

PASCAL DAIGLE

**PRODUCTION DE COMPOSÉS AROMATIQUES PAR *Geotrichum candidum*
À PARTIR DE SOUS-PRODUITS DE BOULANGERIE**

**Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**Département des sciences des aliments et de nutrition
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL**

Août 1998



**National Library
of Canada**

**Acquisitions and
Bibliographic Services**

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

**Bibliothèque nationale
du Canada**

**Acquisitions et
services bibliographiques**

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-33608-5

RÉSUMÉ

Huit souches de levures (5 commerciales destinées à la fabrication fromagère et 3 de l'ATCC) ont été évaluées selon leur capacité à produire des arômes agréables lors de la fermentation de deux sous-produits de boulangerie (pains blancs broyés et brioches broyées). Un arôme fruité agréable produit par la souche de *Geotrichum candidum* ATCC 62217 sur le milieu à base de pain blanc a été caractérisé du point de vue des composés aromatiques volatils et des acides organiques qui le composent. Neuf esters d'acide gras (éthylrique, propylique), six acides organiques, quatre alcools et un acide gras présents dans un ferment de 48 heures ont été identifiés. Des essais d'optimisation de la production d'arôme fruité ont démontré que l'agitation est un paramètre essentiel à la production de composés aromatiques volatils alors que la température a un effet limité.

À mes parents

AVANT-PROPOS

Je désire en premier lieu remercier mon directeur de recherche, le Dr Pierre Gélinas du Centre de recherche et de développement sur les aliments (CRDA). Il fut un directeur consciencieux, je lui suis reconnaissant pour sa confiance, son soutien, sa disponibilité, et ses conseils. La réalisation de ce projet de recherche sous sa direction m'a permis de développer mes aptitudes pour la recherche et mon esprit scientifique.

Je remercie également le Dr Jacques Goulet du département de sciences des aliments et de nutrition de l'Université Laval pour avoir accepté de co-diriger ce mémoire.

Je me dois aussi de remercier les gens du CRDA, en particulier le personnel de la section technologie de conservation. Je désire aussi remercier Carole McKinnon et Élyse Poitras que j'ai côtoyées sur une base quotidienne et qui ont collaboré et contribué à mon projet de recherche. Un grand merci également au Dr André Morin et à son équipe, spécialement à Danielle Leblanc, pour leur soutien technique, les discussions enrichissantes et les idées que nous avons échangées.

Je veux remercier ma famille, ma copine Annie et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements. C'est beaucoup grâce à leur support que j'ai pu poursuivre mes études.

Finalement, je remercie mes ami(e)s du CRDA; Marylène, Julie, Christine, les deux Denis, Laurent, Claude, Miguel et tous les autres qui ont rendu mon séjour à St-Hyacinthe plus agréable.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
AVANT-PROPOS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	vii
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. SÉLECTION DES SOUCHES DE LEVURES ET DES MILIEUX DE FERMENTATION	9
1.1 Résumé	9
1.2 Introduction	10
1.3 Matériel et méthodes	12
1.3.1 Microorganismes	12
1.3.2 Conservation des microorganismes	12
1.3.3 Préparation des inocula	12
1.3.3.1 Cultures commerciales	12
1.3.3.2 Souches ATCC	12
1.3.4 Sous-produits de boulangerie	13
1.3.5 Fermentations	13
1.3.6 Arôme des ferments	14
1.3.7 Acidité titrable totale	14
1.3.8 Détermination des protéines totales	14
1.3.9 Détermination des gras totaux et du poids sec	14
1.3.10 Détermination de la teneur en sel	15
1.3.11 Détermination de l'Aw	15
1.3.12 Analyses microbiologiques	15
1.3.13 Analyse des sucres	15
1.4 Résultats et discussion	17
1.4.1 Analyse des sous-produits de boulangerie	17
1.4.2 Évaluation des souches de levures	18
1.4.2.1 Arômes des milieux fermentés	18
1.4.2.2 Acidité titrable des milieux fermentés	19
1.5 Conclusion	24

CHAPITRE 2. CARACTÉRISATION DE L'ARÔME FRUITÉ PRODUIT PAR <i>Geotrichum candidum</i>	25
2.1 Résumé	25
2.2 Introduction	26
2.3 Matériel et méthodes	28
2.3.1 Microorganismes	28
2.3.2 Fermentations	28
2.3.3 Analyse des composés volatils	28
2.3.3.1 Analyse par échantillonnage de l'espace de tête (Headspace)	28
2.3.3.2 Analyse par condensation des composés volatils sur un piège froid (Cold Finger)	29
2.3.3.3 Analyse par piégeage des composés volatils sur une cartouche d'extraction en phase solide	29
2.3.3.4 Analyse par GC/MS	29
2.3.3.5 Analyse par GC/FID	30
2.3.3.6 Identification des composés	30
2.3.4 Analyse des acides organiques	30
2.3.5 Détermination de l'activité lipolytique	31
2.3.5.1 Milieu de culture pour la production de lipases	31
2.3.5.2 Production de lipases	31
2.3.5.3 Essais enzymatiques	32
2.3.6 Courbe de croissance	32
2.4 Résultats et discussion	33
2.4.1 Composés aromatiques volatils	33
2.4.2 Profil des acides organiques	34
2.4.3 Activité lipolytique	35
2.4.4 Croissance de <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217	36
2.5 Conclusion	43
CHAPITRE 3. OPTIMISATION DE QUELQUES CONDITIONS DE FERMENTATION PAR <i>Geotrichum candidum</i>	44
3.1 Résumé	44
3.2 Introduction	45
3.3 Matériel et méthodes	47
3.3.1 Microorganismes	47
3.3.2 Fermentations	47
3.3.3 Analyse par piégeage des composés volatils sur une cartouche d'extraction en phase solide	48
3.3.4 Analyse par GC/FID	48

3.3.5	Analyse des acides organiques	48
3.3.6	Courbes de croissance	49
3.4	Résultats et discussion	50
3.4.1	Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la production de composés aromatiques volatils	50
3.4.2	Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur le profil des acides organiques	51
3.4.3	Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la croissance de <i>Geotrichum candidum</i> ATCC62217	53
3.5	Conclusion	59
	CONCLUSION GÉNÉRALE	60
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau 1.1 : Analyse des sous-produits de boulangerie	21
Tableau 1.2 : Effet du type de microorganisme et du sous-produit de boulangerie sur l'arôme des milieux fermentés après 48 heures de fermentation à 30°C et 300 cycles par minute	22
Tableau 2.1 : Composés aromatiques identifiés par analyse de l'espace de tête (Headspace) d'un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté par <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 pendant 48 heures à 30 °C et 300 cycles par minute	37
Tableau 2.2 : Composés aromatiques identifiés par analyse sur piège froid (Coldfinger) d'un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté par <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 pendant 48 heures à 30 °C et 300 cycles par minute	38
Tableau 2.3 : Composés aromatiques identifiés par analyse sur cartouche d'extraction en phase solide d'un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté par <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 pendant 48 heures à 30 °C et 300 cycles par minute	39
Tableau 2.4 : Profil de six acides organiques dans un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés avant (T=0 heure) et après (T=48 heures) fermentation avec <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 à 30°C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute	40
Tableau 3.1 : Profil de six acides organiques en fonction du temps dans un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté avec <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 à 30°C avec (300 cycles par minute) ou sans (0 cycle par minute) agitation ...	55
Tableau 3.2 : Profil de six acides organiques en fonction du temps dans un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté avec <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 à 25°C avec (300 cycles par minute) ou sans (0 cycle par minute) agitation ...	56
Tableau 3.3 : Profil de six acides organiques en fonction du temps dans un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés, fermenté avec <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 à 20°C avec (300 cycles par minute) ou sans (0 cycle par minute) agitation ...	57

LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1.1 : Relation entre les souches de levures et l'acidité titrable totale (ATT) dans les milieux contenant 35 % de brioches ou de pains broyés, après 48 heures de fermentation à 30°C et 300 cycles par minute	23
Figure 2.1 : Activité lipolytique de <i>Geotrichum candidum</i> avec ou sans ajout de 1 % d'huile dans le milieu de culture	41
Figure 2.2 : Croissance de <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 à 30°C et 300 cycles par minute dans un milieu contenant 35 % de pains broyés	42
Figure 3.1 : Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la concentration de quatre composés aromatiques volatils produits par <i>Geotrichum candidum</i> dans un milieu contenant 35 % de pains blancs broyés	54
Figure 3.2 : Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la croissance de <i>Geotrichum candidum</i> ATCC 62217 dans un milieu contenant 35 % de pains broyés	58

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'utilisation des microorganismes à des fins industrielles dans le secteur agroalimentaire est largement répandue et connue depuis longtemps. Les microorganismes sont utilisés pour la transformation et la production de nombreux aliments. Par exemple, les bactéries et les mycètes sont utilisés pour la fabrication du pain, de la bière, du vin et des fromages. Le développement de la biotechnologie a permis l'élaboration de nouvelles techniques d'utilisation des microorganismes et l'amélioration de celles existantes. Les microorganismes sont maintenant utilisés pour la revalorisation des sous-produits de l'industrie alimentaire autrefois destinés à l'alimentation animale ou simplement jetés.

Les sous-produits de boulangerie

Les méthodes de production à l'échelle industrielle, utilisées à l'heure actuelle dans le secteur de la boulangerie, engendrent une quantité importante de sous-produits. L'industrie de la fabrication du pain est la principale productrice de sous-produits de ce secteur d'activité. Une grande partie des pertes provient de pains endommagés ou hors-normes produits au cours de la fabrication automatisée. Pour les grandes boulangeries, les pertes annuelles engendrées peuvent représenter de 2 à 5 % de la production totale (Fallows & Wheelock, 1982). Il existe donc une volonté de revaloriser ces sous-produits de façon rentable.

Actuellement, ces sous-produits de pains peuvent être réintroduits dans une nouvelle recette de pain à un taux maximum de 5 à 20 % (Seibel, 1987). Des recherches ont également été menées afin de produire des croûtons ou des biscottes par extrusion (Ginzburg, 1977; Pain Jacquet Biscotte, 1979). Cependant, la majeure partie du produit va à l'alimentation animale (Fallows &

Wheelock, 1982).

Ces sous-produits de boulangerie sont riches en divers nutriments (sucre, matières grasses, ingrédients laitiers, etc.). Ces derniers sont facilement assimilables par divers microorganismes, notamment les champignons filamenteux (Zetelaki-Horváth & Vas, 1980), ce qui en font des substrats fermentescibles intéressants et peu coûteux. Des études ont démontré que la fermentation de ces sous-produits peut produire des protéines alimentaires (Zetelaki-Horváth & Vas, 1980) ou des levains acidulés pour la panification (Menge, 1986).

