

RÉSUMÉ

LES RECHERCHES SUR LA DYNAMIQUE DES POPULATIONS MICROBIENNES DANS LES PROCESSUS DE FERMENTATION

Doctorant: VRĂJMAȘU Virgiliu Valeriu

Coordinateur scientifique: *Prof. univ. dr. MATEI Florentina*

MOTS-CLÉS: techniques moléculaires, fermentation alimentaire, qPCR, *Lactobacillus*, *Hanseniospora*

La recherche fait l'objet de la thèse de doctorat intitulée « RECHERCHE SUR LA DYNAMIQUE DE CERTAINES POPULATIONS MICROBIENNES À TRAVERS LES PROCESSUS FERMENTAUX » au sein de l'École Doctorale « Ingénierie et Gestion des Ressources Végétales et Animales » de l'USAMV de Bucarest.

La fermentation est un processus métabolique par lequel un organisme convertit un glucide, tel que l'amidon ou le saccharose, en alcool ou acide. Par exemple, la levure transforme le sucre en alcool grâce au processus de fermentation. Les bactéries lactiques transforment les glucides en acide lactique par fermentation. Ce processus est utilisé pour fabriquer du vin, de la bière, du yaourt et d'autres produits.

La fermentation est un processus naturel. Les humains utilisaient le processus de fermentation pour produire des produits tels que le vin, le fromage et la bière bien avant que le processus biochimique ne soit compris. En 1850, Louis Pasteur est devenu le premier scientifique à étudier la fermentation lorsqu'il a été démontré qu'elle était provoquée par des cellules vivantes. Les processus de fermentation les plus importants sont : la fermentation alcoolique, la fermentation lactique et la fermentation acétique. Lors de la fermentation alcoolique, les levures et certaines bactéries effectuent la fermentation des glucides, processus par lequel l'acide pyruvique est décomposé en éthanol et en dioxyde de carbone ; ce procédé est spécifique à la production de pain, de vin ou de bière. Lors de la fermentation lactique, le lactose est transformé par l'acide pyruvique en acide lactique. Ce type de fermentation est utilisé pour la production de fromages et de produits laitiers. La fermentation acétique est un autre type de fermentation et est produite par des bactéries acétiques et, comme produit intermédiaire, donne de l'acide acétique. Grâce à la fermentation acétique du vin, nous obtenons du vinaigre. La fermentation acétique est également utilisée pour conserver les cornichons. Bien qu'il s'agisse d'une fermentation, elle s'effectue en présence d'oxygène.

Lors de ces fermentations, qui se déroulent sur des sources naturelles de glucides (raisins, lait, céréales, etc.), la biodiversité et les niveaux microbiens sont en constante évolution. Afin d'obtenir le meilleur produit final, il est important de réaliser un processus de fermentation optimal, dans lequel les micro-organismes impliqués jouent un rôle important.

Pour caractériser la biodiversité microbienne de la fermentation, l'approche est complexe et des méthodes phénotypiques et génotypiques doivent être prises en compte et une corrélation entre les résultats de ces méthodes doit être établie. Dans le contexte où les procédés de fermentation sont des procédés fondamentaux pour l'obtention d'aliments, y compris fonctionnels, l'utilisation de techniques modernes de suivi des populations microbiennes au cours de ces procédés est devenue une nécessité, voire une obligation.

Les expériences ont été réalisées dans deux sites principaux, à savoir au laboratoire de microbiologie appliquée de la Faculté de biotechnologie de l'USAMV Bucarest et au laboratoire de diagnostic moléculaire de Vetwork Diagnostics à Tulcea, qui fournit des services de laboratoire dans le domaine de la santé animale et de la sécurité alimentaire.

Les objectifs spécifiques étaient les suivants :

1. Méthodes de qPCR visant à quantifier la population de bactéries lactiques et de bactéries acétiques dans le produit fermenté du Kombucha
2. Déterminez une méthode qPCR pour la population quantitative totale de *Hanseniospora* versus *Saccharomyces* dans le cadre du processus de vinification
3. Détecter la zone et la population quantitative viables d'une ou de certaines espèces de *Saccharomyces* et de *non-Saccharomyces* dans le processus de vinification selon la technique qPCR

La thèse est structurée en deux parties principales : la partie documentation et la partie recherche propre, qui ont été présentées en 6 chapitres, auxquels ont été ajoutés l'introduction, le résumé, les conclusions et recommandations générales et la bibliographie.

La première partie de l'ouvrage contient 2 chapitres.

Dans le premier chapitre, une synthèse de la littérature spécialisée a été réalisée concernant les principales fermentations d'intérêt alimentaire, en mettant l'accent sur la dynamique microbienne dans le processus de fermentation alcoolique en vinification et la dynamique microbienne dans les boissons de type Kombucha, produits qui ont été repris dans la partie expérimentale. .

Dans le deuxième chapitre, les principales méthodes de surveillance des populations microbiennes au cours des processus microbiens ont été passées en revue, en mettant l'accent sur les méthodes moléculaires, notamment la technique qPCR.

La deuxième partie de la thèse de doctorat comprend 4 chapitres qui décrivent les propres recherches expérimentales.

