, la cinétique de production de l'acide acétique est inversée à celle de l'éthanol (Figure 30) : c'est à partir de J7 que l'activité des bactéries acétiques est importante (0,10 en J1 à 0,40g/L en J7, pour #3.1 et #3.2) puis celle-ci fluctue légèrement jusqu'en fin de F2 (0,30g/L en J8, maximum de 0,50g/L en J10). En outre, la concentration en acide acétique évolue de manière significative ( $P > 0,05$ ) avec la concentration en sarrasin (indépendamment du jour de prélèvement). L'étude de Neffe-Skocinska et al. (2017) renseigne un début de production d'acide acétique à J3<sup>47</sup>. Les bactéries dominantes du SCOBY de kombucha sont les AAB, des bactéries aérobies capables d'utiliser l'éthanol comme substrat pour synthétiser l'acide acétique. Contrairement aux levures, elles ont besoin de grandes quantités d'oxygène pour leur croissance et leur activité. La voie métabolique majoritaire est basée sur la conversion de l'acétaldéhyde en éthanol puis de l'hydrate d'acétaldéhyde en acide acétique par l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase<sup>46</sup>. Il est à noter que la teneur en acide acétique d'un kombucha est plus élevée en fin de fermentation (5,6g/L pour une teneur initiale en saccharose de 70g/L)<sup>49</sup>.

Concernant la production de boissons fermentées sur matrice céréale, la teneur maximale en acide acétique s'élève approximativement à 0,4 g/L à partir de laquelle le goût de vinaigre se développe<sup>18</sup>.

L'évolution de la production d'acide acétique au cours des fermentations en série suit la même tendance pour les deux concentrations en sarrasin testées (Figure 31). En effet, mis à part la potentielle erreur de mesure pour l'échantillon #2.1 série 4 (0,63g/L), la concentration en acide acétique diminue jusqu'en série 3 (0,07 à 0,02g/L pour #2.1 et 0,23 à 0g/L pour #2.2) puis augmente en série 4 (0,63 pour #2.1 et 0,22g/L pour #2.2) pour diminuer à nouveau jusqu'en série 6 (0 pour #2.1 et 0,04g/L pour #2.2). Dès lors, la production d'acide acétique semble plus importante lorsque la concentration en sarrasin est plus faible, en opposition à la tendance dégagée pour la production d'éthanol.

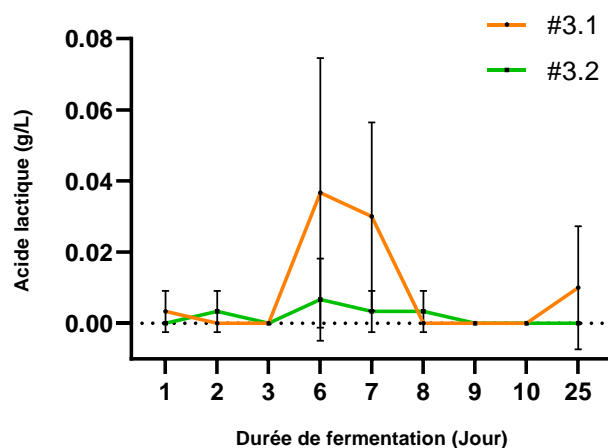


**Figure 30.** Evolution du taux d'acide acétique (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)



**Figure 31.** Evolution du taux d'acide acétique (g/L) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (ND : non détecté)

Pour finir, l'acide lactique évolue de manière significative avec la concentration en sarrasin ( $P > 0,05$ ) (indépendamment du jour de prélèvement) (Figure 32). On retrouve, comme pour l'acide acétique, un pic de production d'acide lactique aux J6 et J7 (0,04 pour #3.1 et 0,01g/L pour #3.2) mais celui-ci est beaucoup plus faible que l'acide acétique. Dans la littérature, la teneur limite fréquemment fixée pour la production de boissons fermentées sur matrice céréalière pour l'acide lactique est d'environ 0,93 g/L<sup>18</sup>. En effet, les bactéries lactiques représentent une part minoritaire du microbiome présent dans le SCOBY de kombucha par rapport aux bactéries acétiques. De plus, l'acide lactique synthétisé est plus élevé concernant la fermentation du kombucha (5,5g/L pour une teneur en sucre initiale de 100g/L)<sup>46</sup>. Pour cette raison, l'étude des cinétiques d'évolution du taux d'acide lactique au cours des fermentations successives n'a pas été réalisée. De plus, les tendances observées pour l'évolution de l'acide acétique au cours des séries permettent de soulever l'hypothèse que les microorganismes majoritaires composant le SCOBY restent les bactéries acétiques, malgré l'évolution de l'aspect de celui-ci. Outre l'activité biochimique de ce type de bactéries de l'oxydation du glucose en acide gluconique, une autre voie métabolique conduit à la synthèse de la cellulose microbienne formant le biofilm en surface<sup>25</sup>. La production de cellulose (synthèse du précurseur de la cellulose et polymérisation de résidus de glucose en chaînes de  $\beta$ -1,4-glucanes principalement) permet le développement rapide de la bactérie dans des conditions contrôlées et permet la production de cellulose au départ de divers substrats carbonés (le glucose, l'éthanol, le saccharose et le glycérol)<sup>25,42</sup>.



**Figure 32.** Evolution du taux d'acide lactique (g/L) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3)

Les acides gluconique et glucuronique sont des composés majoritairement présents et synthétisés par le microbiome du SCOBY de kombucha<sup>25</sup>. Selon une étude de Villarreal-Soto et al (2018), les quantités de ces deux acides s'élèvent à 39g/L<sup>49</sup> et 0,0160g/L<sup>39</sup> respectivement (pour des concentrations initiales en saccharose de 100 et 70g/L respectivement). Dépendamment de l'inoculum et de la concentration initiale en sucre, l'acide glucuronique est considéré comme l'agent au pouvoir thérapeutique le plus important dans le kombucha<sup>42</sup>.

Malgré l'augmentation constante des acides organiques au cours du processus de fermentation, indépendamment de la température appliquée, aucun changement significatif de la valeur du pH n'est observé (cf. II.1)<sup>47</sup> : cela peut être lié à certains effets tampons du jus de repiquage<sup>97</sup>. En effet, une fois les acides organiques synthétisés par le microbiome, l'inhibition de certains d'une part et l'évolution d'autres vers une synthèse d'arômes permet de mettre en lumière la production et l'évolution de ces acides sans que l'acidification ne continue dans le milieu fermentaire.

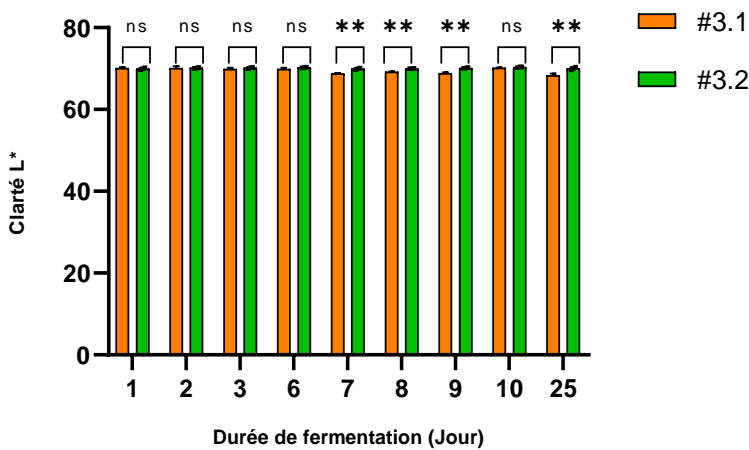
### 3. Analyses colorimétriques

L'espace couleur  $L^*a^*b^*$  (auss appelé CIELAB, norme ISO 11664-4:2008(fr) Colorimétrie — Partie 4: Espace chromatique  $L^*a^*b^*$  CIE 1976) permet la caractérisation des couleurs de surface<sup>98</sup>. Dans l'espace couleur  $L^*a^*b^*$ ,  $L^*$  indique la clarté (les valeurs de 0 et de 100 correspondant au noir et au blanc respectivement) tandis que  $a^*$  et  $b^*$  sont les coordonnées de chromaticité (en rapport à celle d'une surface grise de même clarté). Ainsi,  $a^*$  et  $b^*$  indiquent le sens des couleurs selon la théorie des couleurs opposées :  $+a^*$  va vers le rouge,  $-a^*$  vers le vert,  $+b^*$  va vers le jaune,  $-b^*$  vers le bleu. Les cinétiques de variation des paramètres de description de la couleur des échantillons des expériences #2 et #3 sont présentées en Figures 33 à 38. Les données brutes sont référencées en annexe 6.

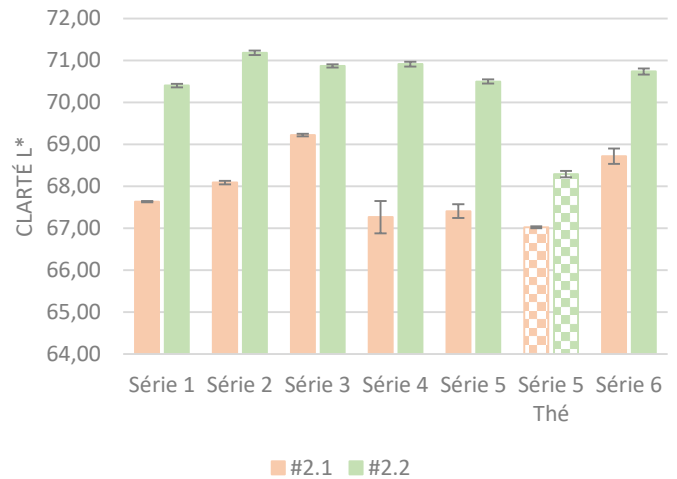
Dans un premier temps, l'évolution de la clarté des échantillons de l'expérience #3 est présentée à la Figure 33. La clarté varie de manière non significative avec la concentration en sarrasin ( $P < 0,05$ ) en début de F1, une différence significative est en revanche observée de J7 à J9 (de l'ordre de 68 pour #3.1 et de 70 pour #3.2) ainsi qu'en fin de F2 (68,33 pour #3.1 et 70,02 pour #3.2). Globalement, la clarté des échantillons est constante au cours de la fermentation, avec quelques fluctuations minimales durant celle-ci. Les échantillons sont considérés comme clairs, se rapprochant significativement de la clarté maximale (blanc).

Concernant les valeurs de clarté obtenues en fin de procédé au cours des fermentations en série (Figure 34), celles-ci sont assez similaires à celles de l'expérience #3. Ces valeurs fluctuent pour les

fermentations successives et on observe des différences faibles mais significatives entre les valeurs obtenues dans l'expérience #2.1 (de l'ordre de 68) et l'expérience #2.2 (de l'ordre de 70). Outre les 6 séries successives étudiées jusqu'à présent, une série spécifique a été rajoutée (série 5 Thé). Celle-ci correspond à une fermentation réalisée sur un substrat à base de thé classique pour le kombucha avec un inoculum (jus de repiquage et SCOBY) issu de la série 5 afin d'évaluer si la fermentation pouvait retrouver ses paramètres initiaux. Les valeurs de clarté correspondantes obtenues et reprises dans la Figure 34 sont plus faibles : de l'ordre de 68 pour #2.1 et 69 pour #2.2. La différence de clarté soulignée ici est expliquée par la différence de matrice que compose les boissons ; le thé étant plus foncé que l'infusion de sarrasin. Ainsi, la différence de clarté observée dépend de la matrice utilisée pour la fermentation<sup>18,99</sup>.



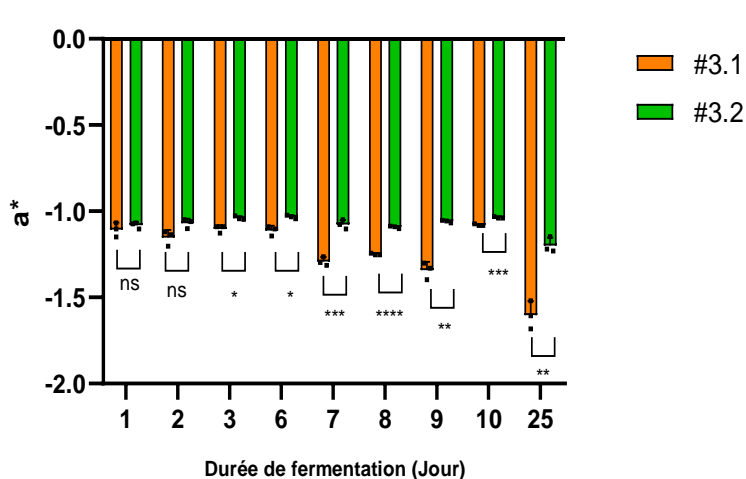
**Figure 33.** Evolution de la clarté L\* des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (*moyenne ± écart-type ; n=3 ; T test; \*\*\*\*\*, P < 0.0001 ; \*\*\*, P < 0.001 ; \*\*, P < 0.01 ; \*, P < 0.05 ; ns, non-significatif*)



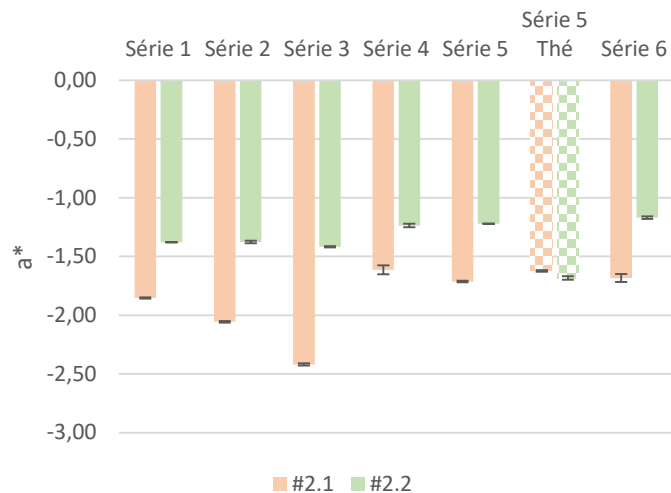
**Figure 34.** Evolution de la clarté L\* des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (*moyenne ± écart-type ; n=3*)

D'autre part, l'évolution de la composante chromatique a\* des échantillons de l'expérience #3 est significativement impactée par la concentration en sarrasin à partir de J3 et ce jusqu'en fin de F2 (Figure 35). Au cours de la fermentation, les valeurs de a\* restent néanmoins globalement constantes (J1 à J25) et sont de l'ordre de -1,11 à -1,60 pour #3.1 et de -1,08 à -1,20 pour #3.2. Ces valeurs négatives traduisent une composante chromatique se rapprochant légèrement du vert plutôt que du rouge, tendance davantage prononcée pour les échantillons de l'expérience #3.1.

Concernant les fermentations successives (Figure 36), les valeurs de a\* à la fin de chacune des séries sont proches mais significativement différentes en fonction de la concentration en sarrasin. En effet, les valeurs se situent dans une gamme entre -1,85 à -1,68 pour l'expérience #2.1 et entre -1,38 à -1,17 pour l'expérience #2.2. D'autre part, ces valeurs sont comparables à celles obtenues pour les échantillons de l'expérience #3, se rapprochant légèrement du vert en dépit du rouge. D'autre part, la série 5 d'inoculation dans du thé présente pour les deux concentrations en sarrasin une valeur de a\* de l'ordre de -1,6 : la matrice thé n'impacte pas le paramètre a\* pour l'échantillon de l'expérience #2.1 mais présente une variation de teinte davantage verte pour l'échantillon de l'expérience #2.2.



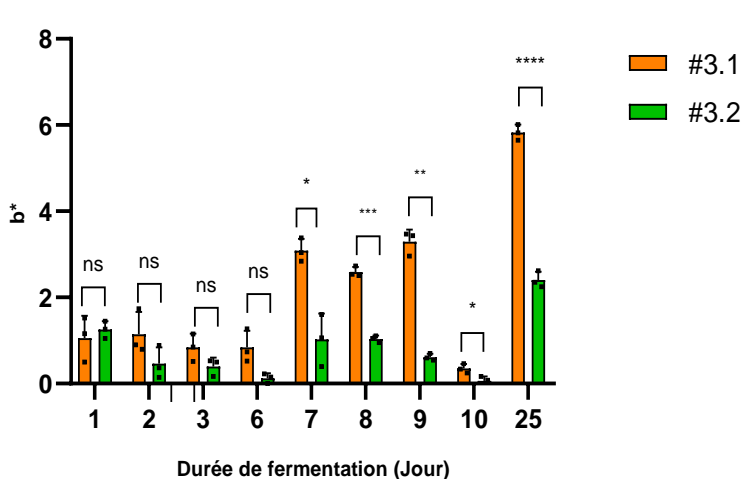
**Figure 35.** Evolution de la composante chromatique a\* des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne ± écart-type ; n=3)



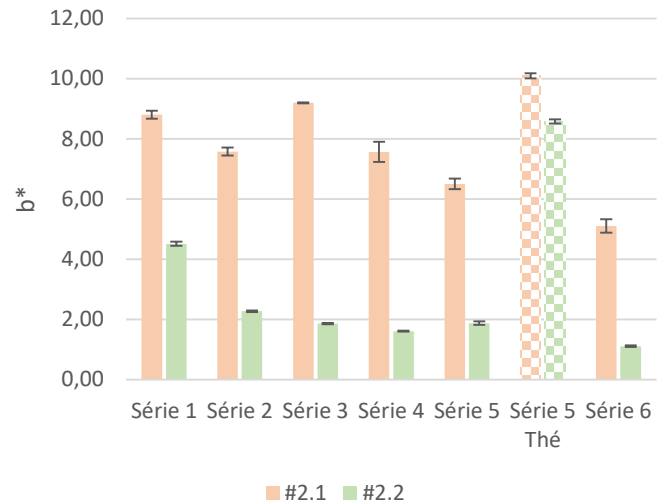
**Figure 36.** Evolution de la composante chromatique a\* des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (moyenne ± écart-type ; n=3)

Finalement, l'évolution de la deuxième composante chromatique, b\*, balayant les couleurs du jaune au bleu est discutée. Le paramètre b\* varie de manière significative ( $P > 0,05$ ) avec la concentration des échantillons de l'expérience #3 à partir de J7 et ce jusqu'en fin de F2 (J25) (Figure 37). En effet, en début de fermentation les valeurs de b\* sont de l'ordre de 1 et atteignent jusque 5,83 pour #3.1 et 2.41 pour #3.2. Ces valeurs traduisent une teinte se rapprochant du jaune plutôt que du bleu, évoluant de manière croissante au cours de la fermentation. De plus, la teinte jaune est davantage prononcée pour l'échantillon #3.1. La valeur de b\* peut dès lors être considérée comme le paramètre le plus représentatif de l'évolution de la couleur de la boisson au cours de la fermentation.

Concernant les fermentations successives, les cinétiques d'évolution du paramètre b\* varient de manière significative en fonction de la concentration en sarrasin (Figure 38) et également au fil des séries. En effet, le paramètre b\* est plus élevé pour les échantillons de l'expérience #2.1 et est de l'ordre de 8,80 pour la série 1 et diminue jusque 5,10 pour la série 6, tandis qu'il s'élève à 4,51 et baisse jusque 1,10 pour l'expérience #2.2. Les valeurs se situant positivement sur l'axe chromatique, les échantillons présentent dès lors des teintes jaunes croissantes au fil des séries et plus importantes lorsque la concentration en sarrasin est supérieure. Pour la comparaison qualitative avec la série 5 Thé, les valeurs de b\* observées sont plus élevées et également plus élevées avec la concentration en sarrasin (10,10 pour l'expérience #2.1 et 8,58 pour l'expérience #2.2). Comme explicité précédemment, la couleur de la matrice de départ est l'élément principal à l'origine de la variation des composantes chromatiques<sup>18,99</sup>.



**Figure 37.** Evolution de la composante chromatique  $b^*$  des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$ )



**Figure 38.** Evolution de la composante chromatique  $b^*$  des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$ )



**Figure 39.** Photographie illustrant la couleur des boissons #2.1 (50g/L en kasha) et #2.2 (10g/L) série 5 en fin de F2

En conclusion, dans le cas de l'hakko sobacha, le facteur impactant le plus les paramètres colorimétriques de la boisson est la concentration en sarrasin dans la matrice céréale de départ. Au cours de la fermentation, deux phénomènes liés à l'activité des microorganismes coexistent : la croissance microbienne qui influence la turbidité et la production/dégradation de composés chromatiques. En outre, le milieu fermentaire va se foncer et gagner en turbidité. Au fil des fermentations successives, une acidification plus lente du milieu est observée et l'évolution de la couleur des échantillons vers le trouble foncé est moins prononcée. Le pH pourrait être un marqueur de la fermentation, impactant directement la couleur de la boisson. L'étude de l'apparition ou de la dégradation de composés chromophores n'est à ce jour pas référencée dans la littérature. Ainsi, il est difficile de conclure de



l'impact de molécules chromophores sur la couleur de la boisson. Il est à noter que les solutions étant maintenues à l'abri de la lumière, l'oxydation des composants photosensibles pouvant faire varier ces paramètres peut être considérée comme limitée. Pour les séries inoculées dans du thé, la couleur est très différente puisque le thé est une matrice bien plus foncée que le sobacha. La Figure 39 illustre la différence de couleur en fonction de la concentration en sobacha ainsi que la turbidité type obtenue en fin de fermentation. Aucune information supplémentaire n'est trouvée dans la littérature, l'étude colorimétrique des boissons fermentées n'étant pas une analyse de routine couramment pratiquée.

#### 4. Analyses des composés organiques volatils par GC-MS

##### a. Analyse des COV présents dans la matrice sobacha

Dans le cadre de cette étude, une série de composés organiques volatils ont été identifiés dans l'infusion sobacha et sont repris à la Table 2 ainsi que leurs proportions respectives (% aire sous la courbe) et la concentration en sarrasin de l'infusion correspondante. Les COV sont également classés par famille de molécules. La proportion de chacune de ces familles est également représentée à la Figure 40.

Plusieurs tendances se dégagent des résultats obtenus : d'une part, certaines molécules identifiées se retrouvent pour les deux modalités d'infusion (acides carboxyliques, alcènes, terpènes) avec des proportions supérieures pour la modalité #1.2, et d'autre part, certaines molécules ne sont présentes qu'à l'une ou l'autre concentration en sarrasin (alcènes, alcools, benzènes, certains esters, pyrazines et pyrroles pour #1.1 et aldéhydes, cétones, certains esters et phénols pour #1.2). Il est important de noter que lorsque l'un ou l'autre COV est « absent » d'un échantillon, il peut en réalité se trouver à des proportions inférieures aux limites fixées (% aire  $\geq$  5%) en début d'analyse.

Les familles de molécules en proportions majoritaires dans la matrice céréalière sont les acides carboxyliques (11,82 et 21,08% pour #1.1 et #1.2 respectivement) et les terpènes (19,79 et 21,84% pour #1.1 et #1.2 respectivement). Les acides carboxyliques retrouvés dans la matrice constituent les acides gras retrouvés dans l'infusion de sarrasin<sup>43,44</sup>. Ils sont davantage présents dans l'infusion lorsque la concentration en sarrasin est inférieure (#1.2) ; le volatil majoritaire étant l'acide hexadecanoïque en proportion 11,97%. L'acide palmitique est un acide gras saturé majoritairement retrouvé chez les plantes, ayant un arôme cireux.<sup>100</sup>

Les terpènes retrouvés dans l'infusion sont le squalène (en proportion 11,69 pour #1.1 et 12,45% pour #1.2) et le myrcène (8,09 pour #1.1 et 9,39% pour #1.2). Ces molécules aux propriétés odoriférantes, présentent des propriétés de défense contre les prédateurs et d'attraction pour les pollinisateurs de la plante<sup>101</sup>. Le squalène possède, d'autre part, des propriétés anti-oxydantes et est l'un des précurseurs de la famille des stéroïdes (processus d'oxydation enzymatique de la molécule). Le myrcène quant à lui est caractéristique des arômes terreux, de raisin et d'épices ainsi que pour ses propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes<sup>32,44,102</sup>.

La famille des esters est une famille diversifiée, présente en proportion totale de 12,53% dans l'échantillon #1.2. Ces composés organiques sont des dérivés des acides carboxyliques, également présents en proportions supérieures pour l'échantillon #1.2. Les esters sont une famille importante de COV présentant des arômes fruités et floraux<sup>89</sup>.

Pour finir, les COV de la famille des pyrazines sont également présents sous diverses formes et leur proportion totale dans l'échantillon #1.1 s'élève à 13,30%. Ces molécules étant principalement des produits de réactions de Maillard<sup>103</sup>, ils participent à des arômes grillés, torréfiés, terreux<sup>44,104</sup>. Ces COV présents dans la matrice sont caractéristiques des arômes du kasha développés lors du processus de torréfaction des graines de sarrasin<sup>32,34,70</sup>. Ainsi, la proportion de pyrazines est corrélée positivement à la concentration en kasha. Le composant majoritaire de cette famille est le 2-éthylpyrazine, en proportion s'élevant à 2,37% (#1.1).