Geotrichum candidum et les levures de fromagerie

Les levures d'affinage utilisées en fromagerie sont reconnues pour leur capacité d'aromatisation. Ces levures font parties de la flore naturelle du lait et du fromage. Dans le fromage au lait cru, après 2 semaines d'affinage la quantité de levures peut atteindre 10^8 cellules par gramme de fromage. Parmi les levures rencontrées en fromagerie, on retrouve les genres *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Candida* et *Debaryomyces*. Par leurs différentes activités métaboliques, ces levures participent à l'élaboration de la texture et de la saveur des fromages au cours de l'affinage (Fox & Law, 1991). Les levures métabolisent rapidement les sucres, comme le lactose, en alcool et en gaz carbonique. En aérobiose, les levures transforment rapidement l'acide lactique, provenant de la fermentation par les bactéries lactiques, en gaz carbonique et en eau produisant ainsi une élévation du pH. Les activités protéolytique et aminopeptidasique des levures provoquent la formation de peptides et d'acides aminés libres qui peuvent être métabolisés pour produire de l'ammoniac, des aldéhydes, des acides et des alcools. Finalement, l'activité lipolytique permet la production d'esters et de méthyle cétones à partir des acides gras libérés.

L'une des levures d'affinage les plus connues est *Geotrichum candidum*, autrefois nommé *Oidium lactis* Fresenius ou *Oospora lactis* (Fres.) Saccardo (Carmichael, 1957). Ce mycète fait partie de la microflore naturelle de

plusieurs fromages affinés à pâte molle (Camembert, Limbourg, Livarot et Pont l'Evêque) ou pressée comme le Saint-Nectaire (Jollivet et coll., 1994). Au cours de l'affinage, *G. candidum* se développe très tôt et neutralise le caillé par l'oxydation de l'acide lactique et permet le développement subséquent d'autres organismes acido-sensibles tel *Brevibacterium linens* (Lecocq & Gueguen, 1994). Mourgues et coll. (1983) ont démontré que *G. candidum* jouait également un rôle dans l'amélioration des propriétés organoleptiques du camembert.

La reproduction de ce mycète se fait via la production d'arthrospores issues de la désarticulation du mycelium au niveau des septa. *G. candidum* est maintenant reconnue comme une levure par plusieurs auteurs (Barnett et coll., 1990; Kreger Van Rij, 1987) mais présente un dimorphisme levure-moisissure variable d'une souche à l'autre. Gueguen & Jacquet (1982) ont ainsi proposé trois types morphologiques de ce mycète basés sur des différences physiologiques et biochimiques.

Type 1 : souches de couleur crème, à l'aspect levuriforme, à température optimale située entre 22 et 25°C, à croissance plus réduite à 30°C, à production abondante d'arthrospores, donnant peu de mycelium; plutôt acidifiantes, à activité protéolytique faible.

Type 2 : intermédiaire.

Type 3 : souches de couleur blanche, plus ou moins feutrées (aspect de moisissure), à température optimale plus élevée (25-30°C), à croissance plus faible à 22°C, sporulant peu, produisant en milieux liquides des myceliums plus importants que les souches de type 1; plutôt alcalinisantes, à activité protéolytique plus marquée.

Ces différences sont plus ou moins évidentes selon le milieu de culture employé.

Geotrichum candidum se développe à des températures minimales d'environ 4°C (0 à 12°C) et maximales de 35-37°C (33 à 42°C) avec un optimum situé vers 25°C (22 à 30°C). *G. candidum* est acidotrophe et a un optimum de croissance vers 5,5-6,0 mais, selon les souches, peut supporter des variations de pH 3 à 10. Très sensible au sel, sa croissance est inhibée complètement par une concentration de 5-6 %, mais certaines souches peuvent être affectées par des

concentrations de 1-2 %. *G. candidum* peut utiliser une grande variété de sources de carbone dont plusieurs sucres mais uniquement par voie oxydative, à l'exception de rares souches qui peuvent fermenter faiblement le D-glucose ou le D-galactose (Gueguen & Schmidt, 1992).

Gueguen & Schmidt (1992) rapportent aussi que *Geotrichum candidum* a la capacité de stimuler le développement de plusieurs levures telles *Kluyveromyces lactis*, *Candida sphaerica*, *K. marxianus*, *C. kefyr*, *C. versatilis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Par ailleurs, ces levures peuvent avoir un effet stimulant ou légèrement inhibiteur sur *G. candidum* (Gueguen et coll., 1984). *G. candidum* peut aussi stimuler l'activité de certaines bactéries comme *Brevibacterium linens* (Lecocq et coll., 1996). Par ailleurs, *G. candidum* peut inhiber le développement de certains microorganismes indésirables comme les *Mucor* et plusieurs *Enterobacteriaceae* (Gueguen & Schmidt, 1992).

Outre sa participation à l'affinage des fromages, *Geotrichum candidum* a également été isolé à partir de la microflore naturelle associée à la fermentation des produits amylacés. *G. candidum* serait en partie responsable des caractéristiques aromatiques du gari, un aliment important au Nigéria, et du lafun (une variante du gari). Le gari est obtenu par fermentation des racines tubéreuses, riches en amidon, des plants de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) (Collard & Levi, 1959; Akinrele, 1964; Okafor & Uzuegbu, 1987; Akinyosoye et coll., 1988). Au cours de cette transformation, *G. candidum* participe à l'élaboration des propriétés organoleptiques du gari par production de composés aromatiques (Collard & Levi, 1959; Okafor & Uzuegbu, 1987); il contribue aussi à réduire la concentration de composés cyanogènes toxiques présents dans le manioc à l'état frais (Essers et coll., 1994). *G. candidum* a également été isolé de breuvages alcooliques nigériens (pito, burukutu et sekete) préparés à partir de maïs malté (Sanni & Lönner, 1993). Dans de cadre d'essais de production de biomasse, Nkumah et coll., (1980) ont également démontré que *G. candidum* avait la capacité d'utiliser, en présence de saccharose, différents types d'amidon (riz, blé et pommes de terre) comme source de carbone.

Les arômes

Le domaine des arômes représente une part importante du secteur agroalimentaire, mais aussi des secteurs cosmétique, chimique et pharmaceutique (Janssens et coll., 1992). Selon ces derniers auteurs, le marché des arômes se chiffre à 7 milliards de dollars US par année, soit 25 % du total des additifs alimentaires (Armstrong & Yamasaki, 1986). Les arômes peuvent être qualifiés d'artificiels ou de naturels selon la méthode utilisée pour les obtenir. La méthode la plus économique est de loin la production d'arômes dits artificiels par synthèse chimique, 84 % des arômes étant fabriqués de cette façon (Janssens et coll., 1992). Cependant, cette méthode mène à la formation de mélanges racémiques indésirables et la demande des consommateurs pour des produits naturels ne contenant pas d'additifs ne cesse d'augmenter (Janssens et coll., 1992). Il existe donc une demande importante pour des arômes d'origine biologique qualifiés de naturels. Les méthodes traditionnelles d'obtention de ces arômes consistent à extraire les composés aromatiques à partir de la source naturelle, par exemple, les fruits. Cependant, les composés aromatiques sont souvent présents en très faible quantité ou sont liés à d'autres composés, ce qui rend difficile et coûteuse l'extraction de ces composés (Janssens et coll., 1992).

La biotechnologie propose des méthodes alternatives d'obtention d'arômes naturels. Ces méthodes utilisent des cellules ou des tissus d'origine végétale ou plus souvent des microorganismes et des enzymes. L'utilisation de microorganismes représente la voie la plus rentable et la plus prometteuse dans ce domaine (Janssens et coll., 1992). En effet, ces derniers sont utilisés depuis longtemps pour produire des saveurs agréables au cours de l'élaboration, de la transformation et de la stabilisation de plusieurs aliments (Degorce-Dumas et coll., 1984). En fait, l'homme utilisait ces procédés bien avant de connaître les processus biologiques impliqués (Gatfield, 1988).

Deux approches différentes existent dans l'utilisation des microorganismes pour la production de composés aromatiques. La première, la bioproduction, consiste à utiliser les microorganismes pour produire les arômes *de novo* par

fermentation à partir d'un substrat contenant les éléments de base nécessaires à la synthèse des composés. Au cours de la fermentation, les microorganismes produisent des composés en grande quantité comme de l'éthanol, du CO₂ ou de l'acide lactique. Cependant, plusieurs composés produits en plus faible quantité sont très importants du point de vue organoleptique (Degorce-Dumas et coll., 1984). Par fermentation, les mycètes des genres *Ceratocystis* et *Penicillium* ainsi que *Kluyveromyces lactis* produisent des terpènes, une composante majeure des huiles essentielles. L'utilisation des mycètes *Trichoderma viride* et *Sporobolomyces odoratus* permet la production de lactones, une autre classe majeure de composés aromatiques (Degorce-Dumas et coll., 1984; Latrasse et coll., 1985). Les levures *Hansenula saturnus*, *Geotrichum candidum* et *Pichia farinosa*, ainsi que les bactéries comme *Pseudomonas fragi* produisent des esters (Degorce-Dumas et coll., 1984; Latrasse et coll., 1985; Janssens et coll., 1992).

La deuxième approche, la bioconversion, est définie comme suit par Degorce-Dumas et coll. (1984) : "Procédé biotechnologique permettant la transformation d'une molécule en une autre à l'aide d'un nombre réduit de réactions enzymatiques, les enzymes étant libres, fixées ou endocellulaires". On peut, par exemple, catalyser la formation de valérate d'éthyle à partir d'éthanol et d'acide valérique en utilisant des enzymes de type esterase ou lipase. Que l'on utilise une approche ou l'autre, la première étape est de sélectionner des souches ayant un potentiel intéressant pour la production de composés aromatiques. Dans le secteur agroalimentaire, l'utilisation de souches généralement reconnues comme sécuritaires (GRAS; "Generally Recognized As Safe") est aussi souvent préférable (Belin et coll., 1992). Les souches sélectionnées peuvent également subir des modifications génétiques permettant d'améliorer la production de certains composés. Par exemple, McIver & Reineccius (1986) rapportent le cas d'une souche de *Pseudomonas perolens* de type sauvage qui produit 48 ppb de 2-methoxy-3-isopropylpyrazine alors qu'un mutant de cette souche en produit 15800 ppb.

Ces méthodes de production d'arômes naturels sont plus coûteuses que la synthèse chimique de composés artificiels mais sont beaucoup plus

économiques que les méthodes d'extraction à partir de la matière première (fruits par exemple). Par exemple la bioproduction de butyrate d'éthyle, un composé fruité important, revient à 180.00 \$US / Kg en utilisant *Clostridium butyricum*. Le même composé obtenu chimiquement ne coûte que 4.00 \$US / Kg tandis que l'extraction de butyrate d'éthyle à partir de jus de fruit revient à 5000.00 \$US / Kg (Janssens et coll., 1992). Vu la forte demande pour ces composés naturels, la voie biotechnologique demeure la solution la plus intéressante pour la production de ces composés.