Dans le chapitre III, le développement de la méthodologie qPCR pour quantifier la population de bactéries lactiques et acétiques dans les produits fermentés de type Kombucha a été poursuivi. Le but des expériences était d'obtenir un produit complexe, comprenant divers composés bénéfiques pour la santé, en faisant fermenter le pollen récolté sur les abeilles avec un consortium Kombucha. Au cours du processus de macération-fermentation du pollen avec le Kombucha, les niveaux de populations de bactéries lactiques (LAB) et de bactéries acétiques ont été déterminés par des techniques classiques et moléculaires, par rapport aux niveaux de ces groupes de bactéries dans le produit fermenté du Kombucha. En ajoutant du pollen en début de fermentation, le niveau initial de LAB augmente de près de deux unités logarithmiques, jusqu'à 10^7 UFC/ml. Cette augmentation importante de la population de LAB est due à la teneur en LAB du pollen très probablement de *Lactobacillus* sp. espèces présentes dans l'estomac des abeilles. Ainsi, il a été prouvé que l'ajout de pollen augmente les propriétés probiotiques du produit final. Au niveau du laboratoire, un niveau inférieur a été observé (10^7 CFU/ml) à celui résultant des études pilotes de 100 L (10^9 CFU/ml). Ainsi, les installations de fermentation à haut débit améliorent l'effet pollinique de la croissance de la population microbienne LAB. Concernant les bactéries acétiques, leur taux initial diffère d'une unité logarithmique dans le cas de l'ajout de pollen (10^3 cellules/mL dans le Kombucha sans pollen et 10^4 cellules/mL dans le Kombucha avec pollen), mais en fin de macération-fermentation le taux se stabilise en les deux tombent à 10^6 cellules/mL. Techniquement, il a été démontré que la qPCR est une technique réalisable pour quantifier la charge totale de bactéries lactiques et acétiques dans le Kombucha. De plus, au cours des expériences, la technique qPCR a été utilisée avec succès et peut être utilisée pour évaluer la teneur en pollen des bactéries lactiques.

Au chapitre IV, l'étude a proposé le développement d'une méthode moléculaire pour la quantification des populations de *Hanseniospora* et de *Saccharomyces* au cours du processus de vinification, après l'ajout initial de cultures starter sélectionnées. Des amorces spécifiques et la sonde SYBR Green ont été utilisées pour la méthode qPCR en temps réel et des dilutions d'une souche de référence du genre *Hanseniospora* et *Saccharomyces* ont été utilisées pour la courbe d'étalonnage. Une fois la méthode développée, elle a été utilisée pour étudier différents échantillons de moûts de raisin et de vin, suite à une fermentation naturelle ou contrôlée avec des souches de levures commerciales.

Pour la courbe étalon, un très bon coefficient de corrélation a été obtenu, respectivement $R^2 = 0,9927$ et une valeur de RSDr = 0,25 %. La limite de détection a montré la nécessité d'un Ct maximum égal à 32 pour une

réaction positive avec SYBR-Green. La valeur d'efficacité d'amplification était de 90% pour cette réaction qPCR, répondant aux critères de validation avec un R^2 supérieur à 0,98 et une pente comprise entre -3,1 et -3,6.

Dans tous les échantillons de vin analysés, des valeurs presque similaires ont été obtenues pour la population *Hanseniospora*, les échantillons de moût de raisin avaient une concentration initiale plus élevée que les vins et les échantillons de moût contenant des sulfites enregistraient les concentrations les plus élevées. Dans le cas des échantillons de moût, la concentration des populations de *Hanseniospora* était supérieure à celle des populations de *Saccharomyces* dans les phases initiale et finale de fermentation, étant dépassée pendant la période de fermentation. Nos résultats sont conformes à d'autres rapports et soutiennent l'idée selon laquelle la qPCR est une technique rapide, directe (non cultivable), sensible et fiable pour quantifier le nombre total de cellules de différentes espèces de levures.

Le chapitre V visait à développer une méthode pour quantifier les populations viables de certaines espèces de *Saccharomyces* et *non-Saccharomyces* en utilisant le monoazide de propidium (PMA), un composé chimique capable de pénétrer dans les cellules membranaires ou mortes et de se lier de manière covalente à l'acide nucléique après photoactivation. Il a été proposé de développer une méthode de quantification pour les espèces *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii* et *Wickerhamomyces anomalus*, en maintenant comme élément central la levure *S.cerevisiae*. Compte tenu du fait que, du point de vue métabolique, les cellules viables sont importantes, car elles conduisent à différentes caractéristiques organoleptiques du vin, il a été proposé cette fois de quantifier les cellules viables de ces espèces. Au cours des tests, une légère diminution de la viabilité a été observée après le traitement des cellules viables au PMA.

Les pentes des courbes étalons étaient presque similaires, ce qui correspondait à des rendements d'amplification compris entre 91,17 % et 95,98 %, mettant en évidence une relation linéaire (R^2) entre 0,9908 et 0,9959.

La limite de détection variait de 38 fg/ μ L à 49 fg/ μ L, ce qui correspond à des limites de quantification de 70 CFU/mL à $1,03 \times 10^2$ CFU/mL. Dans le cas de *W. anomalus*, les limites de détection et de quantification sont trop élevées et nécessitent une optimisation supplémentaire.

Suite au processus d'optimisation, nous avons constaté que l'application de PMA-qPCR à des échantillons de vin pouvait produire des résultats en un jour ouvrable, présentant ainsi un grand avantage par rapport aux 5 à 7 jours requis pour obtenir les résultats des méthodes de culture conventionnelles.