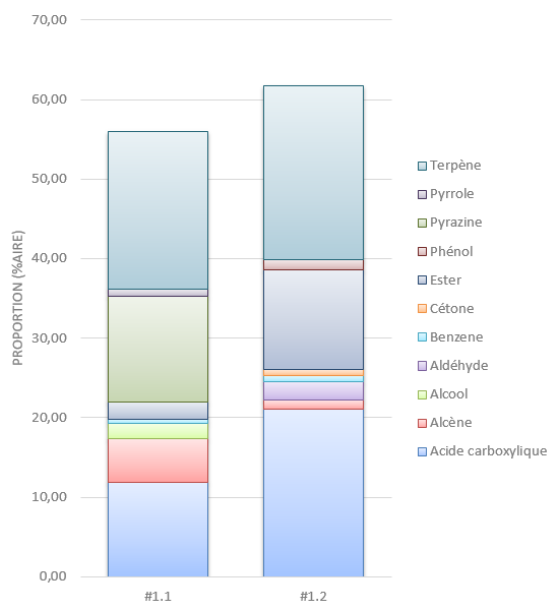
Les familles minoritaires de COV identifiés dans la matrice sont les alcènes, les alcools, les aldéhydes, les benzènes, les cétones, les phénols et les pyrroles : ils sont respectivement présents en proportions 5,56/1,16% ; 1,84/nd% ; nd/2,32% ; 0,59/0,69% ; nd/0,78% ; nd/1,33% ; 0,81/nd% dans les échantillons #1.1 et #1.2 respectivement (nd : non détecté dans les conditions d'analyse). Les arômes caractéristiques des alcools, aldéhydes, cétones et phénols sont aigre/sûr ; fruité/vert ; beurre/caramel ;



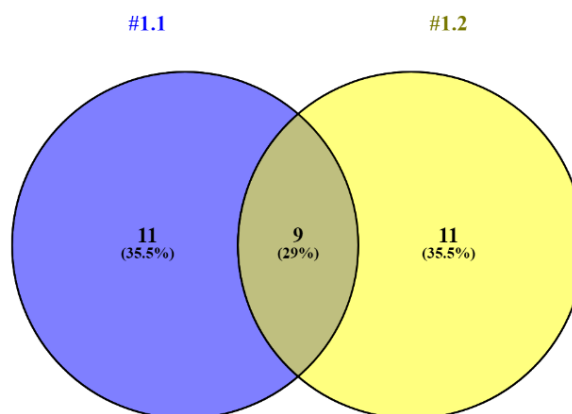
fumé, respectivement<sup>89</sup>. Ainsi, ces arômes sont moins marqués dans l'infusion puisqu'ils sont présents en plus faible proportion dans la matrice.

**Tableau 2.** Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de sobacha #1 (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha)

Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#1.1	#1.2
<b>Acide carboxylique</b>		11,816	21,078
(Z)-hexadec-9-enoic acid	373-49-9	2,664	3,332
(Z)-octadec-9-enoic acid	112-80-1	0,828	1,548
hexadecanoic acid	142-62-1	5,6	11,971
Octadecanoic acid	57-11-4	0,592	0,869
Pentadecanoic acid	1002-84-2	0,924	1,443
Tetradecanoic acid	544-63-8	1,208	1,915
<b>Alcène</b>		5,565	1,156
(4R)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	5989-27-5	0,992	1,156
2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-indene	695-90-9	4,573	
<b>Alcool</b>		1,841	
heptan-1-ol	111-70-6	1,841	
<b>Aldéhyde</b>			2,319
Decanal	112-31-2		1,069
Nonanal	124-19-6		1,25
<b>Benzène</b>		0,597	0,691
1-methyl-3-propan-2-ylbenzene	535-77-3		0,691
1-methyl-4-propan-2-ylbenzene	99-87-6	0,597	
<b>Cétone</b>			0,784
(8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R)-6-methylheptan-2-yl]-1,2,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-7-one	567-72-6		0,784
<b>Ester</b>		2,199	12,531
(3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	77-68-9		0,641
3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl acetate	115-95-7		7,838
bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate	117-81-7		0,674
bis(2-ethylhexyl) hexanedioate	103-23-1		0,693
bis(2-methylpropyl) benzene-1,2-dicarboxylate	84-69-5		1,335
methyl hexanoate	106-70-7	2,199	
propan-2-yl hexadecanoate	142-91-6		1,35
<b>Phénol</b>			1,333
2,4-ditert-butylphenol	96-76-4		1,333
<b>Pyrazine</b>		13,305	
2-ethylpyrazine	13925-00-3	2,377	
2-methyl-6-(3-methylbutyl)pyrazine	91010-41-2	1,19	
2-methylpyrazine	109-08-0	0,765	
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	18138-05-1	1,33	
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	13360-65-1	6,3	
5-ethyl-2,3-dimethylpyrazine	15707-34-3	1,343	
<b>Pyrrole</b>		0,806	
1-(furan-2-ylmethyl)pyrrole	1438-94-4	0,806	
<b>Terpène</b>		19,792	21,844
(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	111-02-4	11,693	12,451
7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene	123-35-3	8,099	9,393



**Figure 40.** Représentation graphique de la proportion des familles de COV (%aire) du sobacha (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha)



**Figure 41.** Comparaison qualitative<sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons de sobacha (#1.1 : 50g/L et #1.2 : 10g/L en kasha)

De ces observations, les échantillons de la matrice correspondant aux deux concentrations en sarrasin testées ont 29% de COV en commun (correspondant aux molécules suivantes : (4R)-1-méthyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexène ; (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracosane-2,6,10,14,18,22-hexaène ; (Z)-hexadéc-9-énoïque ; (Z)-octadéc-9-énoïque ; 7-méthyl-3-méthylidèneocta-1,6-diène ; hexadécanoïque ; octadécanoïque ; pentadécanoïque ; tétradécanoïque). En outre, chaque échantillon présente 35,5% de COV spécifiques : les alcools, pyrazines et pyrroles sont caractéristiques de l'échantillon #1.1 tandis que les aldéhydes ainsi que la plupart des esters caractérisent l'échantillon #1.2 (Figure 41).

D'autre part, afin de définir si un COV participe de manière significative à l'arôme d'un produit, sa valeur d'activité olfactive (OAV) peut être calculée. Celle-ci est déterminée en divisant la proportion du composé dans l'infusion par sa valeur seuil olfactive obtenue à partir de la littérature. Les composés ayant une OAV supérieure à 10 peuvent être considérés comme des contributeurs significatifs de l'arôme de l'échantillon<sup>105</sup>. En outre, les composés retrouvés dans la littérature (extraction de type SPME) ayant une forte probabilité de contribuer à l'arôme du sobacha ( $OAV \geq 10$ ) sont les suivants : 2-méthylpyrazine (noisette, cacao torréfié), 3-éthyl-2,5-diméthylpyrazine (torréfié), decanal (doux, cireux) et nonanal (cire, herbe verte)<sup>70,100,102</sup>. L'arôme doux et fruité (notes d'ananas) du méthyl hexanoate participe également à l'arôme de l'infusion<sup>106</sup>.

b. Etude statistique des cinétiques de développement des COV au cours de la fermentation des échantillons #3

L'analyse en composantes principales effectuée sur les données de l'expérience #3 considère 18 échantillons (se référant aux modalités de jour de fermentation (J1 à J25) croisées à celles de la concentration en sarrasin (#3.1 et #3.2)) et 67 variables (correspondant aux COV identifiés de l'expérience #3). Les valeurs utilisées pour l'analyse (Tables 3 et 4 pour #3.1 et #3.2 respectivement) sont les moyennes (n=3) des proportions (% aire sous la courbe) des COV présents dans les échantillons. Les Figures 42 et 43 (#3.1 et #3.2 respectivement) illustrent graphiquement l'évolution des proportions des familles de COV au cours des cinétiques de fermentations pour les deux concentrations en sarrasin.

Dans un premier temps, afin de mesurer la fiabilité de la lecture du plan d'analyse et donc la qualité globale explicative de l'analyse, il s'agit d'étudier la distribution de l'inertie. Celle-ci permet d'indiquer si les variables sont structurées et le nombre de composantes principales à considérer pour l'analyse. Les deux premiers axes de l'analyse expriment 56,82% de l'inertie totale du jeu de données ; cette variabilité totale des individus est ainsi représentée dans le plan 1:2 (Figure 44). Cette valeur est supérieure à 23,81%<sup>2</sup> : la variabilité expliquée par ce plan est donc plus significative. De ces observations, l'analyse de la troisième dimension peut être complémentaire. Ainsi, la description des 3 premiers axes révèle un taux d'inertie de 69,65% (> 33,41% correspondant au 0,95-quantile de distributions aléatoires). Seuls ces axes sont considérés comme porteurs d'une information et l'analyse sera restreinte à ceux-ci.

**Tableau 3.** Moyennes des proportions (% d'aire sous la courbe) des COV identifiés des échantillons #3.1 (50g/L en kasha) (n=3)

Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#3.1 J1	#3.1 J2	#3.1 J3	#3.1 J6	#3.1 J7	#3.1 J8	#3.1 J9	#3.1 J10	#3.1 J25
Acide carboxylique		14.18 1	13.22 9	18.50 4	15.94 6	11.78 8	4.024	5.694	4.873	5.338
Acide acétique	64-19-7	2.632	0.908	1.420	2.309			0.792	0.792	1.228
Decanoic acid	334-48-5	3.805	3.900	2.265	1.454	1.463	1.508	1.351	1.221	
hexadecanoic acid	57-10-3	3.016	3.447	4.009	2.197	1.267	0.722	0.995	0.974	1.772
Nonanoic acid	112-05-0	3.009	3.627	2.983	2.646	2.985	1.794	2.556	1.886	2.338
Octanoic acid	124-07-2			5.782	5.782	4.784				
Pentadecanoic acid	1002-84-2	0.513		0.673	0.493	0.420				
Tetradecanoic acid	544-63-8	1.205	1.348	1.372	1.066	0.869				
Alcool		7.259	6.505	7.265	6.779	4.897	4.237	4.055	4.953	4.264
2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol	98-55-5			0.318	0.318	0.294				
2-ethylhexan-1-ol	104-76-7	0.465	0.469	0.596	0.536	0.502	0.474	0.465	0.473	0.422
3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	78-70-6	1.182	0.993	0.946	0.861	0.737	0.539	0.490	0.656	0.594
heptan-1-ol	111-70-6	5.611	5.042	5.406	5.064	3.364	3.225	3.100	3.824	3.248
Aldéhyde		2.772	4.363	2.526	3.106	5.465	5.631	6.131	5.949	5.308
5-(hydroxyméthyl)furan-2-carbaldehyde	67-47-0									
Decanal	112-31-2	1.609	2.661	1.327	1.329	1.794	2.074	2.607	2.408	2.027
Nonanal	124-19-6	1.163	1.702	1.198	1.357	1.655	1.851	1.990	1.993	1.719
Octanal	124-13-0					1.579	1.264	1.034	1.074	1.136
Undecanal	112-44-7				0.419	0.437	0.442	0.500	0.475	0.426
Cétone		3.074	3.016	3.119	4.435	4.063	1.481	2.436	2.495	2.517
2,6-ditert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one	10396-80-2	0.513	0.615	0.384	0.390	0.402		0.483	0.426	0.410
3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydropyran-4-one	28564-83-2							0.418	0.515	0.641
3-ethyl-1H-quinoxalin-2-one	13297-35-3	0.476		0.517	0.511	0.478				
4,4,7a-triméthyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one	17092-92-1	0.597	0.559	0.594	0.610	0.559	0.627	0.651	0.693	0.643
5-heptyloxolan-2-one	104-67-6	1.488	1.843	1.624	1.813	1.813				
5-pentyloxolan-2-one	104-61-0				1.112	0.811	0.854	0.884	0.862	0.823
Ester		11.66 8	14.13 2	16.65 5	16.61 5	12.90 8	5.909	8.955	9.490	10.158
(2-decanoyloxy-3-octanoyloxypropyl) decanoate	82426-88-8	0.406		0.452	0.452	0.394				

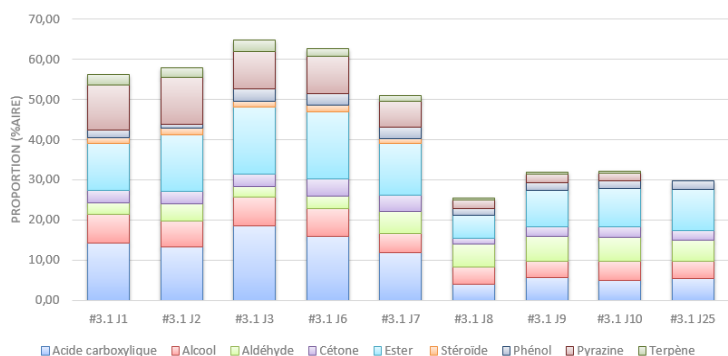
<sup>2</sup> Inertie de référence du quantile « 0,95-quantile » de la distribution de pourcentages d'inertie obtenu en simulant 4766 jeux de données aléatoires de dimensions comparables sur base d'une distribution normale

(3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	77-68-9	2.034	2.935	2.877	2.622	2.201	2.481	3.756	3.557	4.233
[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	6846-50-0	1.707	2.572	2.714	2.606	2.320	2.608	2.991	2.865	2.558
1,3-di(octanoyloxy)propan-2-yl decanoate	33368-87-5	1.385	1.728	1.380	1.365	1.066				
2,3-di(octanoyloxy)propyl octanoate	538-23-8	0.985	1.247	0.995	1.063	0.747				
2,3-diacetyloxypropyl acetate	102-76-1	0.507	0.473	0.505	0.523	0.497				
2-methylbutyl dodecanoate	93815-53-3			0.480	0.499					
2-phenylethyl acetate	103-45-7	0.793	0.848	4.075	3.597	2.819				
3-methylbutyl dodecanoate	6309-51-9	1.514	1.667	1.746	1.618	1.006				
diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	84-66-2								0.687	0.609
ethyl octanoate	106-32-1				0.703	0.845	0.820	1.609	1.746	1.763
methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	1000222-86-6	1.039	1.100					0.600	0.635	0.995
octan-2-yl hexadecanoate	55194-81-5	0.738	0.862	0.818	0.855	0.552				
octyl octadecanoate	109-36-4	0.559	0.702	0.615	0.713	0.461				
Stéroïde		1.612	1.618	1.607	1.694	1.129				
2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane	111-01-3	1.612	1.618	1.607	1.694	1.129				
Phenol		1.854	0.935	2.889	2.928	2.909	1.630	2.057	2.001	2.067
2,4-ditert-butylphenol	96-76-4	0.478		0.375	0.376	0.409	0.431	0.431	0.375	
2-methoxy-5-[(E)-prop-1-enyl]phenol	19784-98-6	0.609		0.731	0.728	0.669				
4-ethyl-2-methoxyphenol	2785-89-9	0.768	0.935	1.783	1.824	1.831	1.199	1.626	1.626	2.067
Pyrazine		11.28 7	11.63 9	9.437	9.308	6.494	2.156	2.184	1.958	0.000
2,5-dimethyl-3-propylpyrazine	18433-97-1	0.991	6.821	0.482	0.477	0.384				
2,6-diethylpyrazine	13067-27-1			3.395	3.378	2.894	1.731	1.688	1.462	
2-ethyl-5-methylpyrazine	13360-64-0	3.571								
2-ethylpyrazine	13925-00-3			1.950	2.099					
2-Isobutyl-3-methylpyrazine	13925-06-9	0.506	1.071	0.524	0.586	0.713				
2-methoxy-5-methylpyrazine	2882-22-6		0.505	0.752	0.752	0.836				
2-methyl-6-(3-methylbutyl)pyrazine	91010-41-2	1.745	2.146	1.495	1.287	0.928				
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	18138-05-1	1.211	1.095	0.839	0.730	0.739	0.425	0.496	0.496	
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	13360-65-1	3.264								
Terpène		2.495	2.432	2.747	1.977	1.397	0.426	0.415	0.415	
(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane-2,6,10,14,18,22-hexaene	111-02-4	2.495	2.432	2.747	1.977	1.397	0.426	0.415	0.415	

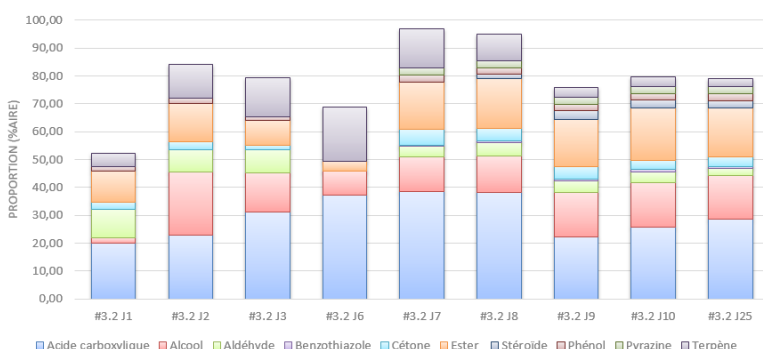
**Tableau 4.** Moyennes des proportions (% d'aire sous la courbe) des COV identifiés des échantillons #3.2 (10g/L en kasha) (n=3)

Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#3.2 J1	#3.2 J2	#3.2 J3	#3.2 J6	#3.2 J7	#3.2 J8	#3.2 J9	#3.2 J10	#3.2 J25
Acide carboxylique		20.044	22.795	31.175	37.112	38.562	38.055	22.315	25.653	28.536
(Z)-hexadec-9-enoic acid	373-49-9		3.167	4.450	5.689	6.950	8.166			
(Z)-octadec-9-enoic acid	112-80-1			1.975	2.239	2.239	2.502			
2-ethylhexanoic acid	149-57-5					0.593	0.593	0.746	0.794	0.903
Acide acétique	64-19-7	3.394	2.591	0.993						
Decanoic acid	64-19-7	2.139	2.678	2.943	3.132	3.492	4.068	4.519	6.170	6.976
hexadecanoic acid	334-48-5	7.457	8.217	10.924	14.231	11.631	7.792	3.645	2.784	2.759
Nonanoic acid	112-05-0	1.999	1.500	2.918	3.022	3.713	4.581	5.409	5.533	6.018

Octanoic acid	124-07-2	1.922	1.848	3.115	2.981	3.858	4.022	6.969	9.281	10.789
Pentadecanoic acid	1002-84-2	1.080	0.995	1.621	2.485	3.054	3.434			
Tetradecanoic acid	544-63-8	2.052	1.799	2.236	3.335	3.034	2.898	1.027	1.091	1.091
Alcool		1.824	22.692	14.145	8.653	12.283	13.378	15.864	16.078	15.648
2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol	98-55-5					0.658	0.658	0.757	0.751	0.744
2-ethylhexan-1-ol	104-76-7					1.250	1.317	1.113	1.180	1.063
2-phenylethanol	60-12-8					4.536	3.279	4.171	3.988	5.954
3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	78-70-6	1.824	1.824	1.810		1.342	1.550	1.385	1.320	1.048
heptan-1-ol	111-70-6		20.868	12.335	8.653	4.125	6.202	7.750	7.837	5.836
nonan-1-ol	143-08-8					0.372	0.372	0.688	1.003	1.003
Aldéhyde		10.214	8.180	8.058	0.000	3.849	4.721	4.243	3.869	2.643
Decanal	112-31-2	4.016	3.568	3.510		1.714	1.956	1.768	1.595	1.176
Dodecanal	112-54-9	1.166	0.568							
Nonanal	124-19-6	3.750	3.479	4.548		2.135	2.765	2.475	2.275	1.466
Undecanal	112-44-7	1.282	0.565							
Benzothiazole						0.395	0.395	0.570	0.744	0.744
1,3-benzothiazole	95-16-9					0.395	0.395	0.570	0.744	0.744
Cétone		2.646	2.857	1.684		5.664	4.468	4.379	3.472	3.239
(5E)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one	3796-70-1	0.505	0.505	0.492		0.843	0.843	0.787	0.730	0.730
2,6-ditert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one	10396-80-2	0.958	1.085			0.577	0.566	0.566	0.554	
4,4,7a-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one	17092-92-1	1.183	1.439	1.192		1.232	1.321	1.197	1.166	1.076
5-pentyloxolan-2-one	104-61-0					3.012	2.160	2.281	1.878	2.163
Ester		11.239	13.677	9.144	3.715	17.062	18.039	17.141	18.753	17.787
(3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	77-68-9	4.511	5.969	3.403	3.715	4.378	5.510	5.354	5.697	8.544
[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	6846-50-0	3.433	4.338	2.927		5.585	5.271	4.513	3.978	2.998
2,3-diacetyloxypropyl acetate	102-76-1					0.549	0.608	0.612	0.644	0.621
2-phenylethyl acetate	103-45-7	1.671	1.671	1.112		1.305	1.624	1.542	1.807	1.468
3-methylbutyl dodecanoate	6309-51-9	0.769	0.769	0.671						
diethyl benzene-1,2-dicarboxylate	84-66-2					0.668	0.668	0.761	0.853	0.853
hexyl 2,2-dimethylpropanoate	5434-57-1					2.138	2.370	2.370	2.602	
methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	1000222-86-6	0.856	0.931	1.031		1.979	1.493	1.493	2.640	3.304
tert-butyl 3-hydroxybutanoate	90435-23-7					0.460	0.497	0.497	0.533	
Stéroïde							1.477	2.965	2.965	2.538
2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane	111-01-3						1.477	1.220	1.220	0.962
Phenol		1.510	1.822	1.014	0.000	2.415	2.309	2.266	2.208	2.553
2,4-ditert-butylphenol	96-76-4	1.510	1.822	1.014		1.280	1.346	1.268	1.308	1.500
4-ethyl-2-methoxyphenol	2785-89-9					1.135	0.963	0.999	0.900	1.054
Pyrazine						2.595	2.595	2.551	2.506	2.506
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	18138-05-1					0.376	0.376	0.479	0.581	0.581
Terpène		4.907	12.185	14.201	19.389	14.097	9.516	3.535	3.389	2.739
(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane-2,6,10,14,18,22-hexaene	111-02-4	4.907	12.185	14.201	19.389	14.097	9.516	3.535	3.389	2.739



**Figure 42.** Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#3.1 : 50g/L en kasha) au cours de la fermentation



**Figure 43.** Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#3.2 : 10 g/L en kasha) au cours de la fermentation

Dans le plan 1:2, la dimension 1 (représentée en rouge dans la Figure 44) oppose le groupe d'échantillons #3.2 J7 à J25 (à droite du graphe, caractérisés par une coordonnée fortement positive sur l'axe) au groupe d'échantillons #3.1 J1 à J7 (à gauche du graphe, coordonnée fortement négative sur l'axe). L'analyse traduit d'une part la similitude des composés retrouvés dans les boissons (et/ou de proportions en composés) pour une concentration fixée en début/fin de fermentation (s'étalant de J1 à J7 pour #3.1 / de J7 à J25 pour #3.2) et d'autre part la différence de composés (et/ou de proportions en composés) en fonction de la concentration en sarrasin dans les boissons.

En effet, le cluster #3.2 J7 à J25 présente de fortes teneurs en 2-ethylhexanoic acid, 5-pentyloxolan-2-one, 2-phenylethanol, 1,3-benzothiazole, 2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol, nonan-1-ol, 2-ethylhexan-1-ol, tert-butyl-3-hydroxybutanoate, Nonanoic.acid et hexyl-2,2-dimethylpropanoate (de la plus extrême à la moins extrême (Figure 45)) et de faibles valeurs pour les variables 4,4,7a-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one, Acide acétique, 3-methylbutyl dodecanoate et hexadecanoic.acid (de la plus extrême à la moins extrême).

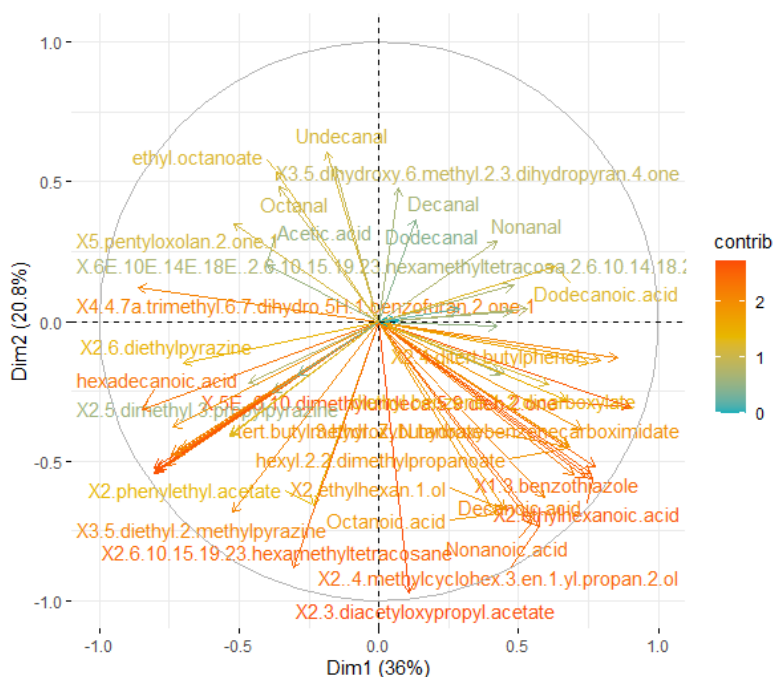
Le bouquet aromatique de ce cluster traduisant des arômes présents en fin de fermentation sont principalement dus aux acides carboxyliques, esters et alcools. Les 3 familles principales ont respectivement des arômes sûrs/aigres/cireux, fruités, amers<sup>89</sup>. Les molécules suivantes participent à l'arôme du produit : 2-ethylhexanoic acid (aigre, sûr), 5-pentyloxolan-2-one (crémeux, noix de coco), 2-phenylethanol (floral), 1,3-benzothiazole (sulfureux, caoutchouteux, grillé), 2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol (floral), nonan-1-ol (notes vertes et fruitées de melon), tert-butyl-3-hydroxybutanoate (doux, fruité, vert)<sup>44,107</sup> ... Il est à noter la plupart des alcools cités sont des métabolites de levures du genre *Saccharomyces* principalement<sup>1,45,47</sup>. Ceux-ci participent à l'arôme de la boisson mais également à la formation d'acides organiques (oxydation en acides carboxyliques) par voie métabolique<sup>1</sup>. En outre, un alcool peut également réagir avec un acide carboxylique pour donner un ester. Certains acides carboxyliques sont également des molécules naturelles provenant du sobacha<sup>32</sup>.

Le cluster d'échantillons #3.1 J1 à J7 présente plutôt de fortes valeurs pour des variables telles que 5-heptyloxolan-2-one, 1,3-di(octanoyloxy)propan-2-yl decanoate, octyl octadecanoate, 2,3-di(octanoyloxy)propyl octanoate, 2-methyl-6-(3-methylbutyl)pyrazine, 2-Isobutyl-3-methylpyrazine, 3-methylbutyl dodecanoate, 3-ethyl-1H-quinoxalin-2-one et (2-decanoyloxy-3-octanoyloxypropyl) decanoate (de la plus extrême à la moins extrême) contre de faibles valeurs pour les variables (3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl)-2-methylpropanoate, 4,4,7a-trimethyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one, (5E)-6,10-dimethylundeca-5,9-dien-2-one, Dodecanoic acid, diethyl benzene-1,2-dicarboxylate et 2,4-ditert butylphenol (de la plus extrême à la moins extrême).