Les objectifs de recherche

Les cultures microbiennes utilisées pour l'affinage des fromages, notamment *Geotrichum candidum* sont reconnues pour leurs capacités aromatisantes. L'utilisation de telles cultures d'origine laitière lors de la fermentation d'un milieu à base de sous-produits de boulangerie représente une innovation importante. Ces méthodes de fermentation pourraient permettre la production de composés d'arômes recherchés et par la même occasion revaloriser ces sous-produits qui représentent des pertes importantes pour l'industrie. Ces sous-produits de boulangerie, bien que fort différents des milieux retrouvés en fromagerie, sont suffisamment complexes et riches en nutriments (sucres, matières grasses, poudre de lait, etc.) pour soutenir la production de composés aromatiques par ces cultures microbiennes. Les composés aromatiques ainsi produits pourraient par la suite être extraits et purifiés pour être utilisés comme additifs dans l'industrie alimentaire. Le ferment obtenu pourrait aussi être utilisé directement comme ingrédient ou concentré de saveur lors de la production de produits de boulangerie pour en rehausser la saveur. Le substrat ainsi que les cultures microbiennes utilisés étant de nature alimentaire et généralement reconnue sécuritaire (GRAS), leur utilisation directe dans le secteur agroalimentaire pourrait se faire assez facilement. Pour l'industrie de la boulangerie, une telle revalorisation de ces sous-produits représenterait une voie beaucoup plus rentable que les méthodes utilisées actuellement pour disposer de ces produits.

Le présent travail comporte cinq objectifs principaux répartis dans les trois chapitres de ce mémoire :

1. a) Sélection, parmi 8 souches de levures de fromagerie et 2 milieux à base de sous-produits de boulangerie, de la combinaison souche-milieu la plus apte à produire des arômes intéressants. b) Caractérisation des deux sous-produits de boulangerie.

2. a) Caractérisation de l'arôme obtenu avec la combinaison souche-milieu retenue du point de vue des composés aromatiques volatils et des acides organiques. b) Caractérisation de la croissance et de l'activité lipolytique de la souche de levure sélectionnée.

3. Évaluation de l'effet de la température et de l'agitation sur la production de composés aromatiques volatils, sur la croissance du microorganisme sélectionné et sur le profil des acides organiques en fonction du temps au cours de la fermentation.

CHAPITRE 1

SÉLECTION DES SOUCHES DE LEVURES ET DES MILIEUX DE FERMENTATION

1.1 RÉSUMÉ

Huit souches de levures utilisées traditionnellement en fromagerie (origine commerciale ou banque ATCC) ont été évaluées selon leur aptitude à produire des composés aromatiques sur deux substrats à base de sous-produits de boulangerie plus ou moins riches en sucres et en matières grasses (pains blancs broyés ou brioches broyées). Cinq souches du mycète *Geotrichum candidum* (les souches ATCC 28129, 26321 et 62217 et les deux cultures commerciales Rhône-Poulenc GEO 15 et Rosell *Oidium lactis*) ainsi que trois cultures de levures d'affinage commerciales Rhône-Poulenc KL71 (*Kluyveromyces lactis*), Rhône-Poulenc DH (*Debaryomyces hansenii*) et Rosell levure B2#3380 (*Cryptococcus albidus*) ont été testées. La souche de *G. candidum* ATCC 62217 produit un arôme fruité prononcé et très agréable après 48 heures de fermentation sur le milieu à base de pain blanc. La majorité des levures testées a démontré une activité désacidifiante du milieu de fermentation à base de sous-produits de boulangerie.

1.2 INTRODUCTION

Les microorganismes utilisés pour l'affinage des fromages, notamment le mycète *Geotrichum candidum*, sont reconnus pour leurs capacités d'aromatisation. L'utilisation de ces cultures de fromagerie pour transformer des sous-produits de boulangerie pourrait permettre la production de composés d'arômes intéressants. Bien que les milieux laitiers et céréaliers soient de nature très différente, tous deux sont des sources importantes de nutriments utilisables par les microorganismes pour former des composés aromatiques.

Pour l'affinage des fromages, les levures d'aromatisation sont soit ajoutées au lait lors de la fabrication du fromage ou inoculées en surface des fromages à l'étape de maturation. Les levures se développent rapidement et utilisent les composés précurseurs de saveurs formés lors de la fabrication du fromage pour produire des composés aromatiques et améliorer les qualités organoleptiques des fromages. De la même manière, les produits de boulangerie sont issus d'une première fermentation au cours de laquelle la levure de boulangerie et les bactéries lactiques de la farine produisent divers composés qui pourraient, en théorie, être utilisés comme précurseurs de saveurs au cours d'une seconde fermentation par les levures d'aromatisation.

Parmi les précurseurs de saveurs présents dans les produits de boulangerie, on retrouve de l'éthanol, des acides organiques, des aldéhydes et des alcools supérieurs (van Dam & Hille, 1992). Au cours de la fermentation par *Saccharomyces cerevisiae*, 95 % des glucides fermentés sont transformés en éthanol et en gaz carbonique (Richard-Molard & Drapron, 1978). Les glucides résiduels servent de substrats pour la fermentation dite "secondaire" au cours de laquelle divers composés aromatiques sont produits (Richard-Molard & Drapron, 1978; van Dam & Hille, 1992). Le catabolisme des acides aminés mène aussi à la formation d'acides organiques et d'aldéhydes, qui peuvent être oxydés en acides ou réduits en alcools saturés (El-Dash, 1971), ainsi qu'à la production d'alcools supérieurs via la voie anaérobie d'Ehrlich (Richard-Molard & Drapron, 1978). Finalement, des quantités plus ou moins importantes d'acides organiques et d'autres composés sont également produits par le métabolisme des bactéries lactiques présentes dans la farine. Dans l'ensemble, plus le temps de

fermentation de la pâte est long, plus la concentration de ces précurseurs de saveurs est élevée.

Cinq souches de *G. candidum* ont été évaluées, trois de ces souches proviennent de la banque ATCC, les deux autres sont vendues comme ferments commerciaux d'aromatisation pour fromagerie. Trois autres ferments d'affinage commerciaux ont été inclus à titre comparatifs. Ces ferments sont constitués de souches de levures rencontrées fréquemment en fromagerie et capable de se développer à la même température que *G. candidum*. La sélection de souches a été faite sur deux milieux à base de sous-produits de boulangerie différents. Un sous-produit de pains blancs tranchés commerciaux contenant peu de sucres et de matières grasses et un sous-produit de brioches riche en sucres et en matières grasses.

La première étape de cette étude a pour objectifs : 1. L'évaluation de la capacité de huit souches de levures à produire de l'acidité titrable et des arômes intéressants par fermentation de deux sous-produits de boulangerie; 2. La caractérisation de ces sous-produits. Cette étude devrait permettre de sélectionner la combinaison souche-milieu produisant l'arôme le plus intéressant. La fermentation sélectionnée pourra par la suite être caractérisée et l'effet de certains paramètres sera évalué dans le but d'optimiser la fermentation.

1.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.3.1 Microorganismes

Huit souches de levures ont été testées, soit trois souches de *Geotrichum candidum* provenant de la banque ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) et cinq cultures de levures commerciales (dont trois *G. candidum*) gracieuseté de Rhône-Poulenc (Boucherville, Québec) ou de l'Institut Rosell (Montréal, Québec).

1. *Geotrichum candidum* ATCC28129
2. *Geotrichum candidum* ATCC26321
3. *Geotrichum candidum* ATCC62217
4. *Geotrichum candidum* (GEO 15; Rhône-Poulenc)
5. *Geotrichum candidum* (mélange "Oïdium lactis"; Institut Rosell)
6. *Debaryomyces hansenii* (DH; Rhône-Poulenc)
7. *Kluyveromyces lactis* (KL 71; Rhône-Poulenc)
8. *Cryptococcus albidus* (B2 #3380; Institut Rosell)

1.3.2 Conservation des microorganismes

Les souches provenant de la banque ATCC, reçues sous forme lyophilisée, ont été réhydratées selon les instructions de l'ATCC. Les souches étaient ensuite conservées sur géloses inclinées de Potato Dextrose Agar (PDA; BBL, Cockeysville, Maryland) à 4°C recouvertes d'huile de paraffine (Anachemia, Montréal, Québec) préalablement stérilisée à 160°C pendant 2 heures dans un four à sec. Les cultures de levures commerciales sous forme lyophilisée étaient conservées à -20°C dans leur emballage d'origine. *Cryptococcus albidus* (B2#3380) sous forme liquide était conservée à 4°C.

1.3.3 Préparation des inocula

1.3.3.1 Cultures commerciales

Les cultures de levures commerciales sous forme lyophilisée ou liquide étaient utilisées directement.

1.3.3.2 Souches ATCC

Une suspension de spores était produite à partir d'une culture sporulée sur

milieu gélosé PDA selon une méthode adaptée de Essers et coll. (1994). Les spores étaient récupérées en ajoutant 10 mL d'eau distillée stérile à chacun des plats de Petris. Une tige de verre stérile était passée sur la culture pour libérer les spores et la suspension était ensuite récupérée dans des tubes à centrifuger stériles (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie). La suspension était ensuite centrifugée pendant 15 minutes à 2800 g (Beckman GS-6, Beckman Instruments, Toronto, Ontario) et le culot de spores obtenu était lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile puis était resuspendu dans 50 mL d'eau distillée stérile. La concentration de la suspension était évaluée par détermination du nombre d'unités formant des colonies (ufc) sur milieu PDA. Les suspensions étaient conservées à 4°C.

1.3.4 Sous-produits de boulangerie

Deux sous-produits de boulangerie différents ont été utilisés pour la fabrication des milieux de fermentation. Un sous-produit de brioches fourni par Les Plats du Chef (Pointe-Claire, Québec) sous forme de chapelure en vrac et un sous-produit de pains blancs provenant de la boulangerie Multi-Markes (Montréal, Québec). Les pains étaient réduits en chapelure à l'aide d'un broyeur Comil (Quadro Engineering, Waterloo, Ontario). Les deux sous-produits étaient emballés sous vide en paquets d'environ 1 kg et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

1.3.5 Fermentations

Une journée avant l'expérience, les sacs contenant les sous-produits étaient placés à la température de la pièce (environ 22°C) pour décongélation. Les milieux de fermentation étaient préparés en mélangeant 35 % de sous-produit et 65 % d'eau distillée. Le mélange était homogénéisé à l'aide d'un mélangeur électrique (modèle K45SS; Kitchen-Aid, St-Joseph, Michigan). Le milieu de fermentation était ensuite distribué en portions de 150 g dans des Erlenmeyers de 250 mL puis inoculé avec 10^6 ufc/g de milieu. Les échantillons étaient incubés à 30°C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute pendant 24 ou 48 heures (Lab-Line Orbit Instruments, Melrose Park, Illinois). Pour la sélection, chacune des huit souches de levures a été utilisée pour fermenter chacun des deux milieux de culture pendant 24 et 48 heures à deux reprises (2

répétitions). Pour chaque répétition, les fermentations étaient faites en duplicata (2 échantillons).