Ce groupe d'échantillons représentant plutôt le début de fermentation est majoritairement composé de cétones, esters et pyrazines : responsables respectivement des notes beurre/caramel, fruité et torréfié/grillé<sup>89</sup>. Ainsi, les arômes présents en début de fermentation sont plus légers et doux que ceux du cluster opposé considérant la fin de fermentation. Les alcools et aldéhydes, substrats à la formation







**Figure 45.** Représentation graphique des variables COV (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L en kasha) dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan)

Finalement, la dimension 3 (en jaune dans la Figure 44) oppose le groupe des individus #3.2 J1 à J6 (coordonnée positive de l'axe) au groupe des individus #3.1 J9 à J25 (coordonnée négative). Cette dimension permet ainsi de mettre en évidence 2 clusters n'en composant qu'un dans la dimension précédente.

Le groupe des individus #3.2 J1 à J6 partage de fortes valeurs pour les variables Dodecanal, Undecanal, 2,6-ditert-butyl-4-hydroxy-4-methylcyclohexa-2,5-dien-1-one, Acetic acid, Decanal, 2,4-ditert-butylphenol, 3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol, Nonanal, 2-methyl-6-(3-methylbutyl) pyrazine, octan-2-yl hexadecanoate, 3-methylbutyl dodecanoate, 2,3-di(octanoyloxy)propyl octanoate, octyl octadecanoate, 1,3-di(octanoyloxy)propan-2-yl decanoate, 5-heptyloxolan-2-one, 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane, hexadecanoic acid et 2-Isobutyl-3-methylpyrazine (de la plus extrême à la moins extrême) et de faibles valeurs pour les variables Octanal et 4-ethyl-2-methoxyphenol.

La majorité des COV retrouvés dans cette section sont des acides carboxyliques, aldéhydes, alcools, esters et pyrazines. Comme mentionné précédemment, les aldéhydes et alcools sont les substrats permettant la synthèse d'acides organiques et d'esters en début de fermentation par les microorganismes<sup>21</sup>. Il est à noter que des proportions non négligeables de pyrazines sont perçues, corrélés à une concentration inférieure en sobacha. Les arômes grillé, torréfié et noisette de ces volatils sont ainsi davantage présents (que #3.1). Les volatils contribuant principalement aux arômes de ces échantillons sont : dodecanal (savonneux), undecanal (cireux, citron), acetic acid (aigre, sûr, vinaigre), nonanal (gras, citron, notes vertes), linalool (citron, fruité)<sup>89</sup>.

Le groupe auquel les individus #3.1 J9 à J25 appartiennent (coordonnée négative sur l'axe) partage de fortes valeurs pour les variables Octanal, ethyl octanoate, 4-ethyl-2-methoxyphenol, 3,5-dihydroxy-6-methyl-2,3-dihydropyran-4-one et 5-pentylloxolan-2-one (de la plus extrême à la moins extrême) et de faibles valeurs pour les variables Tétradecanoic acid, Pentadecanoic acid, (6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane-2,6,10,14,18,22-hexaene, 3-methylbutyl-dodecanoate, (Z)-hexadec-9-enoic acid, Dodecanoic acid, Acetic acid et (Z)-octadec-9-enoic acid (de la plus extrême à la moins extrême).



Ce dernier groupe explicité par la dimension 2 caractérise une fin de fermentation d'un substrat plus concentré en sarrasin. Les COV présents en majorité sont les esters, cétones et phénols. Les volatils participant à l'arôme des échantillons sont : octanal (notes vertes, fruitées, orange/citron), ethyl octanoate (gras), 4-ethyl-2-methoxyphenol (épice, boisé), 5-pentyloxolan-2-one (crèmeux, noix de coco)<sup>21,107</sup>.

c. Analyse des cinétiques de développement des COV au cours des fermentations successives

Les COV identifiés au cours des fermentations successives et ce pour les deux concentrations en sarrasin sont classés par famille dans les Tables 5 et 6 (pour les échantillons #2.1 et #2.2 respectivement). L'évolution de la proportion de chaque famille de molécules dans les échantillons est également représentée graphiquement dans les Figures 46 et 47.

Ainsi, les COV en proportions majoritaires au fil des séries font partie des familles des acides carboxyliques ainsi que des aldéhydes. La cinétique de développement des acides carboxyliques totaux augmente de 16,59 à 22,13% pour #2.1 et de 37,60 à 12,92% pour #2.2. Ces COV présentent plusieurs tendances : ils sont inhibés en cours de fermentation, apparaissent en cours de fermentation ou sont présents et fluctuent au cours des séries. Pour l'échantillon #2.1 par exemple, l'acide acétique est en augmentation constante (de 1,13 à 7%) tandis qu'en #2.2 il n'apparaît qu'en série 5 (10,23 à 4,44% en série 6).

Celle des aldéhydes totaux augmente de 9,40 à 17,13% pour #2.1 et diminue de 5,62 à 0% pour #2.2. En effet, les aldéhydes (et les alcools) sont utilisés par les microorganismes de la fermentation pour synthétiser des acides et esters volatils aromatiques acidifiant le milieu<sup>21</sup>. Les esters sont une famille diversifiée présentant 18 COV (#2.1) contre 11 COV pour #2.2 : leur apparition est majoritairement caractérisée de sporadique au cours des séries (excepté pour l'ethyl octanoate (#2.1) et le (3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate (#2.2) fluctuant au cours des séries). L'ethyl octanoate présente des arômes cireux et de notes vertes<sup>106</sup>.

Les familles des alcools, cétones et phénols sont davantage diversifiées en rapport à la matrice (#1) et les COV considérés apparaissent de manière sporadique : les alcools plutôt en début de fermentations et les cétones vers la fin des séries. En effet, les alcools sont synthétisés par les levures d'une part puis deviennent les substrats à la synthèse d'autres molécules aromatiques par les bactéries d'autre part<sup>39</sup>.

Les molécules des terpènes et des pyrazines exposent deux tendances au cours des fermentations : les certaines présentes dans la matrice de départ (#1) sont inhibées et d'autres toujours présentes mais en faibles proportions.

La fermentation induit l'apparition de nouvelles familles telles que les éthers (tétradecane) et les hydrazines (éthylhydrazine) : composés (profil différent selon #2.1 ou #2.2) présents de manière sporadique et en faible proportion dans les échantillons #2. Ces familles de molécules sont des métabolites synthétisés par le microbiome sur base de substrats organiques présents dans le milieu<sup>39</sup>.

La Figure 48 résume graphiquement les différences et les similitudes entre les échantillons #2.1 et #2.2, toute série confondue. Ainsi, 39,1% des COV sont retrouvés dans le milieu fermentaire, indépendamment de la concentration en sarrasin. Il est à noter que ces molécules semblables ne présentent pas la même cinétique de développement ni la même proportion dans l'échantillon considéré et cela en fonction de la concentration en sarrasin et donc de la disponibilité en nutriments dans le milieu fermentaire. Les échantillons #2.1 et #2.2 présentent 32,2 et 28,7% de molécules spécifiques à chaque milieu et dès lors à la concentration en sarrasin.

La série 5 Thé visant à inoculer le milieu fermentaire obtenu en série 5 dans du thé, démontre des teneurs supérieures totales en acides carboxyliques (30,50%) et en terpènes (11,94%) pour #2.1. Concernant les familles des alcools, aldéhydes, esters et phénols, les tendances retrouvées sont majoritairement des apparitions de nouveaux COV (majoritairement dues aux molécules du thé) mais également des variations en proportion de COV existants. En effet, les molécules synthétisées dépendent de voies métaboliques adaptées aux nutriments présents dans le thé (composés azotés principalement), divergeant des sucres complexes et de l'amidon présents dans la matrice sobacha. La Figure 49 reprend la comparaison de la série 5 Thé pour les échantillons #2. Il en ressort que 36% des COV sont communs aux échantillons, et que 32% des COV proviennent de la variabilité spécifique de chaque échantillon.

Les 9 composés communs étant également présents dans les autres séries, l'apparition des nouveaux COV est propre à chaque échantillon.

**Tableau 5.** Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #2.1 (50g/L en kasha)

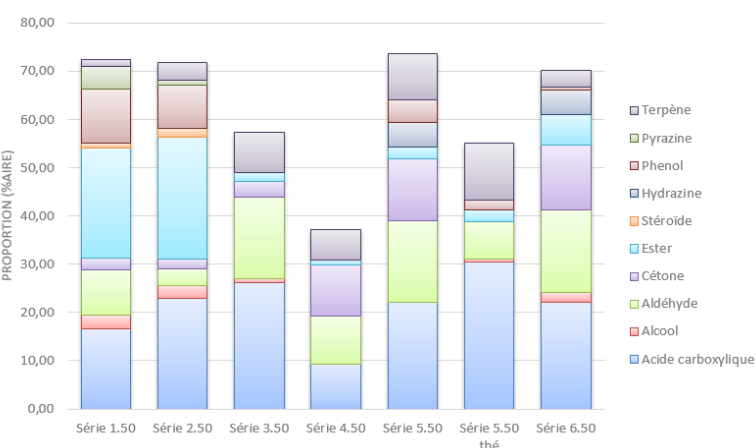
Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#2.1 Série 1	#2.1 Série 2	#2.1 Série 3	#2.1 Série 4	#2.1 Série 5	#2.1 Série 5 Thé	#2.1 Série 6
<b>Acide carboxylique</b>		16,599	22,965	26,113	9,347	22,179	30,505	22,134
(Z)-heptadec-10-énoic acid	29743-97-3						0,739	
(Z)-hexadec-9-énoic acid	373-49-9			2,751	0,82		2,885	
(Z)-octadec-11-énoic acid	506-17-2						2,778	
(Z)-octadec-9-énoic acid	112-80-1			1,112				
<b>Acide acétique</b>	64-19-7	1,314	1,554	4,555	6,12	3,803	1,503	7,009
Decanoic acid	334-48-5			0,932		5,913	2,185	8,541
Dodecanoic acid	143-07-7		1,621	0,957				5,149
hexadecanoic acid	57-10-3	1,708	5,865	8,004	2,407	2,058	11,688	1,435
Nonanoic acid	112-05-0	2,336	7,311	0,971		7,549		
Octadecanoic acid	57-11-4			1,136			2,275	
Octanoic acid	124-07-2	11,241	2,129			2,856		
Pentadecanoic acid	1002-84-2		1,218	2,085			2,876	
Tetradecanoic acid	544-63-8		3,267	3,61			3,576	
<b>Alcool</b>		2,798	2,543	0,947			0,66	1,911
(2E)-3,7-diméthyl-octa-2,6-dien-1-ol	106-24-1	0,792						
(2E,6E)-3,7,11-triméthyl-dodéca-2,6,10-trien-1-ol	29548-30-9		0,404	0,947				1,185
(6E)-3,7,11-triméthyl-dodéca-1,6,10-trien-3-ol	40716-66-3		0,483					
2-éthylhexan-1-ol	104-76-7	0,882	0,763					
3,7-diméthyl-octa-1,6-dien-3-ol	78-70-6	1,124					0,66	
hexadécan-1-ol	36653-82-4		0,474					
non-2-en-1-ol	22104-79-6							0,726
nonan-1-ol	143-08-8		0,419					
<b>Aldéhyde</b>		9,408	3,583	16,83	9,862	16,932	7,629	17,135
5-(hydroxyméthyl)furan-2-carbaldéhyde	67-47-0			16,83	9,862	2,075	7,629	11,112
Decanal	112-31-2	3,469	3,079			1,887		3,567
Dodecanal	112-54-9					0,559		0,636
Nonanal	124-19-6	2,063				11,185		1,174
Octanal	124-13-0	3,876				0,565		
Undécanal	112-44-7		0,504			0,661		0,646
<b>Cétone</b>		2,533	2,064	3,26	10,606	12,647		13,557
(5E)-6,10-diméthylundéca-5,9-dien-2-one	3796-70-1							1,218
1-hydroxypropan-2-one	116-09-6				1,183	1,987		0,786
2,4-dihydroxy-2,5-diméthylfuran-3-one	10230-62-3				0,881			
2,6-ditert-butyl-4-hydroxy-4-méthylcyclohexa-2,5-dien-1-one	10396-80-2	0,772	0,958					
3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydropyran-4-one	28564-83-2		0,723	3,26	3,143	5,131		8,232
3H-pyran-2,6-dione	5926-95-4				2,207	0,875		0,733
4-hydroxy-2,5-diméthylfuran-3-one	3658-77-3					2,257		

5-pentyloxolan-2-one	104-61-0	1,761						
cyclopentane-1,2-dione	3008-40-0		0,383		3,192	2,397		2,588
Ester		22,826	25,166	1,833	1,043	2,638	2,565	6,214
(3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	77-68-9	8,896	5,902					
(5-formylfuran-2-yl)methyl acetate	10551-58-3				1,043			
[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	6846-50-0	1,519	1,625					
1,3-di(octanoyloxy)propan-2-yl decanoate	33368-87-5	0,566	1,52					
2,3-di(octanoyloxy)propyl octanoate	538-23-8		0,979					
2-methylbutyl dodecanoate	93815-53-3		0,512					
2-phenylethyl acetate	103-45-7	1,062						
3-methylbutyl dodecanoate	6309-51-9	1,379	2,441			1,365		2,504
bis(2-ethylhexyl) benzene-1,2-dicarboxylate	117-81-7		0,486				0,696	
bis(2-ethylhexyl) benzene-1,3-dicarboxylate	6422-86-2						0,977	
bis(2-ethylhexyl) benzene-1,4-dicarboxylate	103-23-1		2,782					
bis(2-methylpropyl) benzene-1,2-dicarboxylate	84-69-5							0,96
ethyl decanoate	110-38-3		0,546					0,673
ethyl octanoate	106-32-1	1,01	2,859	1,833		1,273	0,892	2,077
heptyl formate	112-23-2		2,944					
methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	1000222-86-6	8,394	0,9					
octan-2-yl hexadecanoate	55194-81-5		0,864					
octyl octadecanoate	109-36-4		0,806					
Stéroïde		1,005	1,783					
2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane	111-01-3	1,005	1,783					
Hydrazine						5,063		5,22
methylhydrazine	60-34-4					5,063		5,22
Phenol		11,22	9,069			4,533	1,845	0,599
2,4-ditert-butylphenol	96-76-4		0,569					0,599
2-methoxy-4-propylphenol	2785-87-7	5,878	2,642			0,797		
4-ethyl-2-methoxyphenol	2785-89-9	5,342	5,858			3,736	1,845	
Pyrazine		4,643	0,879					
2,6-diethylpyrazine	13067-27-1	1,332						
2-ethylpyrazine	13925-00-3	1,136						
2-methyl-6-(3-methylbutyl)pyrazine	91010-41-2	1,515	0,879					
3,5-diethyl-2-methylpyrazine	18138-05-1	0,66						
Terpène		1,356	3,693	8,34	6,385	9,562	11,939	3,356
(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane-2,6,10,14,18,22-hexaene	111-02-4	1,356	3,693	5,215	4,127	2,613	8,765	0,961
7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene	123-35-3			3,125	2,258	6,949	3,174	2,395

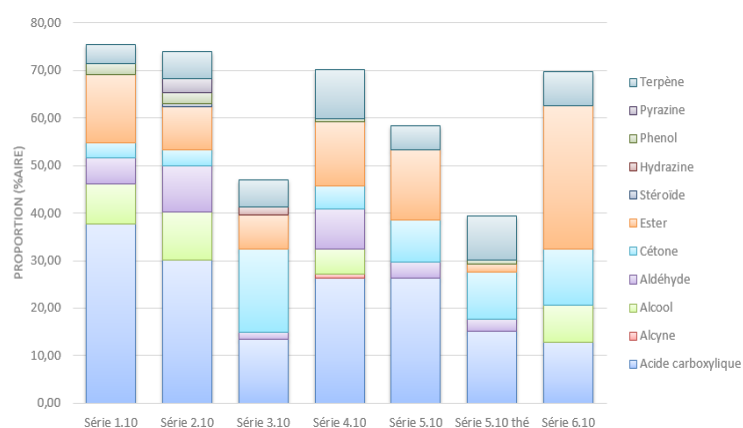
**Tableau 6.** Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #2.2 (10g/L en kasha)

Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#2.2 Série 1	#2.2 Série 2	#2.2 Série 3	#2.2 Série 4	#2.2 Série 5	#2.2 Série 5 Thé	#2.2 Série 6
Acide carboxylique		37,608	30,136	13,477	26,399	26,327	15,144	12,922
(Z)-hexadec-9-enoic acid	373-49-9	2,812	1,886	0,877	2,659	1,134	0,741	
(Z)-octadec-9-enoic acid	112-80-1	1,139	0,751		1,366			
1,3,4-trihydroxy-5-oxocyclohexane-1-carboxylic acid	10534-44-8			4,542				
2-ethylhexanoic acid	149-57-5		0,582					
3-methylhexanoic acid	3780-58-3				4,85			
Acide acétique	64-19-7					10,236	2,301	4,441
Decanoic acid	334-48-5			4,933	2,072		7,922	8,481
Dodecanoic acid	143-07-7						0,785	
hexadecanoic acid	57-10-3	13,222	6,9	2,35	7,349	8,42	2,641	
Hexanoic acid	142-62-1		0,723					
Nonanoic acid	112-05-0	6,913	4,172			0,92		
Octadecanoic acid	57-11-4	0,757			0,909			
Octanoic acid	124-07-2	6,284	11,567		4,162	1,014		
Pentadecanoic acid	1002-84-2	2,533	1,386		1,27	1,675		
Tetradecanoic acid	544-63-8	3,948	2,169	0,775	1,762	2,928	0,754	
Alcyne					0,848			
(4S)-1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	5989-54-8				0,848			
Alcool		8,485	10,193		5,199			7,645
(6E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,6,10-trien-3-ol	7212-44-4	0,787						
2-ethylhexan-1-ol	104-76-7	1,15						
2-nitroethanol	625-48-9				4,028			7,645
2-phenylethanol	60-12-8		3,883					
3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	78-70-6	1,097						
4-ethyloct-1-yn-3-ol	5877-42-9		1,014					
heptan-1-ol	111-70-6	5,451	5,296		1,171			
Aldéhyde		5,617	9,698	1,431	8,333	3,444	2,608	
5-(hydroxyméthyl)furan-2-carbaldehyde	67-47-0			1,431	6,955		2,608	
Decanal	112-31-2	3,233	4,819		0,712	0,811		
Dodecanal	112-54-9					0,608		
Nonanal	124-19-6	1,594	2,329		0,666	0,653		
Octanal	124-13-0	0,79	2,55					
Tetradecanal	124-25-4					0,589		
Tridecanal	10486-19-8					0,783		
Cétone		3,054	3,298	17,503	4,901	8,866	9,835	11,892
1-hydroxypropan-2-one	116-09-6					0,759		
1-phenylethanone	98-86-2		3,298					
2,4-dihydroxy-2,5-diméthylfuran-3-one	10230-62-3					0,636	0,774	
2H-furan-5-one	497-23-4						0,665	
3,5-dihydroxy-6-méthyl-2,3-dihydropyran-4-one	28564-83-2			11,99	4,901	3,597	4,97	11,892
4,4,7a-triméthyl-6,7-dihydro-5H-1-benzofuran-2-one	17092-92-1	0,817					0,798	
4-hydroxy-2,5-diméthylfuran-3-one	3658-77-3			5,513		0,921		
5-dodecyloxolan-2-one	730-46-1					0,735		
5-pentyloxolan-2-one	104-61-0	0,838						
6-méthylhept-5-en-2-one	110-93-0	0,693						
6-nonyloxan-2-one	2721-22-4					1,123		

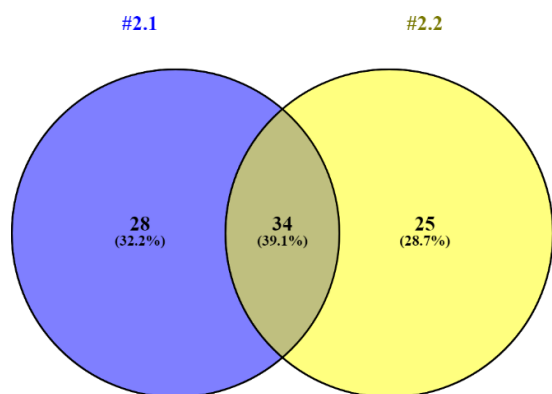
cyclopentane-1,2-dione	3008-40-0	0,706				1,095	2,628	
Ester		14,241	8,966	7,197	13,529	14,615	1,585	30,032
(3-hydroxy-2,2,4-trimethylpentyl) 2-methylpropanoate	77-68-9	10,192	5,709		0,814	1,606		
(5-formylfuran-2-yl)methyl acetate	10551-58-3			0,839			0,929	
[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	6846-50-0	2,206	1,661	0,82				
1-O-butyl 5-O-(2-methylpentyl) pentanedioate	137990-71-7					0,622		
2-phenylethyl acetate	103-45-7			4,738	11,971	11,721		
2-phenylethyl cyclopentanecarboxylate	1271488-66-4							30,032
ethyl octanoate	106-32-1		0,941				0,656	
methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	1000222-86-6	1,119				0,666		
methyl hexanoate	106-70-7			0,8	0,744			
octyl octanoate	2306-88-9	0,724						
tris(2-ethylhexyl) benzene-1,2,4-tricarboxylate	3319-31-1		0,655					
Ether			0,757					
Tetradecane	629-59-4		0,757					
Hydrazine				1,686				
ethylhydrazine	624-80-6			1,686				
Phenol		2,424	2,341		0,639		0,911	
2,4-ditert-butylphenol	96-76-4				0,639		0,911	
4-ethyl-2-methoxyphenol	2785-89-9	2,424	2,341					
Pyrazine			2,955					
2-ethyl-5-methylpyrazine	13360-64-0		1,247					
3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine	13360-65-1		1,708					
Terpène		4,061	5,568	5,667	10,367	5,201	9,354	7,17
(6E,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaène	111-02-4	4,061	5,568	3,136	6,875	1,295	4,689	
7-methyl-3-methylideneocta-1,6-diene	123-35-3			2,531	3,492	3,906	4,665	7,17



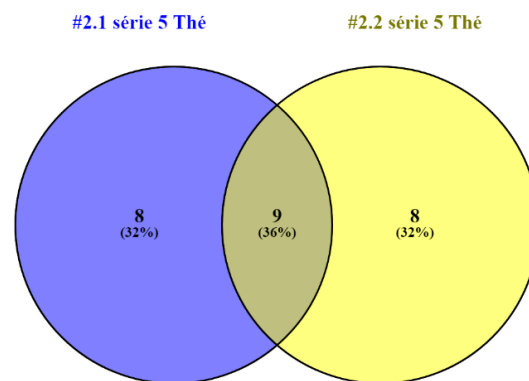
**Figure 46.** Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#2.1 : 50g/L en kasha) au cours des fermentations successives (série)



**Figure 47.** Représentation graphique de la proportion (%aire) des familles de COV (#2.2 : 10g/L en kasha) au cours des fermentations successives (série)



**Figure 48.** Comparaison qualitative<sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons de l'expérience #2 (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha)

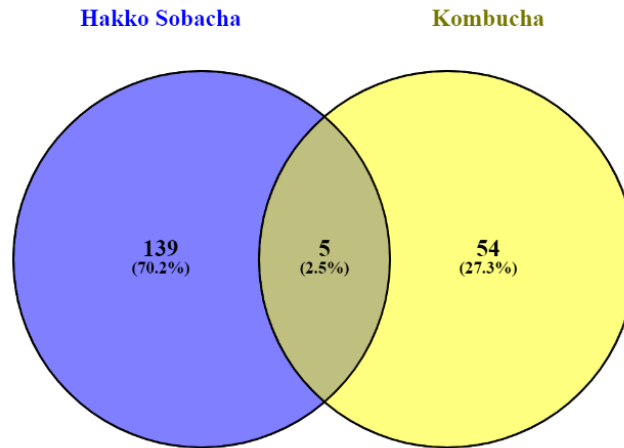


**Figure 49.** Comparaison qualitative<sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons #2 (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha) de la série 5 Thé

d. Comparaison qualitative des COV contenus dans la boisson à ceux composant le kombucha de référence

L'hakko sobacha étant une boisson inspirée du kombucha où le thé est remplacé par du sobacha, une comparaison des profils en COV des deux boissons est effectuée en établissant la liste des volatils détectés dans chacune des boissons. Toutes les modalités de concentration en sarrasin et de jour de fermentation de l'expérience #3 (visant à fermenter la matrice céréalière avec un SCOBY et jus de repiquage d'un kombucha de référence) sont reprises dans l'établissement de la liste de COV provenant de l'hakko sobacha. La liste des COV repris pour l'échantillon de kombucha provient de l'étude de Zhao et al (2018) considérant également les COV synthétisés tout au long de la fermentation. Il est à noter que la comparaison est qualitative et approximative puisqu'elle reprend deux études n'ayant pas été effectuées sur base des mêmes conditions et modalités d'expérience.

La Figure 50 illustre la comparaison des COV de chaque boisson (70,2% pour l'hakko sobacha et 27,3% pour le kombucha) et permet de souligner qu'une faible proportion de volatils sont communs aux deux boissons (2,5%). En outre, le jus de repiquage ajouté étant en majeure partie de composition fixe, les COV communs aux deux matrices sont sans doute plus nombreux mais présents en proportion inférieure aux limites fixées par l'étude. Les composés communs sont les suivants : 2-(4-méthylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol (Terpineol) ; 3,7-diméthyl-octa-1,6-dien-3-ol (Linalool) ; acetic acid ; furan-2-carbaldehyde (Furfural) et Nonanal. Ces COV présentent respectivement des arômes agrumes/floral ; boisé/lavande ; sûr/vinaigre ; épicé ; floral<sup>44,108</sup>. Ils mettent en lumière le bouquet aromatique commun aux deux boissons (OAV > 10)<sup>100,109</sup>, intimement lié aux microbiome commun. Cette comparaison permet également d'illustrer d'une part, que des même microorganismes sont capables de fermenter des matrices différentes et d'autre part, d'emprunter des voies fermentaires différentes afin de produire des molécules aromatiques différentes<sup>49,52</sup>.