1.3.6 Arôme des ferments

Une fois la fermentation terminée, l'arôme global des ferments était évalué sommairement par odorat.

1.3.7 Acidité titrable totale

L'acidité titrable totale des ferments était mesurée selon la méthode de Sutherland (1989). Dans un bécher de 250 mL, de l'eau déionisée était ajoutée à 15 g de sous-produit ou 20 g de milieu fermenté pour compléter à 100 g. Le mélange était agité pendant 30 minutes à l'aide d'un barreau magnétique puis titré avec une solution de NaOH N/9 jusqu'à pH 6,6 à l'aide d'un titrimètre Titrimo (modèle S719; Metrohm, Herisau, Suisse). Les résultats obtenus étaient exprimés en meq mole d'acide lactique par gramme de ferment.

1.3.8 Détermination des protéines totales

Le contenu en azote total était déterminé selon la méthode Macro Kjeldahl 920.105 (AOAC, 1990) à l'aide d'un Kjeltec 1030 Analyser (Tecator, Virginie). La teneur en protéines était estimée en utilisant 5,70 comme facteur de conversion puis exprimée en pourcentage de protéines sur la base du poids sec. Deux répétitions de 3 échantillons ont été effectuées.

1.3.9 Détermination des gras totaux et du poids sec

La teneur en gras totaux des sous-produits était mesurée selon la méthode Soxhlet 963.15 adaptée de l'AOAC (1990). Quatre grammes de sous-produit étaient pesés avec précision (P2), déposés dans une cartouche d'extraction (33 mm X 94 mm), recouverts d'un morceau de ouate (la cartouche et la ouate étaient préalablement séchées pendant 18 heures à 100°C et pesées (P1)). Les échantillons étaient placés dans un four à vide pendant 6 heures à 100°C. Après refroidissement au dessiccateur, les échantillons étaient pesés (P3) pour déterminer le poids sec $((P3-P1)/P2)$. Les échantillons étaient ensuite déposés dans un soxhlet et extraits pendant 4 heures avec 150 mL d'éther de pétrole. Les échantillons étaient ensuite séchés (1 heure à 100°C), refroidis et pesés

pour le calcul de la teneur en gras totaux. Les résultats étaient exprimés en pourcentage de gras sur la base du poids sec.

$\% \text{ gras} = (\text{g gras} \times 100) / \text{g d'échantillon (poids sec)}$.

Deux répétitions de 2 échantillons étaient faites.

1.3.10 Détermination de la teneur en sel

Deux grammes de sous-produit de boulangerie étaient homogénéisés avec 38 g d'eau déionisée à l'aide d'un homogénéisateur Polytron, model PT 10/35 muni d'une tige PTA 10S (Brinkmann Instruments, Mississauga, Ontario) puis filtrés sur papier Whatman #2. La teneur en sel était ensuite déterminée avec un appareil Chloride Analyser 926 (Ciba Corning Diagnostics, Medfield, Massachusetts).

1.3.11 Détermination de l'Aw

L'Aw était mesurée directement à l'aide d'un appareil Aqua Lab (Decagon Devices, Pullman, Washington).

1.3.12 Analyses microbiologiques

Un échantillon de 10g de sous-produit de boulangerie était homogénéisé dans 90 mL d'eau peptonée stérile et le nombre de bactéries mésophiles était estimé sur un milieu MRS (deMan Rogosa Sharpe) (MRS agar; BDH, Darmstadt, Allemagne) incubé pendant 48 heures à 34°C.

1.3.13 Analyse des sucres

Les sucres étaient extraits à partir des sous-produits de boulangerie selon la méthode décrite par Lönner & Preve-Akesson (1988). Un mélange de 20 g de sous-produit et 100 mL d'eau déionisée était homogénéisé. Les échantillons étaient chauffés à 60°C dans un bain thermostaté pendant 5 minutes puis refroidis rapidement dans un bain de glace jusqu'à la température ambiante (environ 22°C), neutralisés à pH 7 avec du NaOH 1 N, soumis à une agitation magnétique pendant 30 minutes puis centrifugés pendant 15 minutes à 11300 g (model J2-21, Beckman Instruments, Toronto, Ontario). Le surnageant était passé sur une cartouche sep-pak C18 (Waters, Milford, Massachusetts) et filtré sur filtres de 0,2 μm (Costar corporation, Cambridge, Massachusetts). La

séparation était effectuée sur un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Milford, Massachusetts) muni d'une pompe (modèle 510) et d'un injecteur automatique (WISP modèle 710B). Les composés étaient séparés sur une colonne échangeuse d'ions ION-300 (InterAction Chromatography, San Jose, Californie) de 300 mm X 7,8 mm (diamètre interne). L'éluant utilisé était le H_2SO_4 à 0,005 N à un débit de 0,4 mL/minute à 25°C. La détection des composés était faite par un détecteur à indice de réfraction différentiel (modèle 410). Deux répétitions de 3 échantillons ont été faites.

1.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

1.4.1 Analyse des sous-produits de boulangerie

Les résultats présentés au tableau 1.1 montrent que les brioches contiennent trois fois plus de matières grasses et de sucres simples (glucose et fructose) que le pain blanc. Par ailleurs, le pain blanc a une acidité titrable plus élevée que les brioches.

La composition des deux sous-produits de boulangerie est susceptible d'affecter le développement de *Geotrichum candidum* et des levures à l'étude. Le pH des deux sous-produits (5,3-6,0) est relativement optimal pour *Geotrichum candidum* et les levures (Gueguen & Schmidt, 1992). Les deux sous-produits contiennent du glucose et du fructose, sucres assimilables par toutes les levures (Gueguen & Schmidt, 1992). La quantité de sel contenue dans les sous-produits varie autour de 2 %. Bien que certaines souches de *G. candidum*, un des microorganismes les plus sensibles au sel (Gueguen & Schmidt, 1992), puissent être partiellement inhibées par des concentrations aussi faibles, il faut généralement des concentrations de 5 à 6 % pour une inhibition totale (Gueguen & Schmidt, 1992). Le milieu de fermentation est composé de 35 % de sous-produit et 65 % d'eau distillée ce qui ramène la concentration effective de sel dans le milieu à environ 0,7 %. Les deux sous-produits contiennent des contaminants bactériens en faible quantité ($< 10^2$ ufc/g de sous-produits).

Les deux sous-produits de boulangerie utilisés sont très différents et ont été sélectionnés pour permettre d'observer l'effet d'une forte différence de la teneur en matières nutritives sur la capacité des levures d'aromatisation à produire des composés aromatiques. De plus, le pain blanc est un produit ayant subi une première fermentation beaucoup plus longue que les brioches. Le pain commercial est fabriqué selon un procédé de pâte avec levain-levure (sponge and dough process) qui comporte une étape de fermentation du levain pendant 4,5 heures. Cette longue étape de fermentation ne fait pas partie du procédé de fabrication des brioches. Ainsi, il est probable que le pain contienne davantage d'acides organiques et autres précurseurs de saveurs que

les brioches. Les levures d'aromatisation peuvent ainsi utiliser les acides issus de la fermentation du pain de la même façon qu'elles utilisent, au cours de l'affinage, l'acide lactique et les autres acides issus de la fermentation fromagère.

Les milieux de fermentation sont fabriqués en mélangeant 35 % de sous-produits de boulangerie et 65 % d'eau. Cette concentration permet d'incorporer le maximum de sous-produits tout en conservant un milieu suffisamment liquide pour permettre une bonne agitation. Cette concentration a été conservée pour toute la durée de l'étude.

1.4.2 Évaluation des souches de levures

1.4.2.1 Arômes des milieux fermentés

L'arôme produit par fermentation des deux milieux avec les différentes souches est présenté au tableau 1.2. Les résultats présentés sont ceux obtenus après 48 heures de fermentation. Les arômes obtenus après 48 heures sont plus intenses mais correspondent généralement à ceux obtenus après 24 heures. Les ferments produits par les souches de *G. candidum* ainsi que ceux produits par la plupart des autres levures présentent des arômes qualifiés de moyennement agréables à très agréables. Par contre, les ferments produits par la culture KL71 de Rhône-Poulenc dans les deux milieux ainsi que par la culture "*Oidium lactis*" (Institut Rosell) dans le milieu brioche ont un arôme chimique désagréable sans intérêt. Par ailleurs, les arômes produits dans le milieu à base de brioche se rapprochent souvent de ceux des laits fermentés. Enfin, il est aussi important de noter que les conditions de sélection aérobies adoptées ici (flacons agités à 300 cycles par minute) peuvent défavoriser légèrement les levures facultatives comme *Kluyveromyces lactis*.

Les cultures commerciales sélectionnées sont vendues comme ferments d'affinage et d'aromatisation utilisés en fromagerie. Les souches de *Geotrichum candidum* provenant de la banque ATCC (American Type Culture Collection) ont été isolées à partir de substrats de nature alimentaire. Deux autres souches ATCC avaient initialement été sélectionnées, soit les souches

34614 et 62221, mais ont été rejetées à cause de leur apparence de moisissure trop accentuée. Le développement de ce type de microorganisme étant indésirable dans les produits de boulangerie. Les trois souches ATCC retenues ont un aspect levuriforme. La souche de *G. candidum* ATCC 62217 produit un arôme fruité de forte intensité très agréable dans le milieu à base de pains. Koizumi et coll. (1982), rapportent trois souches de *G. candidum* sur 12 souches sauvages isolées à partir de la microflore provenant d'exsudats d'arbres produisent un arôme fruité rappelant celui du melon. Une autre étude réalisée par Latrasse et coll. (1987) fait état de la production d'un arôme fruité de coing (fruit du cognassier) par une souche mutante de *G. candidum* sur un milieu contenant du glycérol et un amide (urée ou L-asparagine), les autres souches sauvages isolées à partir de fromages ne produisaient par d'arôme fruité. Selon cet auteur, ces résultats suggèrent que les souches utilisées en fromagerie n'ont pas la capacité de produire l'arôme fruité. Nos résultats supportent cette hypothèse. En effet, la souche ATCC 62217 qui produit un arôme fruité est la seule souche testée ne provenant pas de fromages. Les souches de *G. candidum* ATCC 28129 et 26321 qui sont isolées à partir de fromages ne produisent pas d'arômes fruités. C'est le cas également de la souche GEO 15 (Rhône-Poulenc) et de la culture "*Oidium lactis*" (Institut Rosell) qui sont vendus pour utilisation en fromagerie. L'étude des caractéristiques de la souche ATCC 62217 et de l'arôme fruité produit fait l'objet des chapitres suivants.