**Figure 50.** Comparaison qualitative<sup>95</sup> des COV contenus dans les échantillons d'hakko sobacha (#3) (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L en kasha) et de kombucha<sup>21</sup>

A titre de perspective, une étude statistique basée sur la comparaison entre COV de l'hakko sobacha et ceux d'un kombucha de référence élaboré dans les mêmes conditions (température, concentrations en matrice et en sucre initiales, durée de fermentation, SCOBY, ...) permettrait une analyse plus fine et systématique.

### 5. Analyses des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires

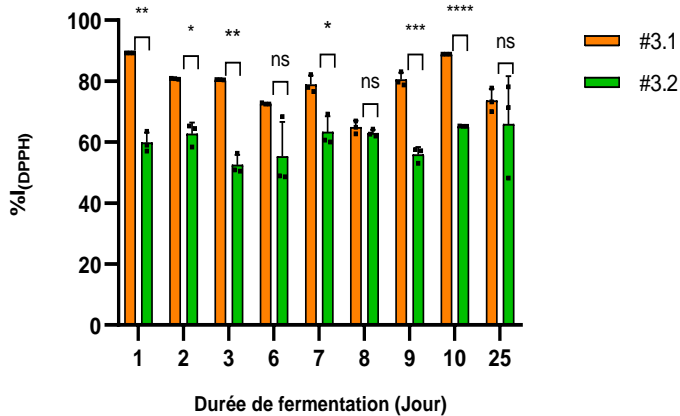
Afin d'évaluer les propriétés bénéfiques pour la santé du hakko sobacha, l'analyse des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires sont présentées au travers des Figures 51 à 56. Les données brutes sont reprises dans l'annexe 8.

Comme explicité précédemment (cf. Matériel & méthode. IV.5), le test d'inhibition du radical DPPH mesure l'activité anti-oxydante de composés capables de transférer des atomes d'hydrogène et donc de réduire le radical vers une forme stable changeant de coloration lorsque mesurée à 517nm.

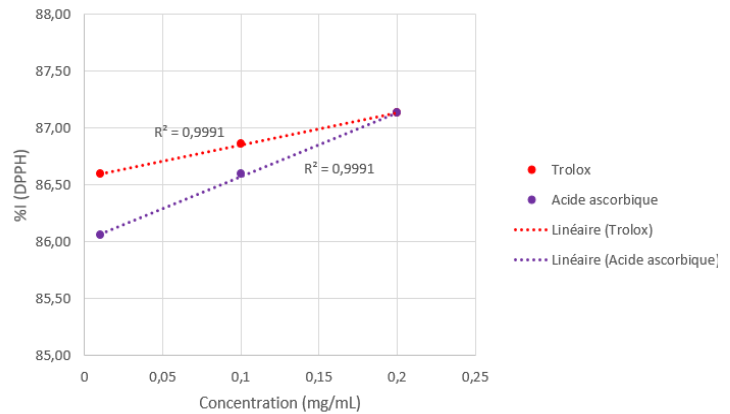
Les valeurs du pouvoir antioxydant mesurées au cours de la cinétique de fermentation sont significativement différentes en fonction de la concentration en sarrasin ( $P > 0,05$ ), excepté pour les jours 6, 7 et 25 où le pourcentage d'inhibition du radical DPPH est non significativement différent entre les échantillons des expériences #3.1 et #3.2 (Figure 51). L'activité anti-oxydante est élevée en début de fermentation (89,3% pour l'expérience #3.1 contre 59,85% pour #3.2) et fluctue légèrement au cours de la fermentation, présentant toujours des valeurs plus importantes pour l'échantillon ayant la teneur la plus élevée en sarrasin (#3.1). Ainsi, les pouvoirs antioxydants se situent à des valeurs de l'ordre de 70-80% et 60-70% pendant la fermentation, pour les échantillons #3.1 et #3.2 respectivement. Il est à noter que le pouvoir antioxydant des échantillons de sobacha (correspondant à J0 de fermentation) s'élèvent à 51,33% et 77,01% pour les expériences #1.1 et #1.2 respectivement. Comme souligné dans la littérature, cette matrice présente des activités anti-oxydantes importantes liées aux flavonoïdes du sarrasin relâchés dans l'infusion par hydrolyse de ces composés<sup>61,72,74,110</sup>. À titre comparatif, le pouvoir antioxydant du kombucha s'élève à 60%<sup>25</sup> et celui du thé vert à 75%<sup>52</sup>. La matrice contient dès lors une charge de départ en molécules anti-oxydantes<sup>77,111</sup> qui va évoluer en fonction des activités métaboliques des microorganismes au cours de la fermentation ; en induisant le développement voire l'inhibition de celles-ci au détriment d'autres molécules nécessaires au développement du microbiote de la boisson (acides organiques principalement). En outre, la quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes pendant la fermentation est augmentée : résultat d'une réaction d'hydrolyse microbienne<sup>112</sup>. Lorsque la matrice est végétale, la fermentation permet la dégradation de la structure des parois cellulaires, entraînant la libération ou la synthèse de divers composés antioxydants. À titre d'exemple, la biosynthèse de molécules anti-oxydantes naturelles, telles que la vitamine C est induite par la fermentation<sup>39</sup>. La concentration en acide ascorbique (et en Trolox, son précurseur) dans les échantillons



est non négligeable, se traduisant par des taux d'inhibition du DPPH très proches de ceux des standards positifs (Figure 52). Les activités anti-oxydantes de l'échantillon #3.2 étant inférieures, les concentrations en vitamine C et Trolox sont inférieures également. Les composés antioxydants peuvent ensuite agir dans le milieu fermentaire comme des inhibiteurs de radicaux libres, des chélateurs de métaux, des inhibiteurs d'oxygènes singulets ou encore des donneurs d'hydrogènes aux radicaux<sup>112</sup>.



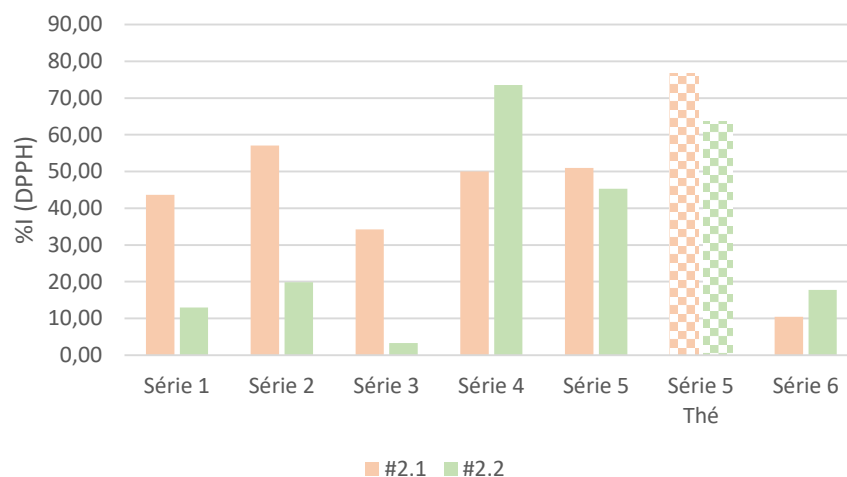
**Figure 51.** Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#3.1 : 50g/L et #3.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n=3 ; T test; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ; \*,  $P < 0.05$  ; ns, non-significatif)



**Figure 52.** Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) de standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL)

Les pouvoirs antioxydants mesurés sur les boissons hakko sobacha obtenus au cours des fermentations successives sont repris dans la Figure 53. Ceux-ci varient non seulement en fonction de la concentration en sarrasin mais également fortement en fonction de chacune des fermentations successives. Comme observé précédemment, les valeurs d'activités anti-oxydantes sont supérieures pour une teneur supérieure en sarrasin (#2.1). Il ressort de cette étude que le pouvoir antioxydant fluctue jusqu'en série 5, avec une activité supérieure pour #2.1. Les activités anti-oxydantes chutent drastiquement en série 6 pour les deux modalités testées. En effet, les pourcentages d'inhibition du radical DPPH baissent de 43,62% à 10,42% pour #2.1. Les valeurs très faibles en début d'expérience pour l'échantillon #2.2 série 1 (13,01%) pourraient provenir d'une erreur de mesure si l'on se réfère au pouvoir antioxydant obtenu dans des conditions similaires lors de l'expérience #3.2 à J25 (65,91%). Cette baisse du pouvoir antioxydant vers des valeurs de l'ordre de 10% en série 6 (10,42 pour l'expérience #2.1 et 17,80% pour l'expérience #2.2) pourraient être un marqueur d'une baisse de l'activité de fermentation au fil des séries, déjà observé précédemment (cf. II. 1 et 2) ; mais également de la synthèse de molécules inhibitrices de l'activité des flavonoïdes. De plus, la variation de nutriments lié à la modification du jus de repiquage pourrait expliquer la réduction de la biosynthèse de composés, les composés antioxydants semblent en faire partie. Il est à noter que la gamme de pH de fermentation du kombucha permet la protection des molécules anti-oxydantes<sup>25</sup>. De plus, le pouvoir antioxydant correspondant à l'inoculation de la série 5 dans du thé étant supérieur (76,56 pour #2.1 et 63,5% pour #2.2), il permet de souligner l'activité supérieure des antioxydants du thé mais aussi l'hypothèse d'un manque de nutriments (composés azotés) dans le milieu fermentaire.

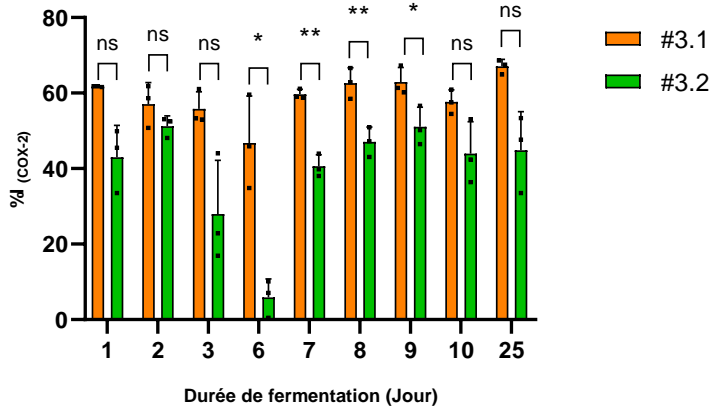




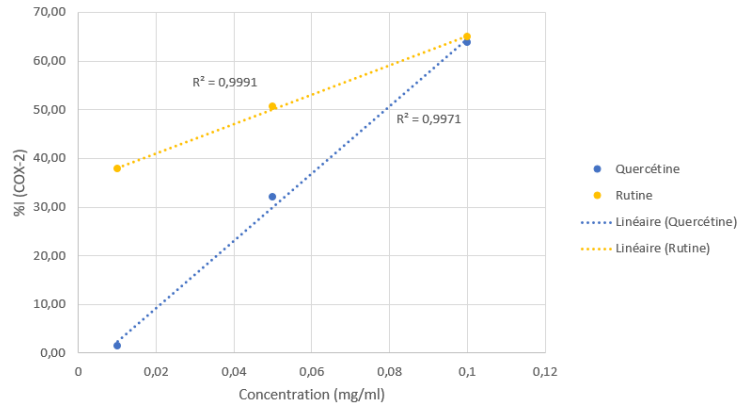
**Figure 53.** Evolution de l'activité anti-oxydante (%I (DPPH)) des échantillons #2 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L en kasha) et de fermentations successives (série)

Un second paramètre étudié faisant état des propriétés bénéfiques pour la santé d'une boisson fonctionnelle est le pouvoir anti-inflammatoire. Celui-ci a été déterminé via la méthode d'inhibition de l'enzyme cyclooxygénase-2 sur les échantillons des expériences #3.1 et #3.2 ainsi que sur les échantillons des fermentations successives (expérience #2). Comme explicité dans l'état de l'art, l'utilisation de cette enzyme permet la certification d'activités anti-inflammatoires pour la santé humaine<sup>81</sup>.

Au cours des cinétiques, il varie de manière significativement différente avec la concentration en sarrasin pour les jours 6 à 9 de fermentation ( $P > 0,05$ ) (Figure 54). Dès lors, en début et en fin de fermentation, il n'existe pas de différence significative du pouvoir anti-inflammatoire des échantillons #3 pour une même durée de fermentation. D'autre part, les pourcentages d'inhibition de la COX-2 s'élèvent à 15,33% et 1,69% pour les infusions de sobacha issus de l'expérience #1 (#1.1 et #1.2 respectivement) qui se focalise sur l'optimisation de l'infusion. Ces deux échantillons sont préparés dans les mêmes conditions que les J0 des expériences #3.1 et #3.2 et peuvent dès lors témoigner de la présence de composés ayant une activité anti-inflammatoire dans l'infusion, proportionnellement à la concentration en sarrasin et ce, avant fermentation. La rutine et la quercétine sont les composés anti-inflammatoires les plus renseignés et étudiés dans la littérature concernant le sarrasin<sup>42,67</sup>. Une augmentation générale de l'activité anti-inflammatoire est observée au cours de la fermentation. Les valeurs sont de l'ordre de 50-60% pour #3.1 et de 40-50% pour #3.2. Une chute du pouvoir anti-inflammatoire (drastique pour #3.2) est néanmoins observée à J6 pour atteindre 46,78% pour #3.1 et 5,88% pour #3.2 : ceci peut être en lien avec les changements d'activité métabolique des microorganismes en cours de fermentation ; les bactéries acétiques produisent des acides à partir de l'éthanol préalablement synthétisé par les levures. La synthèse d'acides organiques au cours de la fermentation pourrait inhiber l'activité de molécules anti-inflammatoires<sup>22</sup>. Cette hypothèse rejoint l'étude de Dufresne et al (2000), démontrant que les catéchines du thé sont inhibées par la fermentation du kombucha<sup>22</sup>. Après J6, l'activité anti-inflammatoire ré-augmente et ce jusqu'en fin de F2 (pour atteindre 67,04% pour l'expérience #3.1 et 44,83% pour l'expérience #3.2). L'évaluation des pouvoirs anti-inflammatoires des molécules standards mentionnées précédemment permet d'approximer la teneur en ces composés dans les échantillons si l'on fait l'hypothèse que ces composés sont largement majoritaires (Figure 55). En outre, la littérature souligne une teneur légèrement supérieure en quercétine dans l'infusion<sup>64</sup>, composé ayant une plus faible activité anti-inflammatoire que celle de la rutine ; cette dernière étant réputée pour son pouvoir anti-inflammatoire élevé à de faibles concentrations<sup>43,76</sup>.

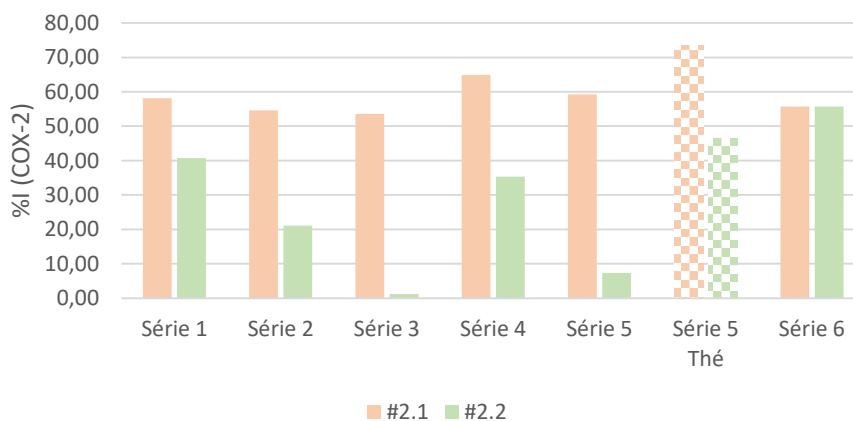


**Figure 54.** Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) des échantillons #3 d'hakko sobacha en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de la durée de fermentation (jour) (moyenne  $\pm$  écart-type ;  $n=3$  ; T test; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  ; \*\*\*,  $P < 0.001$  ; \*\*,  $P < 0.01$  ; \*,  $P < 0.05$  ; ns, non-significatif)



**Figure 55.** Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) de standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL)

L'évolution de l'activité anti-inflammatoire obtenue au fil des séries varie en fonction de la concentration en sarrasin et est corrélée positivement à celle-ci (Figure 56). Ainsi, l'évolution est faible et stagne autour des valeurs de l'ordre de 50-60% pour #2.2. La cinétique correspondant à #2.1 fluctue très fortement de valeurs de l'ordre de 30-40% vers des valeurs de 1,18 et 7,30% pour les séries 3 et 5 respectivement. Ces deux dernières mesures semblent être aberrantes, la cinétique d'évolution de l'échantillon #2.2 devant plutôt se rapprocher de la tendance observée pour #2.1. Il est à noter que les pouvoirs anti-inflammatoires des échantillons inoculés dans du thé sont supérieurs (73,54 pour #2.1 et 46,32% pour #2.2, série 5 Thé). Ceci traduirait le ralentissement des activités liées à la fermentation jusqu'à la réduction du rendement fermentaire (en comparaison au kombucha), potentiellement lié à une phase d'adaptation du microbiome en fonction du substrat disponible. En revanche, le milieu s'acidifiant toujours, l'activité étudiée augmente en série 6 (55%) jusqu'à dépasser (pour #2.2) les valeurs de la série 5 thé (46%), démontrant la capacité des microorganismes à reprendre leur activité métabolique lorsque le substrat est présent<sup>113</sup>.



**Figure 56.** Evolution de l'activité anti-inflammatoire (%I (COX-2)) des échantillons d'hakko sobacha #2 en fonction de la concentration en kasha (#2.1 : 50g/L et #2.2 : 10g/L) et de fermentations successives (série)

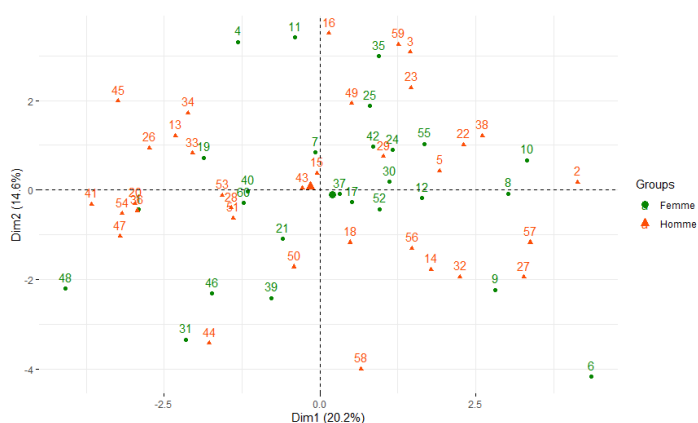
## 6. Analyses sensorielles

### a. Évaluation hédonique et préférences du consommateur

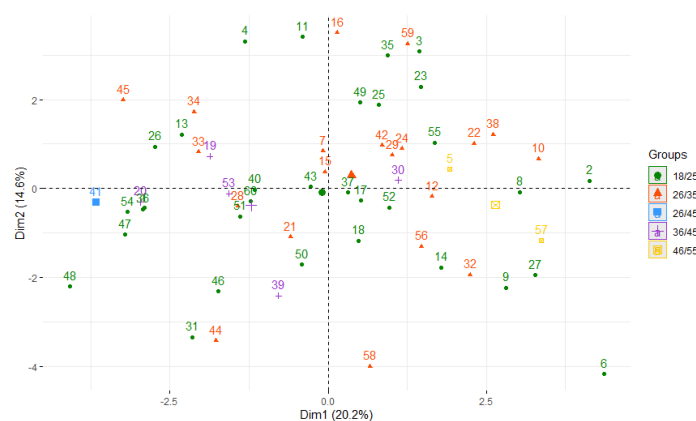
Les résultats de l'évaluation hédonique sont traités à travers l'établissement d'une analyse en composantes principales. L'ACP des données collectées au cours de l'évaluation comprend 60 *échantillons* (correspondant aux juges ayant participé) et 24 *variables* (descripteurs sensoriels caractérisant les boissons testées). Les boissons testées pour cette analyse sont les échantillons issus des expériences #3.1 et #3.2 (cinétiques de fermentation du sobacha à deux concentrations en sarrasin).

Parmi les juges interrogés, 26 sont des femmes et 34 sont des hommes. La distribution des tranches d'âge s'établit comme suit : une majorité des juges (54%) sont étudiants et ont entre 18 et 25 ans ; 35% des membres du personnel (reprenant également les doctorants) ont entre 26 et 35 ans ; 8% ont entre 36 et 45 ans. Les Figures 57 et 58 représentent respectivement la distribution des individus dans le plan 1:2 en considérant le genre et la tranche d'âge des juges. Ainsi, la population échantillonnée au sein de la Faculté est plutôt jeune. De plus, 88% des juges connaissent les boissons fermentées et en consomment plusieurs fois par semaine voir par mois (35%). Le kombucha est la boisson la plus connue et consommée des juges (87%), suivie du kéfir.

Le test triangulaire effectué en début d'analyse et permettant d'identifier l'échantillon différent au sein d'une série de 3 échantillons indique que 78% de la population interrogée est capable de percevoir la différence gustative entre les 2 boissons testées ( $P < 0,05$  ( $\alpha = 0,95$ ) appuyant la différence significative entre les deux boissons selon la loi binomiale).



**Figure 57.** Représentation graphique des échantillons de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 (ACP) classés par couleur en fonction de la variable *Genre*



**Figure 58.** Représentation graphique des échantillons de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 (ACP) classés par couleur en fonction de la variable *Tranche d'âge*

L'étude de la distribution de l'inertie permet de structurer les variables et de fixer le nombre de dimensions à considérer pour l'analyse. Les 2 premiers axes de l'analyse expriment 31,96% de l'inertie totale du jeu de données ; cela signifie que 31,96% de la variabilité totale du nuage des individus (ou des variables) est représentée dans ce plan. Ce taux est significatif puisqu'il est supérieur à 20,21% (référence du quantile 0,95 des distributions normales).

La description de la dimension 1 dans le plan 1:2 (Figure 59) oppose un premier groupe d'individus (ellipse en rouge à droite du graphique et caractérisés par une coordonnée fortement positive sur l'axe) à un autre groupe (ellipse à gauche du graphique, caractérisés par une coordonnée fortement négative sur l'axe). Le 1<sup>er</sup> groupe évalue les caractéristiques de la boisson #3.2 comme étant acide et intense, fraîche, pétillante, au goût agréable et présentant un arôme de noisette torréfiée favorable (caractère du plus prononcé au moins prononcé (Figure 60)) et la boisson #3.1 comme ayant une couleur et une fraîcheur non agréables.

Le groupe opposé (caractérisés par une coordonnée négative sur l'axe) évoque quant à lui une couleur agréable au détriment d'une intensité d'acidité, un goût, un arôme noisette et une pétilliance non agréables pour la boisson #3.1. De plus, la boisson #3.2 n'est pas appréciée pour les caractères suivants : acidité, goût, intensité de l'acidité, arôme de noisette, fraîcheur et pétilliance.

La dimension 2 (ellipses vertes dans la Figure 59) oppose un groupe d'individus (en haut du graphique, caractérisé par une coordonnée fortement positive sur l'axe) à un autre groupe (en bas du graphique, caractérisé par une coordonnée fortement négative sur l'axe). Le 1<sup>er</sup> groupe (coordonnée positive) apprécie l'acidité, l'arôme noisette, l'intensité de l'acidité, le goût ainsi que la fraîcheur de la boisson #3.1. Ils apprécient également le goût, l'acidité et l'arôme noisette de la boisson #3.2.

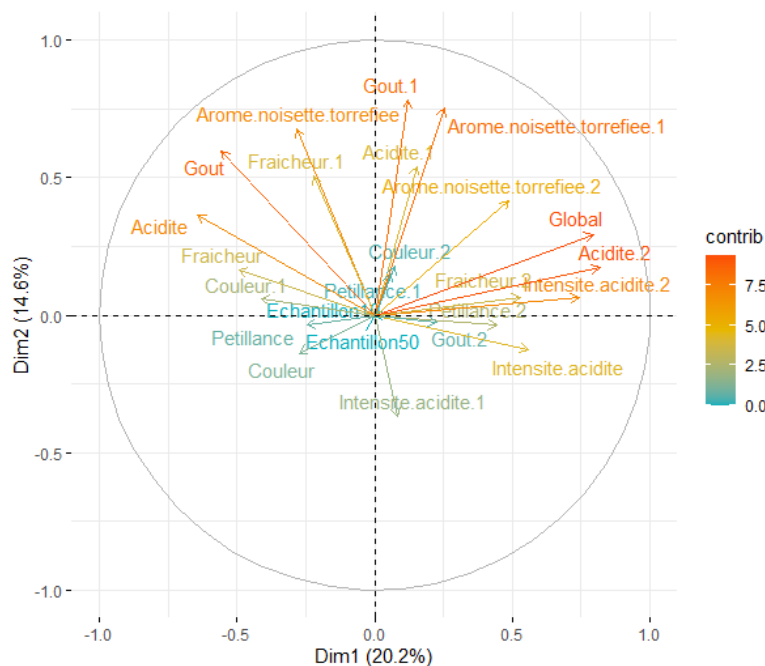
Le groupe opposé (caractérisés par une coordonnée négative sur l'axe) souligne quant à lui une couleur agréable pour la boisson #3.1 mais une acidité et un arôme noisette non satisfaisant. De plus, la boisson #3.2 n'est pas appréciée pour les caractéristiques suivantes : acidité, goût, intensité de l'acidité, arôme noisette, fraîcheur et pétilliance.

La dimension 3 permet de mettre en évidence 2 groupes d'individus partageant les mêmes appréciations. Ainsi, un premier groupe (caractérisé par une coordonnée fortement positive sur l'axe) évoque une couleur d'une part ainsi qu'une couleur et une fraîcheur agréable d'autre part pour les boissons #3.2 et #3.1 respectivement. En revanche, la pétilliance et l'intensité d'acidité ne sont pas appréciées pour la boisson #3.1.

Le groupe opposé dans cette dimension (coordonnée négative sur l'axe) apprécie la pétilliance de la boisson #3.1 mais n'apprécie pas les couleurs des boissons.

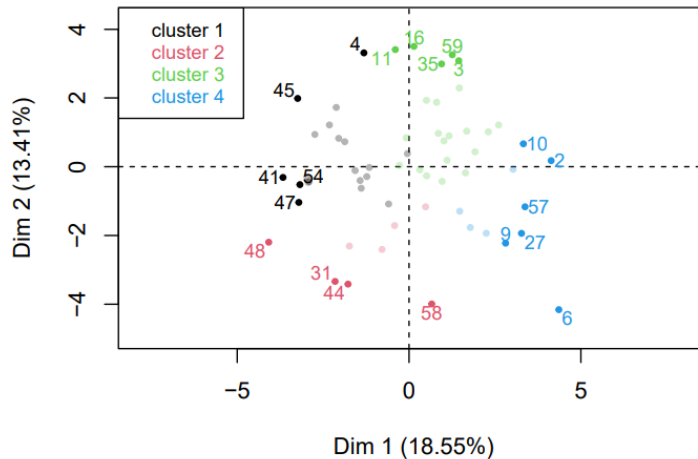


**Figure 59.** Représentation graphique des variables de l'évaluation hédonique et des clusters d'échantillons dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence à la boisson #3.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » la boisson #3.2 (10g/L kasha) ; les ellipses jaunes font référence à celles obtenues dans la dimension 3)



**Figure 60.** Représentation graphique des variables de l'évaluation hédonique dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence à la boisson #3.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » la boisson #3.2 (10g/L kasha))

Enfin, une classification ascendante hiérarchique des individus sous forme de clusters peut être établie dans le plan reprenant les 2 dimensions (Figure 61). Celle-ci permet de regrouper les individus ayant évalués les boissons de façon similaire, présentant ainsi les mêmes degrés d'appréciation des produits. Le cluster 1 n'apprécie globalement pas les 2 boissons goûtées pour leur acidité, goût, pétillance et arôme noisette. Le cluster 4 étant le miroir du précédent apprécie les 2 boissons. Une préférence pour la boisson la plus concentrée en sarrasin (#3.1) est démontrée par l'intensité des variables suivantes : acide et intense, fraîcheur, pétillance, goût et arôme de noisette torréfiée. Les 2 clusters restant sont également opposés 2 à 2 ; où le groupe d'individus du cluster 3 apprécie les 2 boissons pour les caractères acidité, arôme noisette, intensité de l'acidité, goût et fraîcheur de la boisson #3.1 d'une part et goût, acidité et arôme noisette de la boisson #3.2 d'autre part. Les individus du cluster 2 trouvent la couleur agréable pour la boisson #3.1 mais l'acidité et l'arôme noisette non satisfaisants. La boisson #3.2 n'est pas appréciée par le cluster 2 pour les caractéristiques suivantes : acidité, goût, intensité de l'acidité, arôme noisette, fraîcheur et pétillance.



**Figure 61.** Classification hiérarchique des échantillons de l'évaluation hédonique en clusters dans le plan 1:2 (ACP) (*Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan*)

De plus, en fin d'évaluation hédonique, 80% des juges sont prêts à intégrer l'hakko sobacha à leur quotidien en tant que substitut plus naturel aux sodas. Les moments de consommation privilégiés seraient au cours de l'après-midi (67%) et à l'apéritif (52%). La quantité préférée (71%) serait l'équivalent d'un verre à eau (25cl). Les commentaires les plus fréquents des juges sur les boissons sont le caractère agréable (44%), suivi d'une acidité et une odeur importantes (15%) des boissons.

#### b. Profil flash

L'ACP de ce jeu de données comprend 8 *échantillons* (correspondant aux produits à déguster lors du profil flash) et 58 *variables* (descripteurs sensoriels caractérisant les boissons). Pour cette analyse visant à la construction d'un profil sensoriel personnel des produits et à l'identification des différences plus fines entre les produits testés, les échantillons #2 correspondant aux séries de fermentations successives sont proposés.

L'inertie des axes factoriels indique d'une part, si les variables sont structurées et suggère d'autre part le nombre judicieux de composantes principales à étudier. Les 2 premiers axes de l'analyse expriment 70.79% de l'inertie totale de la série de données : la variabilité totale du nuage des individus (ou des variables) est représentée dans ce plan. Cette valeur est nettement supérieure à la valeur référence de 43.67% (quantile 0,95), la variabilité expliquée par ce plan est donc hautement significative.

La dimension 1 exprimée dans le plan 1:2 (Figure 68) oppose le groupe d'individus comprenant les séries 3, 4 et 5 de #2.1 (à droite du graphique, caractérisés par une coordonnée fortement positive sur l'axe) aux séries 3 et 4 de #2.2 (à gauche du graphique, caractérisés par une coordonnée fortement négative sur l'axe).

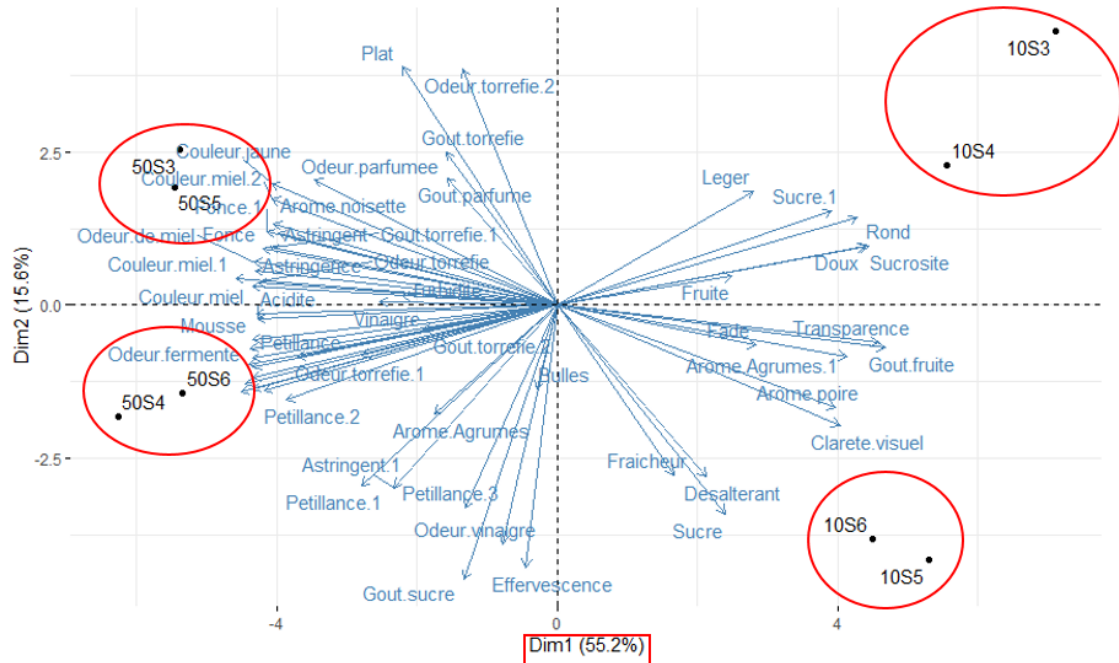
Le 1<sup>er</sup> groupe décrit (caractérisés par une coordonnée positive sur l'axe) les échantillons #2.1 séries 3 et 5 avec les caractéristiques suivantes : plat, acide et odeur de miel (de la plus extrême à la moins extrême (Figure 68)) tandis que le caractère clarté visuelle n'est pas représentatif de ces boissons.

L'échantillon de la série 4 #2.1 (caractérisé par une coordonnée positive sur l'axe) regroupe les descripteurs suivants pour sa caractérisation : odeur de fermenté, pétillant, longueur en bouche et goût torréfié (de la plus extrême à la moins extrême). En revanche les descripteurs ne correspondant pas à la boisson sont les caractères rond et sucré.

Le 2<sup>ème</sup> groupe auquel les boissons #2.2 séries 3 et 4 appartiennent (caractérisés par une coordonnée négative sur l'axe) évoque la série de descripteurs suivants pour l'analyse des boissons : sucrosité, doux, léger et rond (de la plus extrême à la moins extrême). En outre, les variables goût vinaigré, rémanence,

effervescence, acide acétique, gout acide, pétilliance, acidité, et acidulé ne représentent pas ce groupe de boissons (de la plus extrême à la moins extrême).

Il est à noter que les variables couleur miel, gout fruité et transparence sont extrêmement corrélées à cette dimension (corrélations respectives de 0.92, 0.95, 0.92) et pourraient résumer à elles seules la dimension 1.

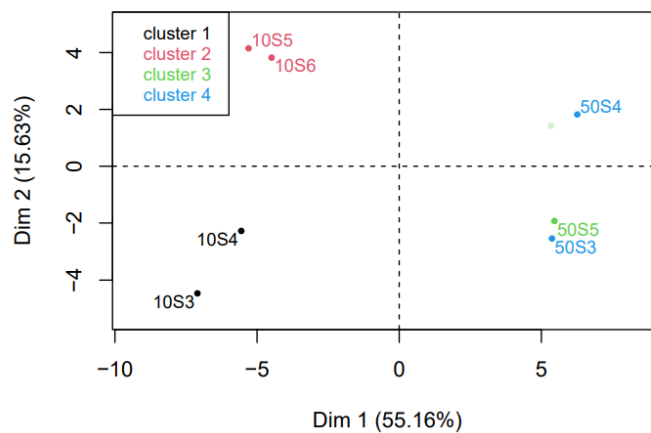


**Figure 62.** Représentation graphique des variables du profil flash et des clusters d'échantillons dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence aux boissons #2.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » aux boissons #2.2 (10g/L kasha))





**Figure 63.** Représentation graphique des variables du profil flash dans le plan 1:2 en fonction de leur contribution (échelle de couleurs) (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan ; les variables suivies d'un « 1 » font référence aux boissons #2.1 (50g/L kasha) et celles suivies d'un « 2 » aux boissons #2.2 (10g/L kasha))



**Figure 64.** Classification hiérarchique des échantillons du profil flash en clusters dans le plan 1:2 (ACP) (Les variables libellées sont celles les mieux représentées sur le plan)

Finalement, une classification ascendante hiérarchique des individus sous forme de clusters peut être établie dans le plan reprenant les 2 dimensions (Figure 70). Celle-ci permet de regrouper les individus ayant évalués les boissons similairement, présentant ainsi les mêmes degrés d'appréciation des produits. En résumé, 4 groupes de boissons sont retrouvés et chaque groupe correspond à une même concentration en sarrasin et à des séries successives. Les boissons #2.1 séries 3 et 4 sont décrites comme plates, acide, présentant une odeur de miel et troubles. La boisson #2.1 série 5 se détache des précédentes pour ses caractéristiques d'odeur de fermenté, de pétillant, de longueur en bouche et de goût torréfié. Les boissons moins concentrées en sarrasin (#2.2 séries 3 et 4) sont à l'opposé décrites comme sucrées, douces, légères et rondes.



## **Contribution personnelle**

- Production des échantillons
- Établissement d'un plan expérimental visant à développer une boisson fonctionnelle par fermentation d'une matrice céréalière, à caractériser celle-ci physico chimiquement, et à analyser son évolution (stabilité) dans le temps par fermentations successives
- Mise en place de protocole de dosages des activités anti-oxydantes (DPPH) et anti-inflammatoires (anti COX-2) des échantillons par spectrophotométrie
- Mise en place d'un plan expérimental d'analyse des composés organiques volatils en GC-MS (SBSE)
- Élaboration et organisation d'analyses sensorielles sur les produits par le biais de dégustations et formulaires à remplir
- Traitement, analyse et discussion des résultats - Proposition d'hypothèses

## Conclusion et perspectives

Pour conclure ce projet sur l'étude et le développement d'une boisson fonctionnelle à base de sobacha, la diminution du pH est un marqueur de l'évolution de la boisson et permet d'assurer la sécurité de celle-ci pour la santé du consommateur (développement de microorganismes non désirables)<sup>15</sup>. En adoptant un point de vue analytique sur la boisson, les cinétiques de développement des composés chimiques visent à caractériser l'activité métabolique des microorganismes du SCOBY au cours de la fermentation. En effet, le saccharose ajouté en début de fermentation est hydrolysé par les levures (*Saccharomyces cerevisiae* principalement) afin de synthétiser de l'éthanol, ce dernier servant de substrat à son tour dans la production d'acides organiques par les bactéries (acide acétique majoritairement). La matrice céréalière à l'origine de la boisson étant un substrat amidonné, l'amidon et les sucres complexes du sarrasin sont également partiellement hydrolysés lors de la fermentation. Le glucose obtenu majoritairement de l'hydrolyse du saccharose (mais également des sucres du sarrasin) est la source carbonée privilégiée du microbiome ; il permet la synthèse de cellulose du SCOBY par les bactéries acétiques en parallèle de celle des acides. Ainsi, les différences de rendement fermentaire observées entre les deux modalités de concentration en sarrasin (10 et 50g/L) proviennent principalement de la quantité de sucres disponibles pour la fermentation mais également des nutriments disponibles provenant des sucres complexes de la matrice. Les fermentations successives des boissons visant à étudier l'évolution et la stabilité de celles-ci démontrent une acidification plus lente du milieu. De plus, les quantités de sucres plus élevées en parallèle des dosages en éthanol et acides plus faibles permettent de mettre en lumière un ralentissement de certaines voies métaboliques. En effet, le glucose est moins utilisé pour la production de cellulose du SCOBY par les microorganismes, observé par des disques de cellulose de plus en plus fins au fil des séries. Cette expérience permet l'établissement de marqueurs de changement de la population microbienne de départ. Ceux-ci se traduisent par un changement dans l'utilisation des voies métaboliques ou un arrêt de certaines pouvant induire un blocage de la fermentation ; la sélection et spécification du microbiome de la boisson ; une modification des composantes de la boisson liée à celle du jus de repiquage.

L'étude des composés organiques volatils permet l'analyse de cinétiques de production de composés potentiellement aromatiques tels que les esters, aldéhydes, cétones, terpènes, ... au départ d'acides carboxyliques, alcools notamment. Ainsi, la synthèse de ces arômes évolue au cours de la fermentation, traduisant de l'activité des microorganismes à utiliser des voies fermentaires multiples dans la recherche d'un milieu optimal pour leur développement. La mise en parallèle des COV et des analyses sensorielles effectuées sur les boissons permet de mettre en lumière les préférences du consommateur en lien avec les arômes et les descripteurs de la boisson finale. Globalement, les consommateurs apprécient la boisson la plus concentrée en sarrasin pour ses arômes fruités (agrumes), notes vertes, gras/cireux/crémeux, épicé/boisé (esters, cétones et phénols principalement) ainsi que pour son acidité, arôme de noisette torréfié prédominant (pyrazines du sobacha), intensité de l'acidité et goût. Les consommateurs opposés apprécient plutôt la boisson la moins concentrée en sarrasin pour ses arômes sûr/aigre, floral, sulfureux/grillé, fruités (melon), notes vertes (acides carboxyliques, esters et alcools principalement) mais également pour sa couleur, fraîcheur et pétillance.

L'analyse sensorielle effectuée sur les boissons fermentées successivement démontre une différence perçue pour la teneur en sarrasin et des similitudes d'arômes pour les séries de fermentation proches. Les boissons les plus concentrées sont plutôt plates, acides, présentant une odeur de miel et troubles tandis que les moins concentrées sont décrites comme sucrées, douces, légères et rondes.

D'un point de vue macroscopique, les analyses colorimétriques permettent de souligner que la couleur des boissons se fonce avec l'acidification du milieu. En effet, bien que la couleur soit majoritairement liée à celle du substrat de départ, l'activité de synthèse de composés par le microbiome semble apporter un trouble aux boissons. L'activité potentielle des composés chromophores pourrait être étudiée pour compléter cette analyse. Les aspects technologiques de la boisson soulignent également que les pouvoirs antioxydants et anti-inflammatoires présents dans la matrice céréale de départ sont maintenus par la fermentation. Cette dernière présente également ces activités par la synthèse de composés naturels bioactifs au cours de l'acidification du milieu. En revanche, la coexistence de plusieurs formes d'activités biologiques au cours de fermentations successives n'est pas certifiée ; lié à l'adaptation et spécification du microbiome de la boisson au cours du temps.

Les perspectives d'amélioration de ce travail sont multiples et considèrent plusieurs aspects de la recherche. Dans un premier temps, un panel de boissons fonctionnelles de ce type pourrait être développé et étudié, la matrice de départ étant transposable. En effet, la détermination des nutriments limitants et nécessaires à la fermentation du SCOBY est peu étudiée aujourd'hui. Plusieurs études<sup>26,28,52,69,85,99</sup> ont démontré l'efficacité de la fermentation mixte sur diverses matrices telles que le thé, l'hibiscus, l'eau de coco, les céréales, ... Il est désormais primordial de comprendre les voies métaboliques empruntées par le microbiome de ces boissons de par l'analyse des cinétiques d'évolution et de dosages des composés organiques synthétisés au cours de ces fermentations. Ensuite, la caractérisation de la communauté microbienne de la boisson pourrait être envisagée, dans le but d'identifier les microorganismes présents dans le SCOBY de départ mais également d'étudier l'évolution de celui-ci et sa potentielle spécification. La morphologie du SCOBY est également un paramètre indicateur de la variabilité de la communauté microbienne<sup>24</sup>. L'aspect du SCOBY serait également un point à approfondir par l'analyse de la composition en cellulose, la formation de feuillets, les liaisons intermoléculaires à l'origine de la synthèse d'un autre bio polymère (hémicellulose par exemple) mais également la potentielle capacité de ramification de la cellulose en branchements.

L'étude approfondie des COV présents dans les échantillons doit être envisagée, relatant de la réelle synthèse de composés au cours de la fermentation. La détermination des dosages en ces composés ainsi que des OAV est nécessaire dans l'optique de quantifier l'impact des métabolites et arômes sur la boisson finale. Une étude statistique complémentaire visant à la comparaison des COV d'un kombucha de référence fermenté dans les mêmes conditions permettrait d'illustrer la spécificité du microbiome induisant la saveur unique et originale de l'hakko sobacha.

L'analyse des cinétiques de fermentations successives pourraient être considérée non pas pour chaque fin de séries mais plutôt chaque jour de fermentation de celles-ci, relatant de l'évolution de la boisson quotidiennement et ce durant plusieurs semaines. La compréhension des variations de composés induits par l'adaptation et la spécification du microbiome serait mieux perçue.

Concernant les aspects santé de la boisson sur l'organisme, le dosage de molécules thérapeutiques telles que l'acide glucuronique s'avère être un indicateur clé<sup>114</sup>. L'étude des activités anti-oxydantes pourrait être envisagée par d'autres techniques illustrant des mécanismes complémentaires à ceux du test DPPH<sup>1,60</sup>. Une analyse approfondie de l'impact de la fermentation sur les propriétés anti-inflammatoires de la matrice de départ permettrait d'observer la préservation de celles-ci par la fermentation et son évolution.

Finalement, l'aspect économique peut être considéré dans l'optique de commercialisation de cette boisson fonctionnelle, la matrice kasha de départ étant onéreuse. D'une part, la teneur en kasha de 10g/L pourrait être fixée. D'autre part, les coûts à l'importation de cette matrice depuis le Japon étant non négligeables, le développement d'une filière de production de kasha locale pourrait être envisagée. Cette dernière nécessiterait l'étude des paramètres de préparation du sarrasin belge et la mise en place du procédé de torréfaction des grains, dans la prise en main du savoir-faire japonais rendant la matrice riche en arômes et en propriétés bénéfiques pour la santé.

## Références bibliographiques

- (1) Bamforth, C. W.; Cook, D. J. Food, Fermentation and Micro-Organisms. **2019**.
- (2) Chavan, J. K.; Kadam, S. S. Nutritional Improvement of Cereals by Fermentation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, 28 (5), 349–400. <https://doi.org/10.1080/10408398909527507>.
- (3) Caplice, E.; Fitzgerald, G. F. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, 50 (1–2), 131–149. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3).
- (4) Redzepi, R.; Zilber, D. *The Noma Guide to Fermentation: Including Koji, Kombuchas, Shoyus, Misos, Vinegars, Garums, Lacto-Ferments, and Black Fruits and Vegetables*; Artisan Books, 2018.
- (5) Simango, C. Potential Use of Traditional Fermented Foods for Weaning in Zimbabwe. *Soc. Sci. Med.* **1997**, 44 (7), 1065–1068. [https://doi.org/10.1016/S0277-9536\(96\)00261-4](https://doi.org/10.1016/S0277-9536(96)00261-4).
- (6) Roller, S.; Harlander, S. Modern Food Biotechnology: Overview of Key Issues. *Genet. Modif. Food Ind.* **1998**, 3–26. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5815-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5815-6_1).
- (7) Katz, S. E. *Wild Fermentation: The Flavor, Nutrition, and Craft of Live-Culture Foods, 2nd Edition*; Chelsea Green Publishing, 2016.
- (8) Zou, L.; Wu, D.; Ren, G.; Hu, Y.; Peng, L.; Zhao, J.; Garcia-Perez, P.; Carpena, M.; Prieto, M. A.; Cao, H.; Cheng, K. W.; Wang, M.; Simal-Gandara, J.; John, O. D.; Rengasamy, K. R. R.; Zhao, G.; Xiao, J. Bioactive Compounds, Health Benefits, and Industrial Applications of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum*). <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952161> **2021**. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952161>.
- (9) Sharma, R.; Garg, P.; Kumar, P.; Bhatia, S. K.; Kulshrestha, S. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Ferment. 2020, Vol. 6, Page 106* **2020**, 6 (4), 106. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6040106>.
- (10) Simpson, B. K. Food Biochemistry and Food Processing Second Edition I. **2012**.
- (11) Odumeru, J. A. Microbial Safety of Food and Food Products. *Food Biochem. Food Process.* **2007**, 689–704. <https://doi.org/10.1002/9780470277577.CH30>.
- (12) BRANGER, A. Fabrication de Produits Alimentaires Par Fermentation : L'ingénierie. *Agroalimentaire* **2004**. <https://doi.org/10.51257/A-V1-F3501>.
- (13) Sievers, M.; Lanini, C.; Weber, A.; Schuler-Schmid, U.; Teuber, M. Microbiology and Fermentation Balance in a Kombucha Beverage Obtained from a Tea Fungus Fermentation. *Syst. Appl. Microbiol.* **1995**, 18 (4), 590–594. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80420-0](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80420-0).
- (14) Manpreet, S.; Sawraj, S.; Sachin, D.; Pankaj, S.; Banerjee, U. C.\*. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. *Malays. J. Microbiol.* **2005**. <https://doi.org/10.21161/MJM.120501>.
- (15) Sevindik, M.; Uysal, I. Food Spoilage and Microorganisms. *Turkish J. Agric. - Food Sci. Technol.* **2021**, 9 (10), 1921–1924. <https://doi.org/10.24925/TURJAF.V9I10.1921-1924.4658>.
- (16) Salmerón, I.; Thomas, K.; Pandiella, S. S. Effect of Substrate Composition and Inoculum on the Fermentation Kinetics and Flavour Compound Profiles of Potentially Non-Dairy Probiotic Formulations. *LWT - Food Sci. Technol.* **2014**, 55 (1), 240–247. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.07.008>.
- (17) Lonăr, E.; Djurić, M.; Malbaša, R.; Kolarov, L. J.; Klačnja, M. Influence of Working Conditions Upon Kombucha Conducted Fermentation of Black Tea. *Food Bioprod. Process.* **2006**, 84 (3), 186–192. <https://doi.org/10.1205/FBP.04306>.
- (18) Salmerón, I.; Thomas, K.; Pandiella, S. S. Effect of Potentially Probiotic Lactic Acid Bacteria on the Physicochemical Composition and Acceptance of Fermented Cereal Beverages. *J. Funct. Foods* **2015**, 15, 106–115. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.03.012>.
- (19) Marlett, J. A.; McBurney, M. I.; Slavin, J. L. Position of the American Dietetic Association: Health Implications of Dietary Fiber. *J. Am. Diet. Assoc.* **2002**, 102 (7), 993–1000. [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(02\)90228-2](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(02)90228-2).
- (20) Watawana, M. I.; Jayawardena, N.; Gunawardhana, C. B.; Waisundara, V. Y. Health, Wellness, and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha. *J. Chem.* **2015**, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/591869>.