1.4.2.2 Acidité titrable des milieux fermentés

L'acidité titrable a été déterminée sur l'ensemble des milieux fermentés obtenus après 24 et 48 heures. La figure 1.1 montre que les milieux fermentés à base de brioches ont toujours une acidité titrable supérieure à celle des milieux fermentés à base de pains. Ceci s'explique vraisemblablement par le contenu supérieur en sucres de ce milieu. Les sucres peuvent être transformés en acides par les microorganismes ayant une activité fermentative sur ces sucres. L'acidité titrable maximale (0,072) est obtenue après 48 heures de fermentation avec la culture Rosell B2#3380 et le milieu à base de brioches. L'acidité titrable dans les milieux fermentés à base de brioches est comparable à celle des préferments liquides utilisés en panification qui est de 0,030 à 0,065 méq mol acide lactique / g de préferment selon la quantité de farine utilisée

(Sutherland, 1989). Les milieux fermentés produits par les différentes souches de *G. candidum* ont une acidité titrable plus faible que celle d'un milieu-témoin non inoculé. Ces résultats s'expliquent par l'activité neutralisante de plusieurs souches de *G. candidum* qui oxydent les acides organiques pour produire du CO₂ et de l'eau. Seule la culture "*Oidium lactis*" (Institut Rosell), qui est un mélange de souches, produit une acidité titrable assez élevée qui peut être attribuable à la présence de souches ayant un pouvoir neutralisant plus faible ou à la présence de souches acidifiantes. En effet, ce caractère varie beaucoup selon les souches (Gueguen & Jacquet, 1982). Le développement d'acidité titrable dans un témoin non inoculé s'explique par le fait que les milieux de fermentation ne sont pas stériles.

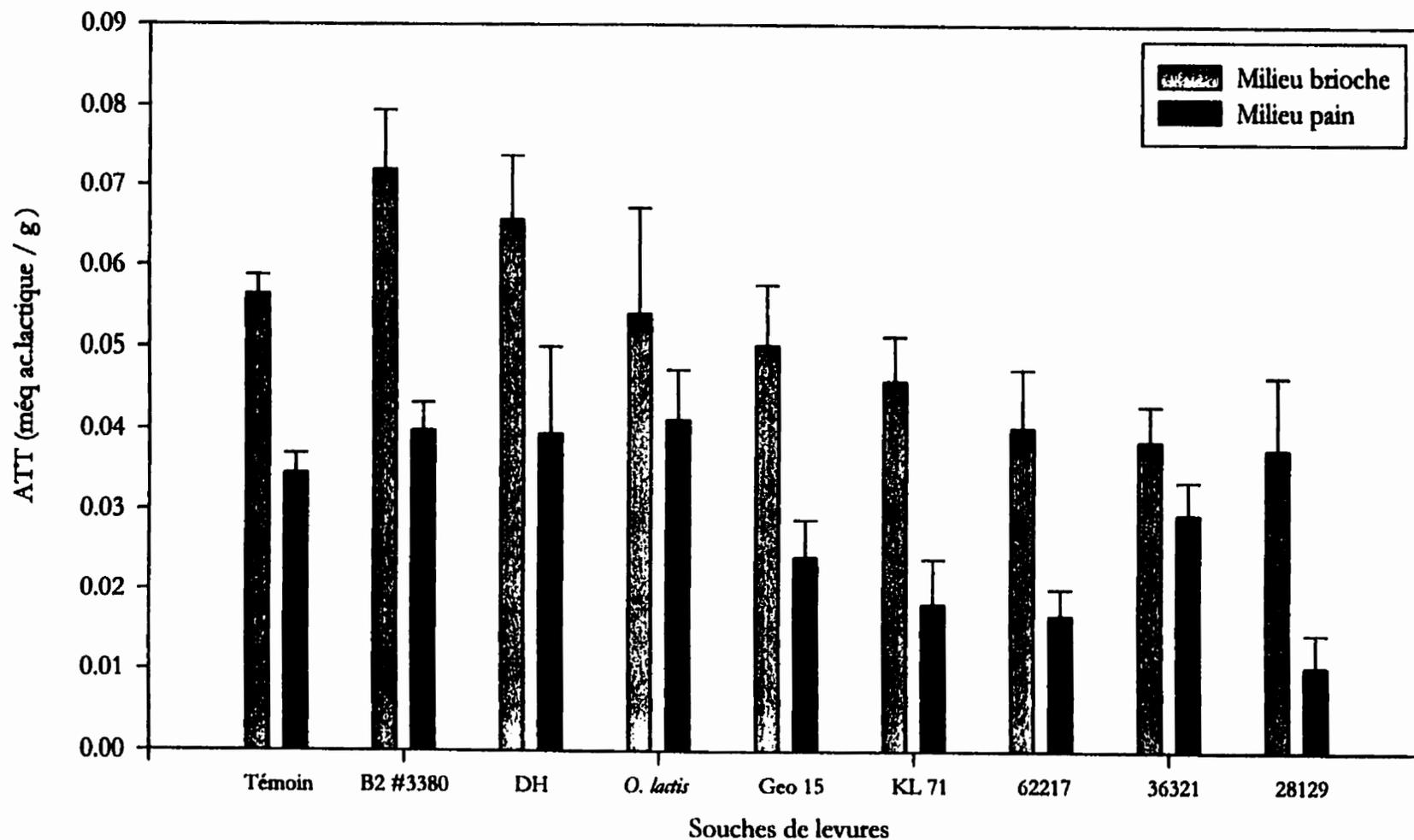
TABLEAU 1.1
ANALYSE DES SOUS-PRODUITS DE BOULANGERIE.

Analyse	Brioche	Pain
Protéines (%, matières sèches)	12,34	14,35
Matières grasses (%, matières sèches)	13,5	3,6
Fructose (%, matières sèches)	4,71	1,79
Glucose (%, matières sèches)	3,94	1,09
Sel (NaCl) (%, matières sèches)	1,6	2,3
Acidité titrable (méq mole acide lactique/g)	0,0131	0,0273
pH	5,96	5,31
Eau (%)	22,8	37,5
Aw	0,84	0,93
Contaminants (bactéries mésophiles) (ufc/g)	<10 ²	<10 ²

TABLEAU 1.2
 EFFET DU TYPE DE MICROORGANISME ET DU SOUS-PRODUIT DE
 BOULANGERIE SUR L'ARÔME DES MILIEUX FERMENTÉS
 APRÈS 48 HEURES DE FERMENTATION À 30°C ET
 300 CYCLES PAR MINUTE.

Culture	Milieu	Arôme	Arôme; agréable (+) désagréable (-)
<i>G. candidum</i> ATCC 62217	Brioche Pain	Pâte fermentée, fruits Arôme fruité très prononcé	++ ++++
<i>G. candidum</i> ATCC 28129	Brioche Pain	Alcool, lait fermenté Alcool, légèrement floral	+/- ++
<i>G. candidum</i> ATCC 26321	Brioche Pain	Pâte et lait fermentés Pain, noix de coco	+ ++
<i>G. candidum</i> GEO 15	Brioche Pain	Pâte et lait fermentés Pain, fruits	+ +
<i>G. candidum</i> "Oïdium lactis"	Brioche Pain	Pâte et lait fermentés Acétone, solvant	+/- --
<i>Cryptococcus</i> <i>albidus</i>	Brioche Pain	Pâte et lait fermentés Pain, alcool	+ +/-
<i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i>	Brioche Pain	Alcool, solvant Alcool, solvant	- --
<i>Debaryomyces</i> <i>hansenii</i>	Brioche Pain	Lait fermenté Pain, alcool	+ +/-

FIGURE 1.1
RELATION ENTRE LES SOUCHES DE LEVURES ET L'ACIDITÉ TITRABLE TOTALE (ATT)
DANS LES MILIEUX CONTENANT 35 % DE BRIOCHES OU DE PAINS BROYÉS
APRÈS 48 HEURES DE FERMENTATION À 30°C ET 300 CYCLES PAR MINUTE.
(2 répétitions de 2 échantillons)



1.5 CONCLUSION

Les résultats obtenus ont démontré que la plupart des souches de levures évaluées (non typiques en panification) pouvaient produire des arômes intéressants par fermentation de deux sous-produits de boulangerie. L'arôme obtenu après 48 heures de fermentation est supérieur à celui obtenu après 24 heures. Les milieux fermentés à base de brioches ont souvent une acidité titrable élevée et un arôme de lait fermenté. La culture de levure commerciale B2#3380 (Institut Rosell) a été la plus acidifiante tandis que les souches de *G. candidum*, de par leur action neutralisante, produisent les ferments les moins acides.

Un ferment à l'arôme fruité très agréable a été obtenu par fermentation du milieu à base de pains avec la souche de *Geotrichum candidum* ATCC 62217. Ce milieu fermenté pourrait constituer une source de composés aromatiques à haute valeur ajoutée. La caractérisation de l'arôme produit et de la souche de *G. candidum* utilisée fait l'objet du prochain chapitre.

CHAPITRE 2

CARACTÉRISATION DE L'ARÔME FRUITÉ PRODUIT PAR *Geotrichum candidum*

2.1 RÉSUMÉ

Un arôme fruité est produit par *Geotrichum candidum* ATCC 62217 à partir de pains blancs broyés. Les composés aromatiques volatils constituant l'arôme étaient obtenus par adsorption sur une cartouche d'extraction en phase solide, par échantillonnage de l'espace de tête (headspace) ou par condensation des composés sur un piège froid (Cold Finger) et analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC) à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et/ou d'un spectromètre de masse (MS). Ces analyses ont permis d'identifier neuf esters d'acide gras (éthyliques et propylique), quatre alcools et un acide gras. L'étude du profil de six acides organiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a permis de constater une diminution de la concentration de plusieurs acides à la suite de la fermentation. L'évaluation de l'activité lipolytique de la souche ATCC 62217 a démontré un taux d'activité comparable aux souches ATCC ne produisant pas d'arôme fruité. D'après la courbe de croissance de *G. candidum*, la production de l'arôme coïncide avec la phase de croissance stationnaire du microorganisme.