- (21) Zhao, Z. J.; Sui, Y. C.; Wu, H. W.; Zhou, C. B.; Hu, X. C.; Zhang, J. Flavour Chemical Dynamics during Fermentation of Kombucha Tea. *Emirates J. Food Agric.* **2018**, *30* (9), 732–741. <https://doi.org/10.9755/EJFA.2018.V30.I9.1794>.
- (22) Dufresne, C.; Farnworth, E. Tea, Kombucha, and Health: A Review. *Food Res. Int.* **2000**, *33* (6), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3).
- (23) Teoh, A. L.; Heard, G.; Cox, J. Yeast Ecology of Kombucha Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *95* (2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2003.12.020>.
- (24) Laavanya, D.; Shirkole, S.; Balasubramanian, P. Current Challenges, Applications and Future Perspectives of SCOBY Cellulose of Kombucha Fermentation. *J. Clean. Prod.* **2021**, *295*, 126454. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.126454>.
- (25) Villarreal-Soto, S. A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J. P.; Taillandier, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J. Food Sci.* **2018**, *83* (3), 580–588. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>.
- (26) Melini, F.; Melini, V.; Luziatelli, F.; Ficca, A. G.; Ruzzi, M. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients* **2019**, *11* (5). <https://doi.org/10.3390/NU11051189>.
- (27) De Filippis, F.; Troise, A. D.; Vitaglione, P.; Ercolini, D. Different Temperatures Select Distinctive Acetic Acid Bacteria Species and Promotes Organic Acids Production during Kombucha Tea Fermentation. *Food Microbiol.* **2018**, *73*, 11–16. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.01.008>.
- (28) Dutta, H.; Paul, S. K. Kombucha Drink: Production, Quality, and Safety Aspects. *Prod. Manag. Beverages* **2019**, 259–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0>.
- (29) Talebi, M.; Frink, L. A.; Patil, R. A.; Armstrong, D. W. Examination of the Varied and Changing Ethanol Content of Commercial Kombucha Products. *Food Anal. Methods* **2017**, *10* (12), 4062–4067. <https://doi.org/10.1007/S12161-017-0980-5/FIGURES/4>.
- (30) McNeil, B.; Harvey, L. M.; Rowan, N. J.; Giavasis, I. Fermentation Monitoring and Control of Microbial Cultures for Food Ingredient Manufacture. *Microb. Prod. Food Ingredients, Enzym. Nutraceuticals* **2013**, 125–143. <https://doi.org/10.1533/9780857093547.1.125>.
- (31) Ansorena, D.; Astiasarán, I. Fermented Foods: Composition and Health Effects. *Encycl. Food Heal.* **2015**, 649–655. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00285-3>.
- (32) Xu, Q.; Wang, L.; Li, W.; Xing, Y.; Zhang, P.; Wang, Q.; Li, H.; Liu, H.; Yang, H.; Liu, X.; Ma, Y. Scented Tartary Buckwheat Tea: Aroma Components and Antioxidant Activity. *Mol.* **2019**, *Vol. 24, Page 4368* **2019**, *24* (23), 4368. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24234368>.
- (33) Rao Vemula, S.; Gavaravarapu, S. M.; Kumar, A. Traditional Foods, Functional Foods and Nutraceuticals. <https://doi.org/10.16943/ptinsa/2016/48888>.
- (34) LiangLiang, G.; XiaoYan, H.; Yue, L.; QingFu, C. Production Technology Optimization on Fermented Tea of Golden Buckwheat. *Guizhou Agric. Sci.* **2014**, *42* (4), 169–174.
- (35) Pederson, C. S. (Carl S. Microbiology of Food Fermentations. **1979**, 384. <https://doi.org/10.3/JQUERY-UIJS>.
- (36) Sengun, I. Y.; Karabiyikli, S. Importance of Acetic Acid Bacteria in Food Industry. *Food Control* **2011**, *22* (5), 647–656. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2010.11.008>.
- (37) Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Paslier, D. Le; Yamada, T.; Mende, D. R.; Fernandes, G. R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J. M.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H. B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E. G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W. M.; Brunak, S.; Doré, J.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P.; Antolín, M.; Artiguenave, F.; Blottiere, H. M.; Almeida, M.; Brechot, C.; Cara, C.; Chervaux, C.; Cultrone, A.; Delorme, C.; Denariáz, G.; Dervyn, R.; Foerstner, K. U.; Friss, C.; Guchte, M. van de; Guedon, E.; Haimet, F.; Huber, W.; Hylckama-Vlieg, J. van; Jamet, A.; Juste, C.; Kaci, G.; Knol, J.; Kristiansen, K.; Lakhdari, O.; Layec, S.; Roux, K. Le; Maguin, E.; Mérieux, A.; Minardi, R. M.; M’rini, C.; Muller, J.; Oozeer, R.; Parkhill, J.; Renault, P.; Rescigno, M.; Sanchez, N.; Sunagawa, S.; Torrejon, A.; Turner, K.; Vandemeulebrouck, G.; Varela, E.; Winogradsky, Y.; Zeller, G. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* **2011**, *473* (7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/NATURE09944>.

- (38) Behera, S. S.; Ray, R. C.; Das, U.; Panda, S. K.; Saranraj, P. Microorganisms in Fermentation. *Learn. Mater. Biosci.* **2019**, 1–39. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16230-6_1).
- (39) Jayabalan, R.; Malbaša, R. V.; Lončar, E. S.; Vitas, J. S.; Sathishkumar, M. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13* (4), 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>.
- (40) Liu, Y.; Liu, Z.; Xu, Z.; Li, G. Stir Bar Sorptive Extraction Technology. *Prog. Chem.* **2020**, *32* (9), 1334. <https://doi.org/10.7536/PC200101>.
- (41) Reva, O. N.; Zaets, I. E.; Ovcharenko, L. P.; Kukharenko, O. E.; Shpylova, S. P.; Podolich, O. V.; de Vera, J. P.; Kozyrovska, N. O. Metabarcoding of the Kombucha Microbial Community Grown in Different Microenvironments. *AMB Express* **2015**, *5* (1). <https://doi.org/10.1186/S13568-015-0124-5>.
- (42) Villarreal-Soto, S. A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J. P.; Renard, T.; Rollan, S.; Taillandier, P. Impact of Fermentation Conditions on the Production of Bioactive Compounds with Anticancer, Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties in Kombucha Tea Extracts. *Process Biochem.* **2019**, *83*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2019.05.004>.
- (43) Peng, L. X.; Zou, L.; Wang, J. B.; Zhao, J. L.; Xiang, D. B.; Zhao, G. Flavonoids, Antioxidant Activity and Aroma Compounds Analysis from Different Kinds of Tartary Buckwheat Tea. *Indian J. Pharm. Sci.* **2015**, *77* (6), 661. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.174972>.
- (44) Guo, H.; Yang, X.; Zhou, H.; Luo, X.; Qin, P.; Li, J.; Ren, G. Comparison of Nutritional Composition, Aroma Compounds, and Biological Activities of Two Kinds of Tartary Buckwheat Tea. *J. Food Sci.* **2017**, *82* (7), 1735–1741. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13772>.
- (45) Chan, M.; Sy, H.; Finley, J.; Robertson, J.; Brown, P. N. Determination of Ethanol Content in Kombucha Using Headspace Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection: Single-Laboratory Validation. *J. AOAC Int.* **2021**, *104* (1), 122–128. <https://doi.org/10.1093/JAOACINT/QSAA094>.
- (46) Jayabalan, R.; Marimuthu, S.; Swaminathan, K. Changes in Content of Organic Acids and Tea Polyphenols during Kombucha Tea Fermentation. *Food Chem.* **2007**, *102* (1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.05.032>.
- (47) Neffe-Skocińska, K.; Sionek, B.; Ścibisz, I.; Kołożyn-Krajewska, D. Acid Contents and the Effect of Fermentation Condition of Kombucha Tea Beverages on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties. <http://mc.manuscriptcentral.com/tcyt> **2017**, *15* (4), 601–607. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1321588>.
- (48) Agblevor, F. A.; Murden, A.; Hames, B. R. Improved Method of Analysis of Biomass Sugars Using High-Performance Liquid Chromatography. *Biotechnol. Lett.* **2004**, *26* (15), 1207–1211. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000036596.95796.42>.
- (49) Chen, C.; Liu, B. Y. Changes in Major Components of Tea Fungus Metabolites during Prolonged Fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89* (5), 834–839. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.01188.X>.
- (50) Jang, S. S. I. K.; McIntyre, L.; Chan, M.; Brown, P. N.; Finley, J.; Chen, S. X. Ethanol Concentration of Kombucha Teas in British Columbia, Canada. *J. Food Prot.* **2021**, *84* (11), 1878–1883. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-130>.
- (51) Gaeini, Z.; Bahadoran, Z.; Mirmiran, P.; Azizi, F. Tea, Coffee, Caffeine Intake and the Risk of Cardio-Metabolic Outcomes: Findings from a Population with Low Coffee and High Tea Consumption. *Nutr. Metab.* **2019**, *16* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12986-019-0355-6/TABLES/4>.
- (52) Gaggia, F.; Baffoni, L.; Galiano, M.; Nielsen, D. S.; Jakobsen, R. R.; Castro-Mejía, J. L.; Bosi, S.; Truzzi, F.; Musumeci, F.; Dinelli, G.; Di Gioia, D. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* **2019**, *11* (1). <https://doi.org/10.3390/nu11010001>.
- (53) Jayabalan, R.; Malini, K.; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K.; Yun, S. E. Biochemical Characteristics of Tea Fungus Produced during Kombucha Fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **2010**, *19* (3), 843–847. <https://doi.org/10.1007/S10068-010-0119-6>.
- (54) Greenwalt, C. J.; Steinkraus, K. H.; Ledford, R. A. Kombucha, the Fermented Tea:

- Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *J. Food Prot.* **2000**, *63* (7), 976–981. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.976>.
- (55) Sreeramulu, G.; Zhu, Y.; Knol, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2589–2594. <https://doi.org/10.1021/JF991333M>.
- (56) Chu, S. C.; Chen, C. Effects of Origins and Fermentation Time on the Antioxidant Activities of Kombucha. *Food Chem.* **2006**, *98* (3), 502–507. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.05.080>.
- (57) Shebis, Y.; Iluz, D.; Kinel-Tahan, Y.; Dubinsky, Z.; Yehoshua, Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food Nutr. Sci.* **2013**, *04* (06), 643–649. <https://doi.org/10.4236/FNS.2013.46083>.
- (58) Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. <http://dx.doi.org/10.1080/10715760290006411> **2009**, *36* (2), 177–187. <https://doi.org/10.1080/10715760290006411>.
- (59) Müller, L.; Fröhlich, K.; Böhm, V. Comparative Antioxidant Activities of Carotenoids Measured by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), ABTS Bleaching Assay (ATEAC), DPPH Assay and Peroxyl Radical Scavenging Assay. *Food Chem.* **2011**, *129* (1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.04.045>.
- (60) Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for Testing Antioxidant Activity. *Analyst* **2002**, *127* (1), 183–198. <https://doi.org/10.1039/B009171P>.
- (61) Tömösközi, S.; Langó, B. Buckwheat: Its Unique Nutritional and Health-Promoting Attributes. *Gluten-Free Anc. Grains Cereal. Pseudocereals, Legum. Sustain. Nutr. Heal. Foods 21st Century* **2017**, 161–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100866-9.00007-8>.
- (62) Biacs, P.; Aubrecht, E.; Léder, I.; Lajos, J. Buckwheat. *Pseudocereals Less Common Cereal.* **2002**, 123–151. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-09544-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-662-09544-7_4).
- (63) Alvarez-Jubete, L.; Arendt, E. K.; Gallagher, E. Nutritive Value of Pseudocereals and Their Increasing Use as Functional Gluten-Free Ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.10.014>.
- (64) Fabjan, N.; Rode, J.; Kosir, I. J.; Wang, Z.; Zhang, Z.; Kreft, I. Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum* Gaertn.) as a Source of Dietary Rutin and Quercitrin. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (22), 6452–6455. <https://doi.org/10.1021/JF034543E>.
- (65) Ikeda, K. Buckwheat Composition, Chemistry, and Processing. *Adv. Food Nutr. Res.* **2002**, *44*, 395–434. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(02\)44008-9](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(02)44008-9).
- (66) Préstamo, G.; Pedrazuela, A.; Peñas, E.; Lasunción, M. A.; Arroyo, G. Role of Buckwheat Diet on Rats as Prebiotic and Healthy Food. *Nutr. Res.* **2003**, *23* (6), 803–814. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00074-5).
- (67) Mondal, S.; Bhar, K.; Sahoo, S. K.; Seru, G.; Ashfaquddin, M.; Pradhan, N. K.; Anjum, M.; Molla, S. Silver Hull Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench) Is a Part of Nature That Offers Best Health and Honour. *J. Complement. Altern. Med. Res.* **2021**, *15* (2), 22–52. <https://doi.org/10.9734/JOCAMR/2021/V15I230262>.
- (68) Krkošková, B.; Mrázová, Z. Prophylactic Components of Buckwheat. *Food Res. Int.* **2005**, *38* (5), 561–568. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2004.11.009>.
- (69) Ignat, M. V.; Salanță, L. C.; Pop, O. L.; Pop, C. R.; Tofană, M.; Mudura, E.; Coldea, T. E.; Borșa, A.; Pasqualone, A. Current Functionality and Potential Improvements of Non-Alcoholic Fermented Cereal Beverages. *Foods 2020, Vol. 9, Page 1031* **2020**, *9* (8), 1031. <https://doi.org/10.3390/FOODS9081031>.
- (70) Qin, P.; Ma, T.; Wu, L.; Shan, F.; Ren, G. Identification of Tartary Buckwheat Tea Aroma Compounds with Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Food Sci.* **2011**, *76* (6), S401–S407. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2011.02223.X>.
- (71) Giménez-Bastida, J.; Piskula, M.; Zielinski, H. Recent Advances in Processing and Development of Buckwheat Derived Bakery and Non-Bakery Products – a Review. *Polish J. Food Nutr. Sci.* **2015**, *65* (1), 9–20. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2015-0005>.
- (72) Zielinska, D.; Szawara-Nowak, D.; Zielinski, H. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Buckwheat Hull Tea Infusion. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2010.551308> **2012**, *16* (1), 228–239. <https://doi.org/10.1080/10942912.2010.551308>.
- (73) Li, S. Q.; Howard Zhang, Q. Advances in the Development of Functional Foods from

- Buckwheat. <http://dx.doi.org/10.1080/20014091091887> **2010**, *41* (6), 451–464. <https://doi.org/10.1080/20014091091887>.
- (74) Zieliński, H.; Kozłowska, H. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2008–2016. <https://doi.org/10.1021/JF990619O>.
- (75) Quettier-Deleu, C.; Gressier, B.; Vasseur, J.; Dine, T.; Brunet, C.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J. C.; Bailleul, F.; Trotin, F. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench) Hulls and Flour. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *72* (1–2), 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3).
- (76) Tian, Q.; Li, D.; Patil, B. S. Identification and Determination of Flavonoids in Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench, Polygonaceae) by High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionisation Mass Spectrometry and Photodiode Array Ultraviolet Detection. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13* (5), 251–256. <https://doi.org/10.1002/PCA.649>.
- (77) Qin, P.; Wu, L.; Yao, Y.; Ren, G. Changes in Phytochemical Compositions, Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activities during the Processing of Tartary Buckwheat Tea. *Food Res. Int.* **2013**, *50* (2), 562–567. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.03.028>.
- (78) Tanoh, E. A.; Nea, F.; Kemene, T. K.; Genva, M.; Saive, M.; Tonzibo, F. Z.; Fauconnier, M. L. Antioxidant and Lipooxygenase Inhibitory Activities of Essential Oils from Endemic Plants of Côte d'Ivoire: *Zanthoxylum Mezoneurispinosum* Ake Assi and *Zanthoxylum Psammophilum* Ake Assi. *Molecules* **2019**, *24* (13). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132445>.
- (79) Tanoh, E. A.; Boué, G. B.; Nea, F.; Genva, M.; Wognin, E. L.; Ledoux, A.; Martin, H.; Tonzibo, Z. F.; Frederich, M.; Fauconnier, M. L. Seasonal Effect on the Chemical Composition, Insecticidal Properties and Other Biological Activities of *Zanthoxylum Leprieurii* Guill. & Perr. Essential Oils. *Foods* **2020**, *Vol. 9*, Page 550 **2020**, *9* (5), 550. <https://doi.org/10.3390/FOODS9050550>.
- (80) Novilla, A.; Djamhuri, D. S.; Nurhayati, B.; Rihibiha, D. D.; Afifah, E.; Widowati, W. Anti-Inflammatory Properties of Oolong Tea (*Camellia Sinensis*) Ethanol Extract and Epigallocatechin Gallate in LPS-Induced RAW 264.7 Cells. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2017**, *7* (11), 1005–1009. <https://doi.org/10.1016/J.APJT.2017.10.002>.
- (81) Srivastava, J. K.; Pandey, M.; Gupta, S. Chamomile, a Novel and Selective COX-2 Inhibitor with Anti-Inflammatory Activity. *Life Sci.* **2009**, *85* (19–20), 663–669. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2009.09.007>.
- (82) Kawai, S. Preparation of Sobacha (Green Tea Blended with Soba (Buckwheat)). JPS5621556A, December 6, 1978.
- (83) Shigenobu Nakayama. Buckwheat Tea. JPH06284880A, May 29, 1992.
- (84) Tsuruji Toshima. Production of Buckwheat Green Tea. JPH03201971A, December 29, 1989.
- (85) Blandino, A.; Al-Aseeri, M. E.; Pandiella, S. S.; Cantero, D.; Webb, C. Cereal-Based Fermented Foods and Beverages. *Food Res. Int.* **2003**, *36* (6), 527–543. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00009-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00009-7).
- (86) Gillooly, M.; Bothwell, T. H.; Charlton, R. W.; Torrance, J. D.; Bezwoda, W. R.; MacPhail, A. P.; Derman, D. P.; Novelli, L.; Morrall, P.; Mayet, F. Factors Affecting the Absorption of Iron from Cereals. *Br. J. Nutr.* **1984**, *51* (1), 37–46. <https://doi.org/10.1079/BJN19840007>.
- (87) KHETARPAUL, N.; CHAUHAN, B. M. Effects of Germination and Pure Culture Fermentation by Yeasts and Lactobacilli on Phytic Acid and Polyphenol Content of Pearl Millet. *J. Food Sci.* **1990**, *55* (4), 1180–1180. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1990.TB01632.X>.
- (88) Steinkraus, K. H. Bio-Enrichment: Production of Vitamins in Fermented Foods. *Microbiol. Fermented Foods* **1998**, 603–621. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_19).
- (89) Fisher, C.; Scott, T. R. Food Flavours. **1997**. <https://doi.org/10.1039/9781847550866>.
- (90) Maga, J. A.; Sizer, C. E. Pyrazines in Foods. *C R C Crit. Rev. Food Technol.* **1973**, *4* (1), 39–115. <https://doi.org/10.1080/10408397309527153>.
- (91) David, F.; Sandra, P. Stir Bar Sorptive Extraction for Trace Analysis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1152* (1–2), 54–69. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2007.01.032>.
- (92) Margoum, C.; Guillemain, C.; Yang, X.; Coquery, M.; Margoum, C.; Guillemain, C.; Yang, X. Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry



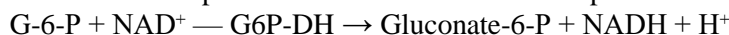
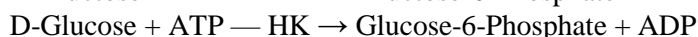
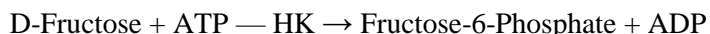
- for the Determination of Pesticides in Water Samples: Method Validation and Measurement Uncertainty Title : 1 Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the 2 Determination of Pesticides in Water Samples: Method Validation and Measurement Uncertainty. *Talanta* **2013**, *116*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.066>.
- (93) Ochiai, N.; Sasamoto, K.; David, F.; Sandra, P. Recent Developments of Stir Bar Sorptive Extraction for Food Applications: Extension to Polar Solutes. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (28), 7249–7255. [https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B02182/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2018-02182Z\\_0005.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B02182/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2018-02182Z_0005.JPEG).
- (94) J.K. Parker; J.S. Elmore; L. Methven. Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages. *Flavour Dev. Anal. Percept. Food Beverages* **2015**. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-16460-4>.
- (95) Oliveros, J.-C. *Venny 2.1.0*. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/> (accessed 2022-07-28).
- (96) Czaja, W.; Krystynowicz, A.; Bielecki, S.; Brown, R. M. Microbial Cellulose—the Natural Power to Heal Wounds. *Biomaterials* **2006**, *27* (2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.07.035>.
- (97) Cvetković, D.; Markov, S.; Djurić, M.; Savić, D.; Velićanski, A. Specific Interfacial Area as a Key Variable in Scaling-up Kombucha Fermentation. *J. Food Eng.* **2008**, *85* (3), 387–392. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2007.07.021>.
- (98) Burger, W.; Burge, M. J. Colorimetric Color Spaces. **2016**, 341–365. [https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6684-9\\_14](https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6684-9_14).
- (99) Aly, M. M. A.; Hassan, A. A.; El-Hadidie, S. T. Production of Cereal-Based Probiotic Beverages. *World Appl. Sci. J.* **2012**, *19* (10), 1367–1380. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.10.2797>.
- (100) Janeš, D.; Prosen, H.; Kreft, S. Identification and Quantification of Aroma Compounds of Tartary Buckwheat (*Fagopyrum Tataricum* Gaertn.) and Some of Its Milling Fractions. *J. Food Sci.* **2012**, *77* (7). <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2012.02778.X>.
- (101) Gershenzon, J.; Dudareva, N. The Function of Terpene Natural Products in the Natural World. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3* (7), 408–414. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>.
- (102) Starowicz, M.; Koutsidis, G.; Zieliński, H.; Starowicz, M.; Zieliński, H. Sensory Analysis and Aroma Compounds of Buckwheat Containing Products—a Review. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1284742> **2017**, *58* (11), 1767–1779. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1284742>.
- (103) Huigens, R. W.; Tennen, S.; Xiao, T.; Garrison, A. T. Pyrazines and Their Benzo Derivatives. *Compr. Heterocycl. Chem. IV* **2022**, 229–282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818655-8.00061-5>.
- (104) Mortzfeld, F. B.; Hashem, C.; Vranková, K.; Winkler, M.; Rudroff, F. Pyrazines: Synthesis and Industrial Application of These Valuable Flavor and Fragrance Compounds. *Biotechnol. J.* **2020**, *15* (11), 2000064. <https://doi.org/10.1002/BIOT.202000064>.
- (105) Prosen, H.; Kokalj, M.; Janeš, D.; Kreft, S. Comparison of Isolation Methods for the Determination of Buckwheat Volatile Compounds. *Food Chem.* **2010**, *121* (1), 298–306. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.12.014>.
- (106) Gou, M.; Bi, J.; Chen, Q.; Wu, X.; Fauconnier, M. L.; Qiao, Y. Advances and Perspectives in Fruits and Vegetables Flavor Based on Molecular Sensory Science. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2005088> **2021**. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2005088>.
- (107) Gou, M.; Bi, J.; Chen, Q.; Wu, X.; Fauconnier, M. L.; Qiao, Y. Advances and Perspectives in Fruits and Vegetables Flavor Based on Molecular Sensory Science. *Food Rev. Int.* **2021**. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.2005088>.
- (108) McFeeters, R. F. Fermentation Microorganisms and Flavor Changes in Fermented Foods. *J. Food Sci.* **2004**, *69* (1), FMS35–FMS37. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2004.TB17876.X>.
- (109) Frank, S.; Schieberle, P. Influence of the Manufacturing Process on Changes in the Concentrations of Selected Key Aroma Compounds of Dornfelder Red Wine. *Flavour Sci.* **2014**, 165–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398549-1.00031-3>.
- (110) Mattila, P.; Pihlava, J. M.; Hellström, J. Contents of Phenolic Acids, Alkyl- and

- Alkenylresorcinols, and Avenanthramides in Commercial Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (21), 8290–8295. <https://doi.org/10.1021/JF051437Z>.
- (111) Watanabe, M.; Ohshita, Y.; Tsushida, T. Antioxidant Compounds from Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Möench) Hulls. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (4), 1039–1044. <https://doi.org/10.1021/JF9605557>.
- (112) Hur, S. J.; Lee, S. Y.; Kim, Y. C.; Choi, I.; Kim, G. B. Effect of Fermentation on the Antioxidant Activity in Plant-Based Foods. *Food Chem.* **2014**, *160*, 346–356. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.112>.
- (113) Villarreal-Soto, S. A.; Bouajila, J.; Pace, M.; Leech, J.; Cotter, P. D.; Souchard, J. P.; Taillandier, P.; Beaufort, S. Metabolome-Microbiome Signatures in the Fermented Beverage, Kombucha. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *333*, 108778. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2020.108778>.
- (114) Nurikasari, M.; Puspitasari, Y.; Palupi, R.; Siwi, Y.; Surya, S.; Kediri, M. H. Characterization and Analysis Kombucha Tea Antioxidant Activity Based On Long Fermentation as a Beverage Functional. *J. Glob. Res. Public Heal.* **2017**, *2* (2), 90–96. <https://doi.org/10.30994/JGRPH.V2I2.109>.

## Annexes

### Annexe 1 : Protocoles détaillés des dosages de sucres, alcool et acides organiques par spectrophotométrie

- Le test enzymatique de détermination du **sucrose/D-glucose/D-fructose** (réf. E8190 r-biopharm) s'effectue avec la  $\beta$ -Fructosidase, l'Hexokinase (HK), la Phosphoglucose Isomérase (PGI) et la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G-6-P DH). Le NADH produit est mesuré à 340 nm (trajet optique 1 cm, mesure contre l'air ou l'eau) :



La préparation des échantillons s'effectue de la manière suivante (domaine de mesure 10-1500 mg/L) :

	Blanc réactif (BR)	Echantillons
Echantillon/ Standard	-	50 $\mu\text{L}$
Tampon phosphate	50 $\mu\text{L}$	-
Réactif 1 (NAD, $\beta$ -Fructosidase, ATP, PGI)	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
Mélanger, incuber 15 min à 20-25°C. Lire l'absorbance $A_1$ , puis ajouter.		
Réactif 2 (HK, G6P-DH)	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance $A_2$ .		

Un blanc réactif (BR) est mesuré une fois à chaque série et est soustrait de chaque échantillon lors du calcul des résultats.

Les sucres totaux (sucrose/D-glucose/D-fructose) sont déterminés comme suit :

$$\Delta A = (A_2 - df * A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df * A_1)_{BR}$$

$$df = (\text{échantillon} + R1) / (\text{échantillon} + R1 + R2) = 0,808$$

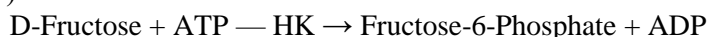
Où df (dilution factor) est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test

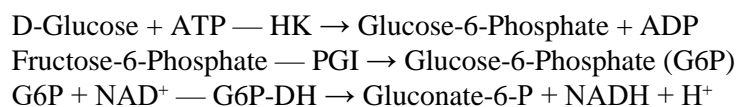
$$c = (V * MW * \Delta A) / (\varepsilon * d * v * 1000) = (2,600 * 180,16 * \Delta A) / (\varepsilon * 1 * 0,1 * 1000)$$

Où il en résulte pour une détermination à 340 nm :  $c_{\text{Sucres totaux}} = 0.744 * \Delta A \left[ \frac{g}{L} \right]$

Le résultat ci-dessus comprend la quantité de sucrose, D-glucose et D-fructose dans l'échantillon. Il est calculé comme "Sucres totaux", avec le poids moléculaire du Glucose (180,16 g/mol).