2.2 INTRODUCTION

Le mycète *Geotrichum candidum* possède des aptitudes aromatiques variées par différentes activités enzymatiques (Jollivet et coll., 1994). Sur les milieux laitiers, il peut former des composés aromatiques à partir du catabolisme des acides aminés, des acides aminés soufrés et de la dégradation oxydative des acides gras (Belin, 1991). Certaines souches de *G. candidum* ont aussi la capacité de produire des esters d'acide gras de faible poids moléculaire (Koizumi et coll., 1982; Degorce-Dumas et coll., 1984; Latrasse et coll., 1987). La production de ces composés est souvent associée à la présence d'un arôme fruité (Koizumi et coll., 1982; Latrasse et coll., 1987; Janssens et coll., 1988; Gatfield, 1988). Cependant, les souches utilisées en fromagerie ne semblent pas produire de tels esters (Latrasse et coll., 1987).

La formation d'esters découle d'un mécanisme de détoxification du milieu de culture par le microorganisme. Ce mécanisme empêche l'accumulation de composés toxiques pour les cellules tels les acides gras à courte chaîne et les alcools de fusel (Latrasse et coll., 1987). La synthèse des esters peut être accomplie par des enzymes de la famille des hydrolases d'esters carboxyliques (EC.3.1.1) et parfois par des transférases comme l'alcool acetyltransferase (Gatfield, 1988; McKay, 1993). Les lipases (EC.3.1.1.3) ou estérases (EC 3.1.1.2) font partie du premier groupe. Ces enzymes peuvent hydrolyser les liaisons esters pour libérer des acides gras libres mais aussi, à l'inverse, synthétiser des liaisons ester (Macrae, 1983; Gilbert et coll., 1991).

G. candidum possède un système lipolytique très élaboré, possédant jusqu'à 4 lipases différentes (Sugihara et coll., 1991). Ces lipases sont extracellulaires (Macrae, 1985; Tahoun et coll., 1987; Jacobsen & Poulsen, 1995) et peuvent attaquer les trois liaisons d'un triglycéride (Sugihara et coll., 1991). Il existe aussi une grande variabilité dans l'aptitude à utiliser différents substrats (Jacobsen et coll., 1990; Sidebottom et coll., 1991) et du niveau d'activité lipolytique entre différentes souches (Baillargeon et coll., 1989). Une des ces enzymes ne présente pas de spécificité de substrat (lipase A) alors que la lipase B présente une spécificité pour les esters d'acide gras insaturés ayant une

liaison double de configuration *cis* en position 9 (Sidebottom et coll., 1991; Charton et coll., 1992). Sugihara et coll. (1993) ont caractérisé récemment une autre lipase qui démontre une spécificité pour l'hydrolyse des esters en position 2 des triglycérides. Finalement, certains auteurs ont montré que l'activité lipolytique était inductible chez certaines souches (Tsujioka et coll., 1973), mais constitutive chez d'autres (Alford & Smith, 1965). Outre la production d'esters, l'activité lipolytique de *G. candidum* permet aussi la formation de méthyle cétones par conversion d'acides gras saturés libérés (Smith & Alford, 1969). Certains de ces méthyle cétones et leurs alcools secondaires correspondants ont été identifiés par Jollivet et coll. (1994).

L'activité protéolytique de cet organisme permet également la production de composés aromatiques et a été caractérisée en partie par Gueguen & Lenoir (1975a, b, 1976). L'activité protéolytique de *G. candidum*, bien que variable d'une souche à l'autre, est comparable à celle de *Penicillium camemberti* var. *caseicolum* (Hannan & Gueguen, 1985). *G. candidum* peut produire des substances aromatiques à partir du catabolisme des acides aminés et des acides aminés soufrés (Belin, 1991). Des alcools (propanol, phenol, 2-méthylpropanol, 2-méthylbutanol, 3-méthylbutanol et phényléthanol) peuvent ainsi être produits (Degorce-Dumas et coll., 1984; Latrasse et coll., 1987; Jollivet et coll., 1994). *G. candidum* peut également effectuer la désamination des acides glutamique et aspartique (Greenberg & Ledford, 1979).

La production d'un arôme fruité par la souche de *Geotrichum candidum* ATCC 61217 a été présentée au chapitre 1. Ce chapitre-ci a pour objectifs : 1. L'étude des composés aromatiques volatils et du profil des acides organiques constituant cet arôme fruité; 2. La comparaison de l'activité lipolytique de la souche ATCC 62217 avec d'autres souches ATCC de *Geotrichum candidum* ne produisant pas d'arôme fruité; 3. Cinétique de la croissance de la souche ATCC 62217 au cours de la fermentation.

2.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.3.1 Microorganismes

La souche de *Geotrichum candidum* ATCC 62217 était maintenue sur gélose inclinée de PDA (BBL). Une suspension de spores était produite à partir d'une culture sporulée sur milieu gélosé PDA selon une méthode adaptée de Essers et coll. (1994). Les spores étaient récupérées en ajoutant 10 mL d'eau distillée stérile à chacun des plats de Petri. Une tige de verre stérile était passée sur la culture pour libérer les spores et la suspension était ensuite récupérée dans des tubes à centrifuger stériles (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie). La suspension était ensuite centrifugée pendant 15 minutes à 2800 g (Beckman GS-6, Beckman Instruments, Toronto, Ontario) et le culot de spores obtenu était lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile puis était resuspendu dans 50 mL d'eau distillée stérile. La concentration de la suspension était évaluée par détermination du nombre d'unités formant des colonies (ufc) sur milieu PDA. Les suspensions étaient conservées à 4°C.

2.3.2 Fermentations

Une journée avant l'expérience, les sacs contenant les pains blancs broyés étaient placés à la température de la pièce (environ 22°C) pour décongélation. Les milieux de fermentation étaient préparés en mélangeant 35 % de sous-produit et 65 % d'eau distillée. Le mélange était homogénéisé à l'aide d'un mélangeur électrique (model K45SS, Kitchen-Aid, St-Joseph, Michigan). Le milieu de fermentation était ensuite distribué en portions de 150 g dans des erlenmeyers de 250 mL puis inoculé avec 10^6 ufc/g de milieu. Les échantillons étaient incubés à 30 °C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute pendant 48 heures (Lab-Line Orbit Instruments, Melrose Park, Illinois). Ces conditions étaient celles produisant l'arôme le plus intense lors de la sélection de souches.

2.3.3 Analyse des composés volatils

2.3.3.1 Analyse par échantillonnage de l'espace de tête (Headspace)

Un échantillon de 5 g de ferment était placé dans un flacon pour chromatographie en phase gaz-liquide, recouvert d'une cloison de teflon puis

scellé avec une capsule d'aluminium. Une quantité de gaz était recueillie à l'aide d'un système de prélèvement des vapeurs de l'espace de tête (headspace) HP7694 (Hewlett Packard, Avondale, Pennsylvanie) avant d'être injectée automatiquement dans l'appareil pour analyse par GC/MS.

2.3.3.2 Analyse par condensation des composés volatils sur un piège froid (Cold Finger)

Un échantillon de 150 g de ferment était déposé dans un ballon de 250 mL puis chauffé à environ 60°C et agité à l'aide d'un agitateur magnétique. Une tige de verre était insérée pendant 30 secondes dans une bouteille Dewar contenant de l'azote liquide. La tige de verre refroidie était ensuite positionnée à quelques millimètres au dessus du ferment pendant 30 secondes. La condensation formée sur la tige de verre était finalement récupérée par lavage avec 2 mL de méthanol. L'opération était répétée 20 fois en utilisant la même solution de méthanol. Après filtration, l'échantillon était analysé par GC/MS.

2.3.3.3 Analyse par piégeage des composés volatils sur une cartouche d'extraction en phase solide

Un échantillon de 10 g de ferment était dilué avec 90 g de tampon phosphate de potassium à 0,05M (pH 7,5) dans une bouteille de type Drechsel de 250 mL (Quickfit; Pegasus, Agincourt, Ontario) munie d'une entrée de gaz en verre fritté de porosité no. 3. L'échantillon était chauffé à 80°C pendant 7 minutes suivi d'une purge à 100 mL d'air par minute pendant 60 minutes. Les composés volatils étaient ainsi piégés à la sortie sur une cartouche d'extraction en phase solide contenant une matrice de silice (Silica Sep-Pak; Waters, Milford, Massachusetts). La cartouche était préalablement conditionnée avec 3 volumes (6 mL) d'hexane. Les composés piégés étaient ensuite désorbés de la cartouche avec 2 mL d'acétone puis l'échantillon était filtré (0,2 μ m) et analysé par GC/FID ou GC/MS.

2.3.3.4 Analyse par GC/MS

Un chromatographe en phase gazeuse (modèle 3400; Varian Associates, Palo-Alto, Californie) était utilisé avec un spectromètre de masse Finnigan INCOS 50. La chromatographie était effectuée avec les conditions suivantes : le débit du

gaz porteur (He) était de 1,0 mL/min et l'injection se faisait dans un ratio de 50:1. La température initiale du four, 40°C, était augmentée jusqu'à 90°C à 3°C par minute, puis jusqu'à 120°C à 10°C par minute et finalement jusqu'à 240°C à 20°C par minute. Une colonne capillaire DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, Californie) de 30 m X 0,25 mm de diamètre interne était utilisée. La spectrométrie de masse était effectuée en utilisant l'ionisation par impact électronique de 70 eV avec environ 384 balayages par seconde.

2.3.3.5 Analyse par GC/FID

La séparation des composés volatils était effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse (modèle 6890; Hewlett Packard, Avondale, Pennsylvanie) dans les conditions suivantes : le débit du gaz porteur (hélium) était de 2,0 mL par minute et l'injection était faite en mode "split" dans le ratio 30:1. La température initiale du four (40°C) était augmentée jusqu'à 140°C à 15°C par minute, puis jusqu'à 150°C à 1°C par minute et finalement jusqu'à 220°C à 30°C par minute. Une colonne capillaire DB-FFAP (J&W Scientific, Folsom, Californie) de 30 m X 0,25 mm de diamètre interne était utilisée. Les composés étaient détectés en sortie de colonne par un détecteur à ionisation de flamme (FID).

2.3.3.6 Identification des composés

Les composés étaient identifiés par comparaison des temps de rétention avec des standards connus et/ou par spectrométrie de masse.