- Le test enzymatique de détermination du **D-glucose/D-fructose** (réf. E8160 r-biopharm) s'effectue avec l'Hexokinase (HK), la Phosphoglucose Isomérase (PGI) et la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6P-DH). Le NADH produit est mesuré à 340 nm (trajet optique 1 cm, mesure contre l'air ou l'eau) :





La préparation des échantillons s'effectue de la manière suivante (domaine de mesure 20-1500 mg/L) :

	Blanc réactif (BR)	Echantillons
Echantillon/ Standard	-	50 µL
Tampon phosphate	50 µL	-
Réactif 1 (NAD, tampon)	1000 µL	1000 µL
Mélanger, incuber 15 min à 20-25°C. Lire l'absorbance $A_1$ , puis ajouter.		
Réactif 2 (HK, G6P-DH)	250 µL	250 µL
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance $A_2$ , puis ajouter.		
Réactif 3 (PGI)	250 µL	250 µL
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance $A_3$		

Un blanc réactif (BR) est mesuré une fois à chaque série et est soustrait de chaque échantillon lors du calcul des résultats.

Les concentrations de D-glucose et D-fructose sont déterminées comme suit :

#### D-Glucose

$$\begin{aligned} \Delta A &= (A_2 - df * A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df * A_1)_{BR} \\ df &= (\text{échantillon} + R1) / (\text{échantillon} + R1 + R2) = 0,808 \end{aligned}$$

Où df (dilution factor) est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test

$$c = (V * MW * \Delta A) / (\varepsilon * d * v * 1000) = (2,600 * 180,16 * \Delta A) / (\varepsilon * 1 * 0,1 * 1000)$$

Où il en résulte pour une détermination à 340 nm ( $\varepsilon = 6,31 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ) :

$$c_{D-Glucose} = 0,744 * \Delta A \left[ \frac{g}{L} \right]$$

#### D-Fructose

$$\begin{aligned} \Delta A &= (A_3 - df * A_2)_{\text{échantillon}} - (A_3 - df * A_2)_{BR} \\ df &= (\text{échantillon} + R1 + R2) / (\text{échantillon} + R1 + R2 + R3) = 0,839 \end{aligned}$$

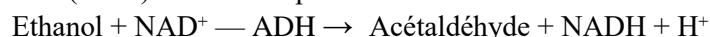
Où df (dilution factor) est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test

$$c = (V * MW * \Delta A) / (\varepsilon * d * v * 1000) = (3,100 * 180,16 * \Delta A) / (\varepsilon * 1 * 0,1 * 1000)$$

Où il en résulte pour une détermination à 340 nm ( $\varepsilon = 6,31 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ) :

$$c_{D-Fructose} = 0,877 * \Delta A \left[ \frac{g}{L} \right]$$

- Le test enzymatique de détermination de l'**Ethanol** (réf. E8340 r-biopharm) s'effectue avec l'alcool déshydrogénase (ADH). Le NADH produit est mesuré à 340 nm :



La préparation des échantillons s'effectue de la manière suivante (domaine de mesure 3-500 mg/L) :

	Blanc réactif (BR)	Echantillons
Echantillon/ Standard	-	50 µL
Tampon phosphate	50 µL	-
Réactif 1 (tampon)	1000 µL	1000 µL
Mélanger, incuber 3 min à 20-25°C. Lire l'absorbance A <sub>1</sub> , puis ajouter.		
Réactif 2 (NAD, ADH)	250 µL	250 µL
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance A <sub>2</sub> .		

Un blanc réactif (BR) est mesuré une fois à chaque série et est soustrait de chaque échantillon lors du calcul des résultats.

Le taux d'alcool est calculé comme suit :

$$\Delta A = (A_2 - df * A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df * A_1)_{BR}$$

$$df = (\text{échantillon} + R1) / (\text{échantillon} + R1 + R2) = 0,808$$

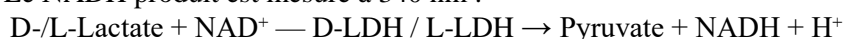
Où df (dilution factor) est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test

$$c = (V * MW * \Delta A) / (\varepsilon * d * v * 1000) = (2,600 * 46,07 * \Delta A) / (\varepsilon * 1 * 0,1 * 1000)$$

Où il en résulte pour une détermination à 340 nm ( $\varepsilon = 6,31 * \text{mmol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ):  $c_{Ethanol} = 0,190 * \Delta A \left[ \frac{g}{L} \right]$

$$\text{Alcool en volume (Vol. \%)} = \frac{c_{Ethanol} \left[ \frac{g}{L} \right]}{7,894}$$

- Le test enzymatique de détermination de l'**Acide lactique** (réf. E8240 r-biopharm) s'effectue avec la D-Lactate Déshydrogénase (D-LDH) et la L-Lactate Déshydrogénase (L-LDH), sans différenciation. Le NADH produit est mesuré à 340 nm :



La préparation des échantillons s'effectue de la manière suivante (domaine de mesure 10-500 mg/L) :

	Blanc réactif (BR)	Echantillons
Echantillon/ Standard	-	50 µL
Tampon phosphate	50 µL	-
Réactif 1 (tampon, D-LDH, L-LDH)	1000 µL	1000 µL
Mélanger, incuber 3 min à 20-25°C. Lire l'absorbance A <sub>1</sub> , puis ajouter.		
Réactif 2 (NAD)	250 µL	250 µL
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance A <sub>2</sub> .		

Un blanc réactif (BR) est mesuré une fois à chaque série et est soustrait de chaque échantillon lors du calcul des résultats.

L'évaluation du taux d'acide lactique se calcule de la manière suivante :

$$\Delta A = (A_2 - df * A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df * A_1)_{BR}$$

$$df = (\text{échantillon} + R1) / (\text{échantillon} + R1 + R2) = 0,808$$

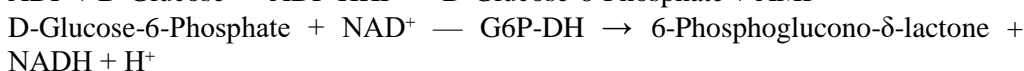
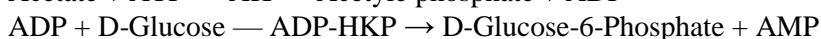
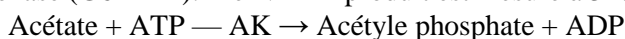
Où  $df$  (dilution factor) est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes de réactifs rajoutés pendant le test

$$c = (V * MW * \Delta A) / (\epsilon * d * v * 1000) = (2,600 * 90,1 * \Delta A) / (\epsilon * 1 * 0,1 * 1000)$$

Où il en résulte pour une détermination à 340 nm ( $\epsilon = 6,31 * mmol^{-1} * cm^{-1}$ ) :

$$c_{D-L-Lactate} = 0,3718 * \Delta A \left[ \frac{g}{L} \right]$$

- Le test enzymatique de détermination de l'**Acide acétique** (réf. E8226 r-biopharm) s'effectue avec l'Acétate kinase (AK), l'ADP-Hexokinase (ADP-HKP) et la Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase (G6P-DH). Le NADH produit est mesuré à 340 nm :



La préparation des échantillons s'effectue de la manière suivante (domaine de mesure 0,02-1,3 g/L) :

	Blanc réactif (BR)	Echantillons
Echantillon/ Standard	-	50 $\mu$ L
Tampon phosphate	50 $\mu$ L	-
Réactif 1 (tampon, NAD)	1000 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
Mélanger, incuber 3 min à 20-25°C. Lire l'absorbance $A_1$ , puis ajouter.		
Réactif 2 (AK, ADP-HKP, G6P-DH)	250 $\mu$ L	250 $\mu$ L
Mélanger, attendre la fin de la réaction (15 min à 20-25°C). Lire ensuite l'absorbance $A_2$ .		

Un blanc réactif (BR) est mesuré une fois à chaque série et est soustrait de chaque échantillon lors du calcul des résultats.

La détermination du taux d'acide acétique s'effectue à l'aide d'une courbe de calibration et de la résolution du polynôme de 4ème degré suivant :

$$c \left[ \frac{g}{L} \right] = (c_3 * \Delta A_3 + c_2 * \Delta A_2 + c_1 * \Delta A + OA)$$

$$= (0,4590 * \Delta A_3 - 0,1226 * \Delta A_2 + 0,3510 * \Delta A - 0,079)$$

$$\text{Où } \Delta A = (A_2 - df * A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - df * A_1)_{BR}$$

$$df = (\text{échantillon} + R1) / (\text{échantillon} + R1 + R2) = 0,808$$

Où  $df$  est le facteur de dilution de la densité optique, du fait des volumes ajoutés pendant le test.

## **Annexe 2 : Formulaire distribué aux sujets participant à l'analyse sensorielle reprenant les tests discriminatif et hédonique de l'étude**

Juge 1

### **Analyse sensorielle**

#### Dégustation de Sodas naturels

**Consignes : Une biscotte et de l'eau sont mis à votre disposition dans le but de vous rincer la bouche entre chaque dégustation**

Dans un premier temps, une série de questions préliminaires vous sont posées afin de caractériser la population échantillonnée au sein de la Faculté. Ensuite, l'analyse est divisée en 2 parties et a pour but de comparer deux boissons naturelles.

#### Préambule

1. Quel est votre genre ?
  - Femme
  - Homme
  - Ne désire pas le préciser
  
2. Dans quelle tranche d'âge vous trouvez-vous ?
  - Moins de 18 ans
  - De 18 à 25 ans
  - De 26 à 35 ans
  - De 36 à 45 ans
  - De 46 à 55 ans
  - De 56 à 65 ans
  - Plus de 65 ans
  
3. Quel est votre statut au sein de l'université Gembloux Agro-Bio Tech ?
  - Étudiant
  - Membre du personnel

#### Partie 1 : Test discriminatif de type triangulaire

***Veillez sonner à l'interrupteur pour recevoir les échantillons***

Lors de ce test, il vous est demandé de goûter les 3 produits (dont 2 sont identiques et 1 est différent) et de déterminer lequel est l'échantillon différent. **Veillez commencer la dégustation par le numéro d'échantillon muni d'une flèche et continuez dans le sens horloger.**

4. Quel est l'échantillon différent ?
  - 620
  - 424
  - 317

#### Partie 2 : Test d'acceptabilité (hédonique)

***Veillez sonner à l'interrupteur pour recevoir les échantillons suivants***

**Echantillon 637**

Lors de ce test, il vous est demandé d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la couleur de l'échantillon considéré.

5. Comment évaluez-vous la couleur de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très faible* à *très forte* l'intensité de l'acidité de l'échantillon.

6. Comment évaluez-vous l'**intensité** de l'acidité (saveur acide) de l'échantillon 1 (en comparaison à un soda traditionnel) ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à l'acidité (saveur acide) de l'échantillon.

7. Comment évaluez-vous l'acidité de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la pétillance de l'échantillon.

8. Comment évaluez-vous la pétillance de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la fraîcheur de l'échantillon.

9. Comment évaluez-vous la fraîcheur de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport au goût de l'échantillon.

10. Comment évaluez-vous le goût (arômes/saveurs) de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à l'arôme de noisette torréfiée de l'échantillon.

11. Comment évaluez-vous l'arôme de noisette torréfiée de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------



Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable
------------------	-------------------------------	--------------------------------	----------------------------	---------------

*Veuillez sonner à l'interrupteur pour recevoir les échantillons suivants*

**Echantillon 377**

Lors de ce test, il vous est demandé d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la couleur de l'échantillon considéré.

12. Comment évaluez-vous la couleur de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très faible* à *très forte* l'intensité de l'acidité de l'échantillon.

13. Comment évaluez-vous l'**intensité** de l'acidité de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très faible	Plutôt (assez) faible	Ni faible, ni forte	Plutôt (assez) forte	Très forte

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à l'acidité de l'échantillon.

14. Comment évaluez-vous l'acidité de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la pétillance de l'échantillon.

15. Comment évaluez-vous la pétillance de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est ensuite demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à la fraîcheur de l'échantillon.

16. Comment évaluez-vous la fraîcheur de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport au goût de l'échantillon.

17. Comment évaluez-vous le goût (arômes/saveurs) de l'échantillon ?

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Très désagréable	Plutôt (assez) désagréable	Ni désagréable, ni agréable	Plutôt (assez) agréable	Très agréable

Il vous est demandé de goûter le produit et d'évaluer sur une échelle allant de *très désagréable* à *très agréable* votre satisfaction en rapport à l'arôme de noisette torréfiée de l'échantillon.

18. Comment évaluez-vous l'arôme de noisette torréfiée de l'échantillon ?

- |                          |                            |                             |                          |                          |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/>   | <input type="checkbox"/>    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Très désagréable         | Plutôt (assez) désagréable | Ni désagréable, ni agréable | Plutôt (assez) agréable  | Très agréable            |

### Evaluation des préférences

*Veillez sonner à l'interrupteur pour recevoir les échantillons suivants*

Après avoir évalué les 2 échantillons séparément, il vous est demandé d'établir une préférence. Lors de ce test, il vous est demandé de goûter les deux produits et d'évaluer vos préférences par rapport aux caractères mis en évidence.

19. En vous basant uniquement sur une comparaison de la couleur, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

20. En vous basant uniquement sur une comparaison de l'**intensité** de l'acidité, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

21. En vous basant uniquement sur une comparaison de l'acidité, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

22. En vous basant uniquement sur une comparaison de la pétillance, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

23. En vous basant uniquement sur une comparaison de la fraîcheur, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

24. En vous basant uniquement sur une comparaison du goût, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

25. En vous basant uniquement sur une comparaison de l'arôme de noisette torréfiée, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

26. En prenant **tous les descripteurs précédents en compte**, quel échantillon préférez-vous ?

- 540
- 497

Pour finir cette analyse sensorielle, une dernière série de questions vous sont posées afin de caractériser vos habitudes de consommation de sodas naturels et également de boissons fermentées.

27. Vos habitudes de consommation

a. Consommez-vous des sodas naturels (à base d'ingrédients naturels – limonades, boissons gazeuses aromatisées, ...) ?

- Oui
- Non

b. À quelle fréquence consommez-vous des sodas naturels ?

- Une fois par jour
- Plusieurs fois par semaine
- Une fois par semaine
- Plusieurs fois par mois
- Une fois par mois
- Une fois par trimestre
- Jamais

c. Avez-vous déjà entendu parler de boissons fermentées (boisson sucrée (jus de fruits, tisane adoucie au sirop, miel ou sucre) qui a été transformé par des microorganismes) ?

- Oui
- Non

d. Consommez-vous des boissons fermentées sans alcool ? (Kombucha, Kéfir, Jun, ...)

- Une fois par jour
- Plusieurs fois par semaine
- Une fois par semaine
- Plusieurs fois par mois
- Une fois par mois
- Une fois par trimestre
- Jamais

e. Si vous en consommez, de quel type de produit s'agit-il ?

.....  
.....

f. Fermentez-vous vos boissons vous-même ou les achetez-vous en magasin ?

.....  
.....

28. Concernant les échantillons de boissons fermentées naturelles à base de *Sobacha* (graines de sarrasin torréfiées provenant du Japon) goûtés lors de cette analyse sensorielle

a. Seriez-vous prêt à intégrer cette boisson naturelle dans vos habitudes de consommation de sodas ?

- Oui
- Non

b. Quelle quantité seriez-vous prêt à consommer ?

- Un verre à shot (4 cL)
- Un verre à eau (25 cL)
- Une cannette (33 cL)
- Une bouteille (50 cL)

c. À quel moment de la journée aimeriez-vous consommer la boisson ?

- Au petit-déjeuner
- Au cours de la matinée
- Au dîner
- Dans l'après-midi
- À l'apéritif
- Au souper

d. Avez-vous des commentaires et/ou suggestions à effectuer sur les boissons que vous avez goûtées lors de cette analyse sensorielle ?

.....

.....

.....

**Merci beaucoup pour votre participation. N'oubliez pas votre petit présent en partant ☺**

**À bientôt !**

### Annexe 3 : Formulaire distribué aux sujets participant au profil flash de l'étude

Juge 1

#### Analyse sensorielle

Profil Flash

**Consignes : Une biscotte et de l'eau sont mis à votre disposition dans le but de vous rincer la bouche entre chaque dégustation**

#### 1ère partie

Vous disposez de 8 échantillons de sodas naturels à déguster. Vérifiez que l'ordre de présentation des boissons est identique à celui présenté ci-contre.

646	306	299	11	151	33	547	265
-----	-----	-----	----	-----	----	-----	-----

Procédez à la dégustation des échantillons dans le sens de présentation de ceux-ci, en allant de gauche à droite. Pendant vos dégustations, identifiez les descripteurs sensoriels (odeur, goût, ...) vous permettant de distinguer les échantillons les uns des autres. Les descripteurs ne doivent pas être hédoniques (notions de plaisir, de satisfaction, ...) et visuels.

Une fois que vous avez goûté à tous les produits, libre à vous de les goûter à nouveau et ce, dans l'ordre de votre choix.

À tous moments vous pouvez prendre une pause et/ou rincer votre bouche au besoin.

***Lorsque vous avez fini, signalez-le à l'instructeur et patientez jusqu'à ce que tout le monde ait terminé avant de passer à la suite du test.***

#### 2ème partie

La deuxième étape du test consiste à mettre en commun tous les descripteurs de chacun des juges. Une fois tous les descripteurs explicités, il vous est possible de changer votre liste de descripteurs personnelle si vous le jugez nécessaire. Le but n'est pas d'obtenir un consensus mais d'aider les juges à trouver les justes termes reflétant leurs sensations, si nécessaire.

En effet, il vous est possible de :

- Ajouter des descripteurs à votre liste personnelle
- Remplacer un descripteur par un autre dans votre liste personnelle
- Ne rien modifier dans votre liste personnelle

***Une fois cette étape terminée, veuillez en informer l'organisateur afin qu'il vous apporte les échantillons pour la suite.***

#### 3ème partie

Une fois la révision de votre liste personnelle effectuée, vous pouvez désormais procéder au classement de chaque boisson en fonction de chaque descripteur de votre liste. Ainsi, prenez le 1er descripteur de votre liste et indiquez-le sur la feuille de réponse fournie et classez les produits du *moins intense* au *plus intense* comme présenté dans l'exemple ci-dessous. Plusieurs produits peuvent se situer au même niveau lors du classement.

Descripteur X						Juge X
-	X	X	X	X	X	+
					X	

N'hésitez pas à effectuer une pause et à rincer votre bouche entre deux descripteurs si nécessaire.  
*Une fois toute la totalité des classements effectués pour chacun de vos descripteurs, veuillez remettre vos formulaires de réponse à l'organisateur.*

Merci beaucoup pour votre participation ☺

**Annexe 4 : Données brutes se référant aux mesures de pH effectuées sur les expériences #2 et #3**

**Tableau additionnel 1.** Mesures de pH des échantillons #2.1 (/ =non mesuré)

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6
<b>J0</b>	3,90	4,72	4,50	4,22	4,49	4,43
<b>J1</b>	3,81	4,69	4,44	4,01	4,15	3,82
<b>J2</b>	/	/	4,15	3,62	3,62	3,58
<b>J3</b>	/	/	3,73	3,39	3,55	3,39
<b>J4</b>	3,64	3,84	/	3,35	/	/
<b>J5</b>	3,63	3,60	/	3,17	/	/
<b>J6</b>	3,60	3,70	3,32	3,10	3,08	3,19
<b>J7</b>	3,16	3,42	3,23	3,03	3,10	3,16

**Tableau additionnel 2.** Mesures de pH des échantillons #2.2 (/ =non mesuré)

	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5	Série 6
<b>J0</b>	3,86	4,82	5,14	5,72	4,73	4,77
<b>J1</b>	3,85	4,75	5,03	5,26	4,28	4,51
<b>J2</b>	/	/	4,73	4,58	3,83	4,08
<b>J3</b>	/	/	4,06	4,13	3,80	3,86
<b>J4</b>	3,65	4,06	/	4,02	/	/
<b>J5</b>	3,64	3,93	/	3,76	/	/
<b>J6</b>	3,55	3,85	3,64	3,68	3,35	3,42
<b>J7</b>	3,29	3,66	3,55	3,66	3,28	3,31

**Tableau additionnel 3.** Moyennes et écart-types des mesures de pH des échantillons #3 (n=3 ; / =non mesuré)

	#3.1		#3.2	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<b>J0</b>	4,00	0,01	3,91	0,04
<b>J1</b>	3,94	0,01	3,80	0,08
<b>J2</b>	3,78	0,03	3,63	0,09
<b>J3</b>	3,54	0,08	3,68	0,05
<b>J4</b>	/	/	/	/
<b>J5</b>	/	/	/	/
<b>J6</b>	3,04	0,03	3,03	0,03
<b>J7</b>	2,96	0,01	2,93	0,01
<b>J8</b>	2,94	0,01	2,88	0,03
<b>J9</b>	2,83	0,02	2,77	0,03

<b>J10</b>	2,90	0,01	2,82	0,03
<b>J25</b>	2,91	0,01	2,87	0,02

### Annexe 5 : Données brutes se référant aux dosages des molécules majoritaires par spectrophotométrie effectuées sur les expériences #2 et #3

**Tableau additionnel 4.** Dosages par spectrophotométrie des composés majoritaires effectués sur les échantillons #1 et #2 (/ =non mesuré)

		Sucres totaux (g/L)	Saccharose (g/L)	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Ethanol (g/L)	Acide acétique (g/L)
	<b>#1.1</b>	0,5	0,1	0	0,7	/	/
	<b>#1.2</b>	0,1	0,1	0	0	/	/
<b>#2.1</b>	<b>Série 1</b>	21,7	2,8	6,2	12,8	0,08	0,07
	<b>Série 2</b>	38,3	19,6	7,6	11,1	0	0,03
	<b>Série 3</b>	28,9	13,1	6,4	9,5	0,03	0,02
	<b>Série 4</b>	34,9	10,6	8,4	16	0,56	0,63
	<b>Série 5</b>	29,1	9,5	5,7	14	0,17	0,09
	<b>Série 5 Thé</b>	51,8	39,0	4,4	8,4	0	0,07
	<b>Série 6</b>	29,7	12,4	5,1	12,3	0	0
<b>#2.2</b>	<b>Série 1</b>	19,9	1,7	4,0	14,3	0	0,23
	<b>Série 2</b>	23,6	12,7	3,7	7,2	0,13	0,07
	<b>Série 3</b>	41,9	34,6	2,2	5,1	0	0
	<b>Série 4</b>	38,6	28,9	6,3	3,4	0,06	0,22
	<b>Série 5</b>	45,1	35,5	2,8	6,8	0,05	0,18
	<b>Série 5 Thé</b>	41,0	35,1	0,9	4,9	0,11	0,02
	<b>Série 6</b>	49,0	39,7	3,1	6,2	0	0,04

**Tableau additionnel 5.** Moyennes et écarts-type des dosages par spectrophotométrie des composés majoritaires effectués sur les échantillons #3 (n=3 ; / = non mesuré)

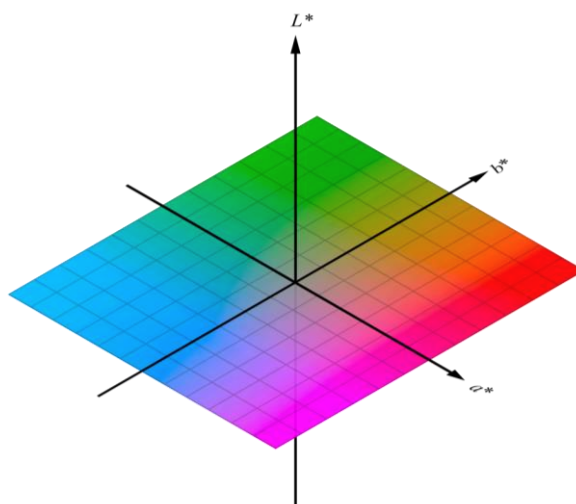
		#3.1		#3.2	
		Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<b>Glucose (g/L)</b>	<b>J0</b>	0,00	0,00	0,00	0,00
	<b>J1</b>	1,07	0,06	1,30	0,17
	<b>J2</b>	1,17	0,23	1,53	0,84
	<b>J3</b>	2,00	0,17	2,03	0,06
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/
	<b>J6</b>	2,17	1,02	2,37	0,65
	<b>J7</b>	1,17	0,31	1,53	0,49
	<b>J8</b>	5,27	2,51	3,27	3,02
	<b>J9</b>	3,23	0,55	2,80	1,56
	<b>J10</b>	5,00	0,52	3,50	0,85
	<b>J25</b>	7,50	3,36	5,43	1,50
<b>Fructose (g/L)</b>	<b>J0</b>	0,70	0,00	0,00	0,00
	<b>J1</b>	0,77	0,40	0,67	0,21
	<b>J2</b>	1,73	0,49	1,97	0,42
	<b>J3</b>	0,50	0,17	1,03	0,31
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/

	<b>J6</b>	6,00	0,61	4,60	1,78
	<b>J7</b>	7,27	2,29	5,67	1,14
	<b>J8</b>	8,57	5,33	7,43	0,95
	<b>J9</b>	7,13	1,59	5,57	1,08
	<b>J10</b>	7,90	1,75	4,20	0,36
	<b>J25</b>	16,53	3,07	14,03	0,55
<b>Saccharose (g/L)</b>	<b>J0</b>	0,10	0,00	0,10	0,00
	<b>J1</b>	61,17	2,21	51,50	9,40
	<b>J2</b>	62,47	4,25	59,63	2,12
	<b>J3</b>	59,63	4,69	59,80	4,49
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/
	<b>J6</b>	32,07	21,00	29,03	14,01
	<b>J7</b>	19,83	2,63	34,73	12,18
	<b>J8</b>	22,07	16,09	25,40	6,44
	<b>J9</b>	32,03	4,27	31,47	13,69
	<b>J10</b>	22,10	2,52	34,23	14,16
	<b>J25</b>	0,00	0,00	24,70	11,65
<b>Sucres totaux (g/L)</b>	<b>J0</b>	0,50	0,00	0,10	0,00
	<b>J1</b>	63,00	2,52	53,53	9,55
	<b>J2</b>	65,37	4,00	63,13	2,20
	<b>J3</b>	62,13	4,69	62,87	4,63
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/
	<b>J6</b>	40,23	22,45	36,00	11,70
	<b>J7</b>	28,27	4,25	41,93	13,00
	<b>J8</b>	35,90	10,61	36,10	9,27
	<b>J9</b>	42,40	5,57	39,83	13,48
	<b>J10</b>	35,00	3,76	41,93	13,46
	<b>J25</b>	18,77	4,30	44,17	11,63
<b>Ethanol (g/L)</b>	<b>J1</b>	0,10	0,03	0,10	0,04
	<b>J2</b>	0,30	0,04	0,30	0,02
	<b>J3</b>	0,30	0,01	0,30	0,01
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/
	<b>J6</b>	0,40	0,04	0,30	0,01
	<b>J7</b>	0,30	0,01	0,30	0,03
	<b>J8</b>	0,00	0,00	0,00	0,01
	<b>J9</b>	0,10	0,03	0,00	0,02
	<b>J10</b>	0,00	0,02	0,00	0,02
	<b>J25</b>	0,00	0,01	0,00	0,02
		<b>J1</b>	0,10	0,05	0,10
	<b>J2</b>	0,20	0,08	0,10	0,02
	<b>J3</b>	0,10	0,05	0,00	0,01
	<b>J4</b>	/	/	/	/
	<b>J5</b>	/	/	/	/



Acide acétique (g/L)	J6	0,00	0,03	0,00	0,05
	J7	0,40	0,00	0,40	0,03
	J8	0,30	0,03	0,30	0,02
	J9	0,30	0,11	0,40	0,19
	J10	0,50	0,09	0,50	0,04
	J25	0,30	0,04	0,40	0,11

**Annexe 6 : Données brutes des mesures de colorimétrie effectuées sur les expériences #2 et #3**



**Figure additionnelle 1.** Représentation de l'espace chromatique  $L^*a^*b^{*98}$

**Tableau additionnel 6.** Mesures de colorimétrie (dimension LAB) effectuées en 3 répétitions sur les échantillons de l'expérience #3 (n=3)

	Moyennes						Ecart-types					
	L*	a*	b*	L	a	b	L*	a*	b*	L	a	b
#3.1 J1	70,12	-1,11	1,06	63,97	-0,98	0,90	0,25	0,04	0,52	0,28	0,04	0,44
#3.1 J2	70,14	-1,15	1,14	64,00	-1,02	0,98	0,39	0,04	0,52	0,44	0,04	0,44
#3.1 J3	69,92	-1,10	0,84	63,74	-0,98	0,72	0,25	0,02	0,32	0,28	0,02	0,27
#3.1 J6	69,92	-1,11	0,84	63,74	-0,99	0,72	0,25	0,03	0,38	0,28	0,02	0,32
#3.1 J7	68,75	-1,29	3,09	62,45	-1,14	2,58	0,17	0,03	0,27	0,18	0,02	0,22
#3.1 J8	69,23	-1,25	2,59	62,98	-1,10	2,18	0,08	0,01	0,12	0,08	0,01	0,10
#3.1 J9	68,68	-1,40	3,47	62,37	-1,23	2,90	0,19	0,05	0,29	0,21	0,04	0,23
#3.1 J10	70,16	-1,08	0,35	64,02	-0,96	0,30	0,07	0,01	0,11	0,08	0,00	0,09
#3.1 J25	68,33	-1,60	5,83	61,98	-1,40	4,78	0,44	0,08	0,18	0,49	0,07	0,14
#3.2 J1	69,97	-1,08	1,25	63,81	-0,96	1,07	0,22	0,02	0,20	0,25	0,02	0,17
#3.2 J2	70,15	-1,07	0,46	64,01	-0,95	0,40	0,12	0,03	0,38	0,13	0,03	0,32
#3.2 J3	70,16	-1,04	0,40	64,02	-0,92	0,34	0,15	0,01	0,20	0,17	0,01	0,17
#3.2 J6	70,25	-1,03	0,12	64,12	-0,92	0,11	0,07	0,01	0,11	0,08	0,01	0,10
#3.2 J7	70,12	-1,05	0,40	63,98	-0,93	0,34	0,20	0,03	0,61	0,22	0,02	0,51
#3.2 J8	69,98	-1,09	1,04	63,81	-0,97	0,89	0,03	0,01	0,08	0,03	0,00	0,07
#3.2 J9	70,12	-1,06	0,61	63,97	-0,94	0,53	0,12	0,01	0,08	0,13	0,01	0,07
#3.2 J10	70,33	-1,04	0,06	64,20	-0,92	0,06	0,15	0,01	0,11	0,17	0,00	0,09

#3.2 J25	70,02	-1,20	2,41	63,86	-1,06	2,04	0,30	0,05	0,19	0,33	0,04	0,15
-------------	-------	-------	------	-------	-------	------	------	------	------	------	------	------

**Tableau additionnel 7.** Moyennes et écarts-types des mesures de colorimétrie (dimension LAB) effectuées sur les échantillons de l'expérience #2 (n=3)

	Moyennes						Ecart-types					
	L*	a*	b*	L	a	b	L*	a*	b*	L	a	b
#2.1 s1	67,64	-1,85	8,80	61,22	-1,62	7,03	0,02	0,01	0,14	0,01	0,01	0,10
#2.1 s2	68,09	-2,06	7,57	61,72	-1,80	6,12	0,04	0,01	0,14	0,05	0,00	0,10
#2.1 s3	69,22	-2,42	9,20	62,97	-2,12	7,40	0,03	0,01	0,02	0,03	0,02	0,01
#2.1 s4	67,27	-1,61	7,56	60,81	-1,40	6,07	0,39	0,04	0,34	0,42	0,03	0,24
#2.1 s5	67,41	-1,71	6,50	60,97	-1,49	5,26	0,16	0,01	0,18	0,18	0,01	0,13
#2.1 s5 thé	67,02	-1,62	10,10	60,55	-1,41	7,96	0,03	0,01	0,09	0,03	0,01	0,07
#2.1 s6	68,72	-1,68	5,10	62,42	-1,48	4,21	0,18	0,04	0,22	0,20	0,03	0,17
#2.2 s1	70,40	-1,38	4,51	64,28	-1,23	3,78	0,04	0,00	0,07	0,05	0,00	0,05
#2.2 s2	71,18	-1,38	2,27	65,16	-1,23	1,94	0,05	0,01	0,03	0,06	0,01	0,03
#2.2 s3	70,87	-1,42	1,86	64,81	-1,26	1,58	0,04	0,01	0,02	0,05	0,00	0,02
#2.2 s4	70,91	-1,24	1,60	64,86	-1,10	1,37	0,06	0,02	0,02	0,07	0,01	0,02
#2.2 s5	70,50	-1,22	1,87	64,39	-1,08	1,59	0,05	0,00	0,06	0,06	0,01	0,05
#2.2 s5 thé	68,29	-1,68	8,58	61,94	-1,47	6,89	0,08	0,02	0,07	0,08	0,02	0,05
#2.2 s6	70,74	-1,17	1,10	64,66	-1,04	0,95	0,07	0,01	0,03	0,08	0,01	0,02

## Annexe 7 : Données brutes d'identification des composés organiques volatils analysés par GC-MS

Tableau additionnel 8. Proportions (% aire sous la courbe) des COV identifiés dans les échantillons de l'expérience #3.1

Nom IUPAC et famille du composé organique volatil	Numéro CAS	#3.1 J1 T1	#3.1 J1 T2	#3.1 J1 T3	#3.1 J2 T1	#3.1 J2 T2	#3.1 J2 T3	#3.1 J3 T1	#3.1 J3 T2	#3.1 J3 T3	#3.1 J6 T1	#3.1 J6 T2	#3.1 J6 T3	#3.1 J7 T1	#3.1 J7 T2	#3.1 J7 T3	#3.1 J8 T1	#3.1 J8 T2	#3.1 J8 T3	#3.1 J9 T1	#3.1 J9 T2	#3.1 J9 T3	#3.1 J10 T1	#3.1 J10 T2	#3.1 J10 T3	#3.1 J25 T1	#3.1 J25 T2	#3.1 J25 T3	
Acide carboxylique		12,664	19,554	13,043	14,358	11,828	20,103	18,841	16,46	13,602	5,819	1,918	3,59	13,243	2,058	5,42	1,735	5,034	5,878	1,475	5,469	11,265	11,754	12,441	8,237	18,359	20,462	15,195	
(2S)-2-hydroxypropanoic acid	79-33-4	1,094																											
(2Z)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoic acid	4613-38-1	0,525								0,252																			
(E)-hexadec-9-enoic acid	2091-29-4								0,351																			0,598	
(Z)-hexadec-9-enoic acid	373-49-9							1,335																0,62		0,968	0,755		
(Z)-octadec-9-enoic acid	112-80-1							0,635												1,273							1,273		
2-oxopropanoic acid	127-17-3													1,137															
3-methylbutanoic acid	503-74-2									0,286																			
Acetic acid	64-19-7		3,572	1,692		0,836	0,979	0,531	2,309				0,481	0,792			1,663		0,342	1,509	0,97			0,541	1,303		3,01	4,81	0,523
Decanoic acid	334-48-5	2,58	5,385	3,45	1,658	3,907	6,135	3,444		1,085	1,823	1,481	1,221										4,117				0,951		
Dodecanoic acid	143-07-7						0,608																	0,551			0,444		
hexadecanoic acid	57-10-3	3,031	2,629	3,389	1,524	3,149	5,668	6,261	3,225	2,54	0,825	0,437	0,905	1,644	0,373	3,371	0,712		0,537	0,505			3,031	5,234	6,479	2,525	4,704	5,267	5,63
Hexanoic acid	142-62-1																												
Nonanoic acid	112-05-0	3,629	2,747	2,652	4,807	3,01	3,063	3,616	1,967	3,366	2,604		0,983	4,128	0,548					2,089			3,351	3,468					4,04
Octadecanoic acid	57-11-4															0,457						1,176			0,845				1,176
Octanoic acid	124-07-2		3,73		5,827					6,78	4,784	0,567			6,679			0,964	3,492	1,743		3,02				4,715	6,33	4,59	

Pentadecanoic acid	1002-84-2	0,5 81	0,3 82	0,5 77			1,0 74	1,0 34	0,5 66	0,4 2												0,8 46	0,9 57		0,8 3	1,1 14	1,1 59	
Pentanoic acid	109-52-4																											
Tetradecanoic acid	544-63-8	1,2 24	1,1 09	1,2 83	0,5 42	0,9 26	2,5 76	1,9 85	1,2 62	0,8 69												0,7 66	1,6 65	1,6 86	1,0 22	1,5 66	2,2 09	2,0 69
Alcool		11, 36	11, 012	7,4 4	12, 213	5,9 41	6,5 09	5,9 82	8,7 24	11, 747	4,5 23	1,5 7	6,1 61	4,4 39	5,2 19	3,5 38	5,5 78	4,3 1	3,1 24	2,9 25	2,7 5	17, 504	15, 221	22, 352	16, 666	5,4 75	5,8 79	19, 103
(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dien-1-ol	106-24-1																									0,5 29		
(2E,6E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-ol	29548-30-9																									0,3 83		
(2R,3S,4S,5R,6S)-2-(hydroxymethyl)-6-phenoxyoxane-3,4,5-triol	1464-44-4		1,9 88																									
(6E)-3,7,11-trimethyldodeca-1,6,10-trien-3-ol	40716-66-3																									0,9 28	0,8 87	0,8 49
(E)-dec-2-en-1-ol	18409-18-2												0,4 04															
2-(4-methylcyclohex-3-en-1-yl)propan-2-ol	98-55-5		1,0 62				0,3 12		0,3 41	0,2 94						2,0 17						0,5 56						
2-[(1S)-4-methylcyclohex-3-en-1-yl]propan-2-ol	10482-56-1	0,5			0,3 2								0,5 56														0,6 16	
2-ethylhexan-1-ol	104-76-7	0,3 72	0,5 6	0,4 64	0,4 75		0,4 63	0,6 21	0,6 05	0,5 62	0,4 42		0,5 05	0,4 24	0,4 9	0,3 52	0,4		0,4 77	0,4 77		0,7 9	0,7 74	0,7 13	0,6 23	0,7 96	0,7 07	1,1 89
2-nitroethanol	625-48-9																	1,2 04										
2-phenylethanol	60-12-8	4,4 85			4,1 71					4,9 75												7,5 08	7,0 67	10, 317	8,7 28		2,4 81	8,8 41
3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	78-70-6	1,0 97	1,5 86	0,8 64	1,0 94	1,0 32	0,8 54	0,7 92	1,1 1	0,9 36	0,5 38		0,5 39	0,4 41	0,9 87	0,3 55		0,3 8	0,3 05			0,9 88	0,7 36	1,1 99	0,5 89		0,8 92	0,9 86
furan-2-ylmethanol	98-00-0																0,6 46								0,7 17			
heptan-1-ol	111-70-6	4,9 06	5,8 16	6,1 12	5,3 38	4,9 09	4,8 8	4,5 69	6,6 68	4,9 8	3,5 43	1,5 7	4,5 61	3,1 7	3,7 42	2,8 31	2,5 15	2,7 26	2,3 42	2,4 48	2,7 5	7,6 62	6,6 44	10, 123	6,0 09	3,7 51		6,0 81





[2,2,4-trimethyl-3-(2-methylpropanoyloxy)pentyl] 2-methylpropanoate	6846-50-0	1,6 87	2,3 37	1,0 98	2,8 99	2,4 36	2,3 81	2,6 85	3,0 82	2,3 74	2,3 63	2,2 22	3,2 4	3,5 1	1,8 44	2,3 2	2,0 19	2,6 2	2,4 63	2,3	2,9 12	4,1 92	3,5 42	3,7 17	3,6 38	8,9 58	3,4 48	3,3 51	
1,3-di(octanoyloxy)propan-2-yl decanoate	33368-87-5	1,0 61	1,2 59	1,8 34	0,5 81	2,6 92	1,9 1	1,4 11	1,6 63	1,0 66															0,5 11	2,5 39	0,8 23		
2,3-di(octanoyloxy)propyl octanoate	538-23-8	0,7 61	0,8 06	1,3 88	0,3 32	2,0 29	1,3 8	0,8 58	1,3 79	0,7 47																	1,9 87		
2,3-diacetyloxypropyl acetate	102-76-1	0,4 67	0,6 08	0,4 47	0,4 71		0,4 74	0,4 69	0,5 48	0,4 97																			
2-methylbutyl dodecanoate	93815-53-3			0,4 59			0,5 99	0,4 6	0,4 99																		0,3 14		
2-phenylethyl acetate	103-45-7	0,7 17	1,0 67	0,5 96	1,0 84	0,6 86	0,7 75	5,0 31	4,3 75	2,8 19				3,1 45								1,0 18	2,6 71	0,9 68	1,0 81	2,7 67	2,5 2,5	1,9 61	
3-methylbutyl 6-chlorohexanoate	80418-54-8																										4,4 43		
3-methylbutyl acetate	123-92-2																											0,8 13	
3-methylbutyl dodecanoate	6309-51-9	1,1 85	1,3 45	2,0 12	0,6 26	1,7 02	2,6 72	2,0 01	2,2 3	1,0 06																0,9 79	1,5 36	1,6 77	
acetyl acetate	108-24-7								0,7 07																				
bis(2-ethylhexyl)benzene-1,2-dicarboxylate	117-81-7							0,3 67																			0,3 43		
bis(2-ethylhexyl)benzene-1,4-dicarboxylate	6422-86-2						0,3 71																						
diethylbenzene-1,2-dicarboxylate	84-66-2													0,6 87	0,5 3	0,4 53	0,5 82	0,5 9											
ethyl 2-phenylacetate	101-97-3																										0,4 76	0,4 75	
ethyl octanoate	106-32-1										0,7 03	0,9 86	0,7 72	3,0 68	1,3 98	0,8 23	4,2 79	4,7 67	3,6 94	4,2 62	2,7 65	0,6 39	2,6 37	0,9 42	5,9 69	6,6 74	3,4 97	0,9 36	
methyl (Z)-N-hydroxybenzenecarboximidate	10002-22-86-6		1,2 88	0,7 9		1,4 49	0,7 5	2,7 38						0,6 69	1,7 17	0,8 71	0,6 48	0,7 51	0,9 5	1,4 04		0,5 82			0,8 62		1,4 09		

octan-2-yl hexadecanoate	55194 -81-5	0,6 66	0,6 26	0,9 22		0,8 35	0,8 88	0,7 45	1,1 57	0,5 52																			1,1 56	0,6 73
octyl octadecanoate	109- 36-4	0,4 01	0,5 28	0,7 47		0,9 36	0,4 68	0,4 19	0,9 65	0,4 61																		1,0 17	0,5 05	
propan-2-yl hexadecanoate	142- 91-6																		0,5 74									0,5 74		
tetradecyl tetradecanoate	3234- 85-3																				0,5 02									
Ether											0,5 97																			
5-hexadecoxy- 2-pentadecyl-1,3- dioxane	34315 -34-9										0,5 97																			
Nitrile						0,7 89																								
(2E)-2- pyrrolidin-2- ylideneacetonitril e	11862 42-37- 4																													
Phénol		2,1 62	1,8 79	1,2 44	2,6 68	0,9 91	1,1 28	2,7 43	3,0 19	2,9 06	2,1 65	0,4 87	1,4 22	3,5 87		1,5 24	3,3 29	3,8 99	0,6 78	0,3 69	6,5 93	5,0 54	7,0 81	5,6 91	9,5 49	6,4 93	4,5 11	4,8 61		
2,4-ditert- butylphenol	96-76- 4	0,3 33	0,6 22		0,5 45			0,3 73	0,4 22	0,3 3		0,4 87	0,3 75	0,4 26					0,3 21	0,3 69		0,5 06	0,5 73	0,5 74	0,4 87					
2-methoxy-4- [(E)-prop-1- enyl]phenol	5932- 68-3	0,8 09			0,7 46						0,4 1										0,3 57		0,4 44		0,7 27					
2-methoxy-4- propylphenol	2785- 87-7																						2,5 04	3,2 9			0,4 58	0,7 64		
2-methoxy-5- [(E)-prop-1- enyl]phenol	19784 -98-6		0,5 54	0,6 63			0,6 92	0,7 37	0,7 87	0,6 69			0,4 05	0,5 52					0,3 42				0,7 19	0,5 92		0,7 05				
4-ethyl-2- methoxyphenol	2785- 89-9	1,0 2	0,7 03	0,5 81	1,3 77	0,9 91	0,4 36	1,6 33	1,8 1	1,9 07	1,7 55		0,6 42	2,6 09		1,5 24	2,9 04	3,5 57			6,5 93	3,3 85	3,4 12		1,1	7,7 18	6,4 93	4,0 53	4,0 97	
4-ethylphenol	123- 07-9																	0,4 25								0,6 39				
Purine		0,3 87																												
6-ethoxy-7H- purine	1 7861- 06-2	0,3 87																												
Pyrazine		25, 025	11, 32	20, 47	24, 341	15, 52	12, 127	7,1 57	9,5 17	22, 158	3,3 53	1,9 13	1,9 58	0,3 68	2,8 17		3,1 65		0,4 21			9,6 28	4,6 09	2,5 32	7,0 03	1,0 01	2,1 48	2,9 31		
2,5- diethylpyrazine	13238 -84-1									0,5 02	0,3 48												0,5 02					0,5 89		
2,5-dimethyl-3- (2-	32736 -94-0		0,4 35																											

















Pyrazine				3,1 76		1,8 59		2,5 95		2,5 06				0,7 06	0,8 35	4,4 78	0,6 66	0,9 79	0,4 21		5,3 05	1,5 66	1,7 89					
2,3- diethylpyrazine	1570 7- 24-1							0,3 72																				
2,5-dimethyl-3- propylpyrazine	1843 3- 97-1			1,6 58		1,8 59																						
2,5- dimethylpyrazin e	123- 32-0							0,4 34																				
2,6- diethylpyrazine	1306 7- 27-1									1,9 25					1,4 5	0,6 66	0,9 79	0,4 21						0,6 75				
2-ethyl-5- methylpyrazine	1336 0- 64-0														1,2 98													
2-ethylpyrazine	1392 5- 00-3			0,9 24				0,8 24						0,7 06								0,7 2	1,1 14					
2-methyl-6-(3- methylbutyl)pyr azine	9101 0- 41-2			0,5 94											0,8 35						0,5 27	0,8 46						
2- methylpyrazine	109- 08-0							0,5 89								1,7 3												
3,5-diethyl-2- methylpyrazine	1813 8- 05-1							0,3 76		0,5 81																		
Stéroïde				0,9 98					1,4 77	0,9 62							0,6 3	0,7 53			1,7 18	1,2 29	1,6 55	0,5 71		0,8 6	1,3 44	
(3S,8S,9S,10R,1 3R,14S,17R)- 10,13-dimethyl- 17-[(2R)-6- methylheptan-2- yl]- 2,3,4,7,8,9,11,12 ,14,15,16,17- dodecahydro- 1H- cyclopenta[a]phe nanthren-3-ol	57- 88-5																				0,8 23	0,6 41	0,5 73				0,7 84	
2,6,10,15,19,23- hexamethyltetrac osane	111- 01-3			0,9 98				1,4 77	0,9 62							0,6 3	0,7 53				0,8 95	0,5 88	1,0 82	0,5 71		0,8 6	0,5 76	



Terpène		3,5 2		6,2 93	18, 077	18, 233	21, 857	2,2 01	4,4 91	3,9 14	1,7 62	2,5 42	1,4 36	1,6 8	3,6 12	3,8 75	5,5 49	6,0 17	0,3 77	4,6 17	5,8 97	4,8 6	7,4 74	2,9 31	31, 539	3,3 94	9,6 78	5,8 95
(6E,10E,14E,18E)- 2,6,10,15,19,23- hexamethyltetrac osa- 2,6,10,14,18,22- hexaene	111- 02-4	3,5 2		6,2 93	18, 077	18, 233	21, 857	2,2 01	4,4 91	3,9 14	1,7 62	2,5 42	1,4 36	1,6 8	3,6 12	3,8 75	5,5 49	6,0 17	0,3 77	4,6 17	5,8 97	4,8 6	7,4 74	2,9 31	31, 539	3,3 94	9,6 78	5,8 95

## Annexe 8 : Données brutes relatant des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires

**Tableau additionnel 10.** Moyennes et écarts-types des mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des échantillons de l'expérience #1 et #3 (n=3 ; / =non mesuré)

		Moyenne	Ecart-type
#1.1	J0	51,33	0,00
#3.1	J1	89,23	4,99
	J2	80,75	4,93
	J3	80,44	0,16
	J4	/	/
	J5	/	/
	J6	72,62	0,23
	J7	78,88	0,27
	J8	64,88	0,03
	J9	80,48	4,58
	J10	88,82	4,49
	J25	73,62	0,21
#1.2	J0	77,01	3,31
#3.1	J1	59,85	4,03
	J2	62,71	4,52
	J3	52,55	3,74
	J4	/	/
	J5	/	/
	J6	72,62	4,68
	J7	63,28	3,90
	J8	62,92	3,24
	J9	55,93	1,21
	J10	65,18	1,02
	J25	65,91	11,29

**Tableau additionnel 11.** Mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des échantillons de l'expérience #2

	#2.1	#2.2
Série 1	43,63	13,01
Série 2	57,06	19,86
Série 3	34,23	3,31
Série 4	50,00	73,50
Série 5	51,01	45,32
Série 5 Thé	76,57	63,50
Série 6	10,43	17,81

**Tableau additionnel 12.** Mesures des activités anti-oxydantes (%I DPPH) des standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL)

Concentration (mg/mL)	% I (DPPH) Trolox	% I (DPPH) Acide ascorbique
0,01	86,60	86,06
0,1	86,86	86,60

0,2	87,13	87,13
-----	-------	-------

**Tableau additionnel 13.** Moyennes et écarts-types des mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des échantillons de l'expérience #1 et #3 (n=3 ; / =non mesuré)

		Moyenne	Ecart-type
<b>#1.1</b>	<b>J0</b>	15,33	0,00
<b>#3.1</b>	<b>J1</b>	61,75	0,14
	<b>J2</b>	57,08	6,29
	<b>J3</b>	55,79	5,57
	<b>J4</b>	/	/
	<b>J5</b>	/	/
	<b>J6</b>	46,78	5,67
	<b>J7</b>	59,69	4,47
	<b>J8</b>	62,66	5,02
	<b>J9</b>	62,95	4,58
	<b>J10</b>	57,66	7,59
	<b>J25</b>	67,04	8,37
<b>#1.2</b>	<b>J0</b>	1,69	0,00
<b>#3.1</b>	<b>J1</b>	42,97	8,49
	<b>J2</b>	51,22	3,78
	<b>J3</b>	27,93	2,53
	<b>J4</b>	/	/
	<b>J5</b>	/	/
	<b>J6</b>	5,88	2,74
	<b>J7</b>	40,61	4,24
	<b>J8</b>	47,07	18,59
	<b>J9</b>	51,09	14,25
	<b>J10</b>	43,96	7,99
	<b>J25</b>	44,83	11,50

**Tableau additionnel 14.** Mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des échantillons de l'expérience #2

	<b>#2.1</b>	<b>#2.2</b>
Série 1	58,17	40,77
Série 2	54,62	21,08
Série 3	53,58	1,18
Série 4	64,95	35,33
Série 5	59,25	7,30
Série 5 Thé	73,54	46,32
Série 6	55,76	55,76

**Tableau additionnel 15.** Mesures des activités anti-inflammatoires (%I COX-2) des standards positifs en fonction de leur concentration (mg/mL)

<b>Concentration (mg/mL)</b>	<b>%I (COX-2) quercétine</b>	<b>%I (COX-2) rutine</b>
0,1	63,71	65,00
0,05	31,97	50,59
0,01	1,36	37,82