2.3.4 Analyse des acides organiques

Les acides étaient extraits à partir des milieux fermentés selon la méthode décrite par Lönner & Preve-Akesson (1988). Un mélange de 20 g de ferment et 100 mL d'eau déionisée était homogénéisé. Les échantillons étaient chauffés à 60°C dans un bain thermostaté pendant 5 minutes puis refroidis rapidement dans un bain de glace jusqu'à la température ambiante (environ 22°C), neutralisés à pH 7 avec du NaOH 1 N, soumis à une agitation magnétique pendant 30 minutes puis centrifugés pendant 15 minutes à 11300 g par minute (model J2-21, Beckman Instruments, Toronto, Ontario). Le surnageant était passé sur une cartouche sep-pak C18 (Waters, Milford, Massachusetts) et filtré

sur filtres de 0,2 μm (Costar Corporation, Cambridge, Massachusetts). La séparation était effectuée sur un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Milford, Massachusetts) muni d'une pompe (Modèle 510) et d'un injecteur automatique (WISP Modèle 710B). Les composés étaient séparés sur une colonne échangeuse d'ions ION-300 (InterAction Chromatography, San Jose, Californie) de 300 mm X 7,8 mm (diamètre interne). L'éluant utilisé était le H_2SO_4 à 0,005 N à un débit de 0,4 mL/minute à 25°C. La détection des composés était faite par un détecteur UV à longueur d'onde variable (Model 286) fixé à $\lambda=210$ nm. Deux répétitions de 2 échantillons étaient faites.

2.3.5 Détermination de l'activité lipolytique

2.3.5.1 Milieu de culture pour la production de lipases

Le milieu utilisé pour la production de lipase est une adaptation du milieu de Tsujisaka et coll. (1973), décrit par Baillargeon et coll. (1989). Ce milieu est composé de 5 % de peptone (Becton Dickinson), 0,1 % de NaNO_3 (BDH), 0,1 % de MgSO_4 (Anachemia) avec ou sans addition de 1 % d'huile d'olive (Bertolli). Le pH était ajusté (pH 7) avant stérilisation à 121°C pendant 15 minutes. La stérilisation ne cause pas de changement significatif de pH (Baillargeon et coll., 1989).

2.3.5.2 Production de lipases

Une préculture était faite en inoculant un Erlenmeyer de 250 mL contenant 65 mL de milieu avec 1 mL d'une suspension de spores contenant 10^7 à 10^8 spores / mL. Le milieuensemencé était incubé pendant 24 heures à 30 °C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute (Lab-Line Orbit Instruments, Melrose Park, Illinois). Un millilitre de cette préculture était transféré dans 65 mL de milieu frais pour une seconde incubation dans les mêmes conditions. Les cultures étaient ensuite centrifugées dans des tubes stériles (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvanie) pendant 30 minutes à 2800 g (Beckman model GS-6, Beckman Instruments, Toronto, Ontario), puis filtrée sur papier Whatmann no.1 (11-13 μm) et Whatmann GF/C (1,2 μm) afin d'obtenir un filtrat sans cellules constituant la source d'enzymes.

2.3.5.3 Essais enzymatiques

L'activité des préparations de lipases était mesurée par une méthode adaptée de Baillargeon et coll. (1989). Une émulsion d'huile d'olive (Bertolli) à 20 % et de gomme arabique (Sigma Chemical, St-Louis, Missouri) à 0,5 % était préparée dans un tampon TRIS de 50 mM (pH 8,2). L'émulsion était faite avec un homogénéisateur Polytron, modèle PT 10/35 muni d'une tige PTA 10S (Brinkmann Instruments, Mississauga, Ontario) à la vitesse 5 pendant environ 30 secondes. Ces émulsions étaient préchauffées pendant 25 minutes à 30°C puis 2 mL de préparation de lipase étaient ajoutés à 10 mL d'émulsion et le milieu réactionnel était incubé à 30 °C pendant 90 minutes sous une agitation rotative de 300 cycles par minute (Lab-Line Orbit Instruments, Melrose Park, Illinois). La réaction était arrêtée par addition de 20 mL d'éthanol à 95 % (v/v). Un témoin était préparé en arrêtant la réaction avant incubation.

Les acides gras libres produits étaient ensuite quantifiés par titrage jusqu'à pH 9,5 avec une solution de NaOH à 0,05 N en utilisant un titrimètre Titrino (modèle S719; Metrohm, Herisau, Suisse). Une unité d'activité enzymatique (lipolytique) correspond à la libération de l'équivalent d'une micromole d'acide gras libre par minute, par mL de préparation de lipase à partir de l'huile d'olive dans les conditions décrites. Trois répétitions de quatre échantillons étaient faites.

2.3.6 Courbe de croissance

La croissance était déterminée par compte du nombre d'unités formant des colonies (ufc). À différents temps d'échantillonnage, 1 g de ferment était dilué dans 9 g d'eau peptonée stérile (0,1 %). Des dilutions décimales étaient ensuite effectuées et 1 mL d'une dilution adéquate était déposé dans un pétri auquel 25 mL de PDA maintenu à 45°C était ajouté. Les géloses étaient incubées pendant 24 heures à 30°C et les ufc étaient comptées.

2.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

2.4.1 Composés aromatiques volatils

Les différentes techniques d'analyse ont permis d'identifier 14 composés faisant partie de l'arôme d'un milieu fermenté pendant 48 heures. Toutes les méthodes d'extraction des composés volatils ont été effectuées en ne chauffant pas l'échantillon à plus de 80°C pour éviter de générer de nouveaux composés aromatiques tel que prescrit par Cormier et coll. (1991). Le tableau 2.1 montre les 10 composés identifiés par analyse de l'espace de tête (headspace) à l'aide de la spectrométrie de masse. Parmi ces composés se trouvent 2 alcools, 7 esters (6 éthyliques et 1 propylique) et 1 acide gras. Le tableau 2.2 montre les composés identifiés par analyse de la condensation de l'espace de tête sur piège froid (cold finger). Cette méthode, combinée à l'analyse par spectrométrie de masse, n'a permis d'identifier que 3 alcools et a donc été peu efficace pour l'étude de composés aromatiques à l'exception des alcools. Finalement, le tableau 2.3 montre les 4 composés identifiés (esters d'éthyl d'acide gras) d'un échantillon obtenu par piégage des composés volatils sur une cartouche d'extraction en phase solide. L'identification de ces composés a été confirmée par comparaison avec des standards connus et par spectrométrie de masse. Cette méthode était efficace pour l'extraction d'esters d'éthyl d'acide gras, notamment pour ceux formés d'acides gras à courte chaîne.

Les analyses de l'arôme par échantillonnage de l'espace de tête et par condensation des volatils sur un piège froid ont permis d'identifier 4 alcools au total. La littérature scientifique rapporte la production de propanol-1, de méthyl-2 propanol-1 et de méthyl-3 butanol-1 par *Geotrichum candidum* (Latrasse et coll., 1987; Jollivet et coll., 1994). Cependant, ces composés, ainsi que l'éthanol, font également partie des composés volatils qui forment l'arôme du pain (Hironaka, 1986). Ils peuvent donc avoir été produits par *G. candidum* au cours de la fermentation et/ou être présents dans le milieu de départ fabriqué à partir de sous-produit de pains.

La plupart des esters d'éthyle d'acides gras identifiés ici ont également été formés par les souches productrices d'un arôme fruité tel que rapporté dans la

littérature (Koizumi et coll., 1982; Latrasse et coll., 1987). La production de l'ester d'éthyle d'acide acétique ainsi que des alcools est rapportée par Jollivet et coll. (1994) et semble donc être produite également par les souches ne produisant pas d'arôme fruité. La production de l'ester propylique d'acide propionique n'est rapportée par aucun de ces auteurs. Finalement, la production d'esters non éthyliques est mentionnée par Koizumi et coll. (1982) ainsi que par Latrasse et coll. (1987).

Les esters d'acide gras sont vraisemblablement les composés typiques de l'arôme fruité. Par exemple, l'ester d'éthyle d'acide isobutyrique serait l'élément principal de l'arôme de coing-ananas rapporté par Latrasse et coll. (1987). L'activité lipolytique de *G. candidum* serait en grande partie responsable de la production de ces esters. Les lipases hydrolysent la matière grasse du milieu pour libérer des acides gras. Ceux-ci sont ensuite estérifiés avec les alcools présents pour éviter leur accumulation. Par ce mécanisme, la cellule empêche l'accumulation de ces composés qui lui sont toxiques.

2.4.2 Profil des acides organiques

Le tableau 2.4 montre le profil des acides organiques dans le milieu de fermentation avant et après une fermentation de 48 heures à 30°C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute. La méthode d'analyse utilisée a permis d'identifier 6 acides organiques présents dans les milieux fermentés. Il s'agit des acides citrique, malique, lactique, acétique, fumarique et propionique. Ces acides ont été identifiés par comparaison des temps de rétention avec des standards connus. Ces acides sont produits au cours de la fermentation initiale du pain, ce qui explique leur présence dans le milieu de fermentation à base de pains. La présence d'acide propionique est aussi probablement due en grande partie à l'addition de propionate de calcium, utilisé comme agent de conservation dans le pain.

D'après nos résultats, la concentration des acides organiques diminue de façon importante au cours de la fermentation. C'est le cas pour les acides malique, acétique, fumarique et propionique alors que la concentration d'acide citrique augmente et qu'il n'y a qu'une faible variation pour l'acide lactique.

Généralement, les acides organiques, notamment ceux du cycle de Krebs, peuvent être utilisés comme donneurs d'électrons ou comme sources de carbone par le métabolisme oxydatif de la plupart des microorganismes aérobies, ce qui peut expliquer la diminution de la concentration de la majorité de ces acides. Par ailleurs, la diminution de la concentration de certains acides organiques comme les acides acétique et propionique est probablement due en partie à l'estérification. Ainsi, on peut observer que la diminution importante de la concentration de ces acides coïncide avec la production des esters correspondants (éthyliques et propyliques).

L'augmentation de la concentration d'acide citrique suggère que cette souche de *G. candidum* utilise peu ce substrat. L'assimilation de l'acide citrique est variable chez cet organisme (Gueguen & Schmidt, 1992). La concentration en acide lactique du milieu varie peu contrairement à ce qui se produit lors des fermentations de produits laitiers où *Geotrichum candidum* métabolise rapidement l'acide lactique en eau et CO₂ par oxydation. Il se peut que dans les conditions évaluées ici, *G. candidum* ne métabolise pas ou peu l'acide lactique. Le milieu utilisé (à base de pains) et les conditions de fermentation sont très différentes de celles d'un milieu laitier comme le fromage. Le sucre principal retrouvé dans les produits laitiers est le lactose mais ce sucre n'est pas assimilé par *G. candidum*, ce qui expliquerait l'utilisation rapide de l'acide lactique comme source de carbone dans les milieux laitiers. Par contre, le milieu utilisé ici contient d'autres sucres comme le glucose et le fructose qui peuvent être utilisés par *G. candidum*, ce qui retarderait l'utilisation de l'acide lactique. De plus, après 48 heures de fermentation, il est possible qu'il y ait apparition notable d'une succession de la flore bactérienne contaminante formant un peu d'acide lactique. Malgré qu'ils soient présents seulement en faible concentration, les acides organiques contribuent certainement à l'arôme global des milieux fermentés.

2.4.3 Activité lipolytique

Il serait intéressant de savoir ce qui fait en sorte que certaines souches de *G. candidum* produisent un arôme fruité alors que d'autres ne produisent pas de tel arôme dans les mêmes conditions. Une explication plausible est que les

souches productrices d'arôme fruité ont une activité lipolytique supérieure aux autres souches. La figure 2.1 montre l'activité lipolytique de la souche ATCC 62217 (productrice d'arôme fruité) en comparaison avec deux autres souches ATCC testées au cours de l'étape de sélection (chapitre 1). L'activité lipolytique des trois souches est très semblable, variant de 1,86 à 2,28 U.E. par mL de filtrat. Bien que la souche ATCC 62217 a l'activité constitutive la plus forte, les trois souches sont fortement inductibles; la présence de matières grasses (huile d'olive à 1 %) dans le milieu de culture augmente considérablement l'activité lipolytique. Il semble donc que le niveau d'activité lipolytique n'explique pas la capacité à produire l'arôme fruité. Il existe une grande hétérogénéité au niveau du système lipolytique chez cet organisme. Certains auteurs ont démontré que l'activité lipolytique de *G. candidum* était inductible (Tsujioka et coll., 1973) alors que d'autres ont affirmé le contraire (Alford & Smith, 1965). Il existe donc une variabilité dans la production, la spécificité et l'activité des lipases chez *Geotrichum candidum* (Sidebottom et coll., 1991). Sugihara et coll. (1991) ont mentionné qu'il pouvait y avoir jusqu'à 4 lipases différentes chez *G. candidum*. Donc, la capacité à produire un arôme fruité peut être due à une lipase qui n'est présente que chez certaines souches, ou simplement à des proportions variables des différentes lipases entre les souches.

2.4.4 Croissance de *Geotrichum candidum* ATCC 62217

La figure 2.2 montre l'évolution de la croissance de *G. candidum* ATCC 62217 dans le milieu au cours de la fermentation à 30°C sous agitation rotative de 300 cycles par minute. L'apparition de l'arôme fruité après 24 heures correspond au début de la phase stationnaire de croissance. La production maximale de l'arôme obtenue après 48 heures correspond aussi au maximum de croissance enregistré ($8,7 \times 10^7$ ufc/g de milieu). Ces résultats sont en accord avec ceux de Latrasse et coll. (1987) qui rapportent que le maximum de biomasse et l'intensité maximale de l'arôme coïncident après 3 jours de croissance à 27°C et agitation rotative de 200 cycles par minute.

TABEAU 2.1
COMPOSÉS AROMATIQUES IDENTIFIÉS PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE
TÊTE (HEADSPACE) D'UN MILIEU CONTENANT 35 % DE PAINS BLANCS
BROYÉS, FERMENTÉ PAR *Geotrichum candidum* ATCC 62217 PENDANT
48 HEURES À 30°C ET 300 CYCLES PAR MINUTE.

Pic No.	Composé	Ident.	Arôme ¹
1	Acétate d'éthyle	MS	Ananas, éther
2	Éthanol	MS	
3	Propionate d'éthyle	MS	Sucré, fruité, éther, rhum, parfumé
4	n.i.		
5	Propionate de propyle	MS	Xérès
6	Isovalérate d'éthyle	MS	Fruité, pommes sur dilution
7	n.i.		
8	Méthyl-2 propanol-1	MS	
9	Valérate d'éthyle	MS	Fruité, pommes
10	2-buténoate d'éthyle	MS	Rhum, éther
11	n.i.		
12	n.i.		
13	Caproate d'éthyle	MS	Fruité, vin, pommes, bananes, brandy
14	n.i.		
15	Acide 2-hexénoïque	MS	Gras, âcre, fruité, sucré sur dilution

Légende :

n.i.; non identifié.

MS; identifié par spectrométrie de masse.

¹ ; correspond aux propriétés organoleptiques décrites dans le catalogue "Flavors & Fragrances" de Aldrich Chemical Company, Inc. (1995).

TABLEAU 2.2
COMPOSÉS AROMATIQUES IDENTIFIÉS PAR ANALYSE SUR PIÈGE FROID
(COLD FINGER) D'UN MILIEU CONTENANT 35 % DE PAINS BLANCS
BROYÉS, FERMENTÉ PAR *Geotrichum candidum* ATCC 62217 PENDANT
48 HEURES À 30°C ET 300 CYCLES PAR MINUTE.

Pic No.	Composé	Ident.	Arôme ¹
1	n.i.		
2	n.i.		
3	n.i.		
4	n.i.		
5	Propanol-1	MS	Alcool, sucré
6	n.i.		
7	Méthyl-2 propanol-1	MS	
8	Méthyl-3 butanol-1	MS	

Légende :

n.i.; non identifié.

MS; identifié par spectrométrie de masse.

¹ ; correspond aux propriétés organoleptiques décrites dans le catalogue "Flavors & Fragrances" de Aldrich Chemical Company, Inc. (1995).

TABLEAU 2.3
 COMPOSÉS AROMATIQUES IDENTIFIÉS PAR ANALYSE SUR CARTOUCHE
 D'EXTRACTION EN PHASE SOLIDE D'UN MILIEU CONTENANT 35 % DE
 PAINS BLANCS BROYÉS, FERMENTÉ PAR *Geotrichum candidum* ATCC
 62217 PENDANT 48 HEURES À 30°C ET 300 CYCLES PAR MINUTE.

Pic No.	Composé	Ident.	Arôme ¹
1	Solvant		
2	Solvant		
3	Acétone (solvant)		
4	Acétate d'éthyle	GC/MS	Ananas, éther
5	n.i.		
6	n.i.		
7	n.i.		
8	Propionate d'éthyle	GC/MS	Sucré, fruité, éther, rhum, parfumé
9	Isobutyrate d'éthyle	GC/MS	Agrumes
10	Butyrate d'éthyle	GC/MS	Fruité, parfumé, sucré, éther, bananes, ananas
11	n.i.		
12	n.i.		
13	n.i.		
14	n.i.		
15	n.i.		
16	n.i.		
17	Solvant		

Légende :

n.i.; non identifié.

GC; identifié par chromatographie en phase gazeuse par comparaison avec le temps de rétention de standards.

MS; identifié par spectrométrie de masse.

¹ ; correspond aux propriétés organoleptiques décrites dans le catalogue "Flavors & Fragrances" de Aldrich Chemical Company, Inc. (1995).

TABLEAU 2.4
 PROFIL DE SIX ACIDES ORGANIQUES DANS UN MILIEU CONTENANT 35 % DE PAINS
 BLANCS BROYÉS AVANT (T=0 heures) ET APRES (T=48 heures) FERMENTATION
 AVEC *Geotrichum candidum* ATCC 62217 A 30°C SOUS UNE
 AGITATION ROTATIVE DE 300 CYCLES PAR MINUTE¹.

Temps	Acides Organiques (ppm)					
	Citrique	Malique	Lactique	Acétique	Fumarique	Propionique
T=0 heures	846	315	220	56	13	409
T=48 heures	1193	129	236	8	1	153

¹ Les valeurs sont exprimées en parties par million (ppm) et sont obtenues à partir de courbes-étalons de standards.

Les valeurs sont la moyenne de 2 répétitions de 2 échantillons (moyenne de 4 valeurs).

Coefficient de variation moyen : 22%.

FIGURE 2.1
ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE DE *Geotrichum candidum* AVEC OU SANS AJOUT
DE 1% D'HUILE DANS LE MILIEU DE CULTURE.
(3 répétitions de 4 échantillons)

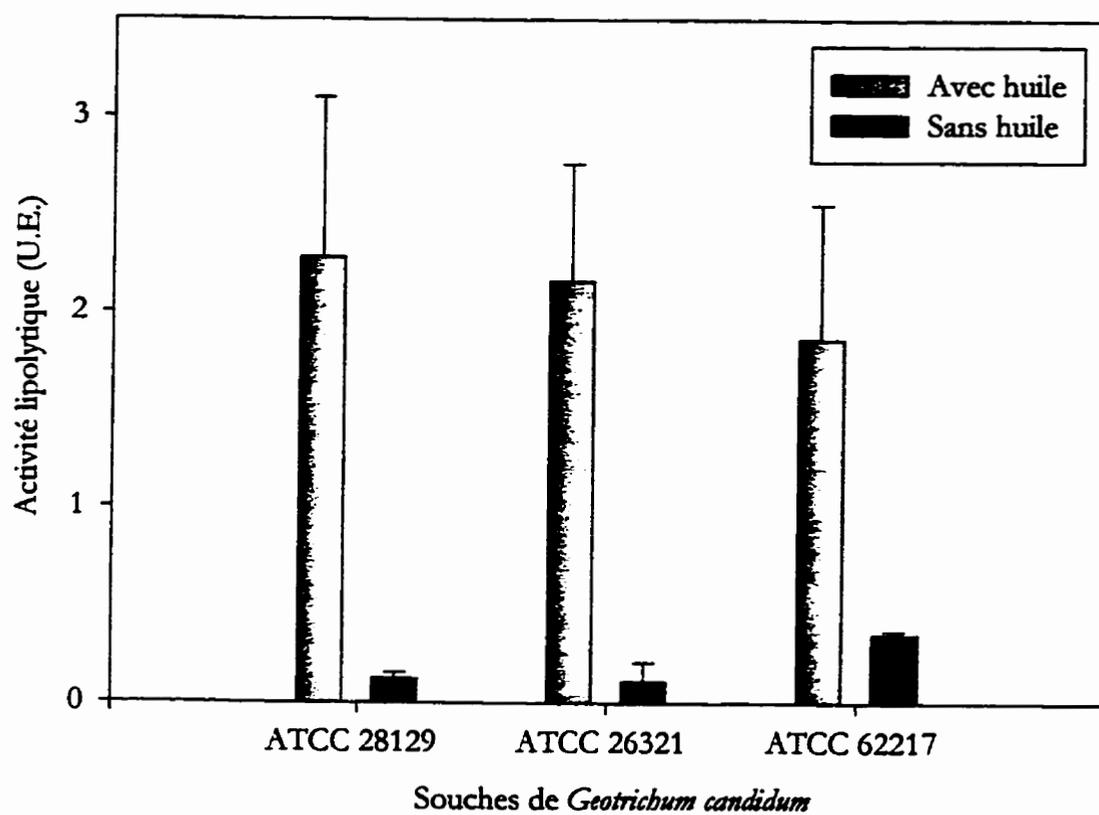
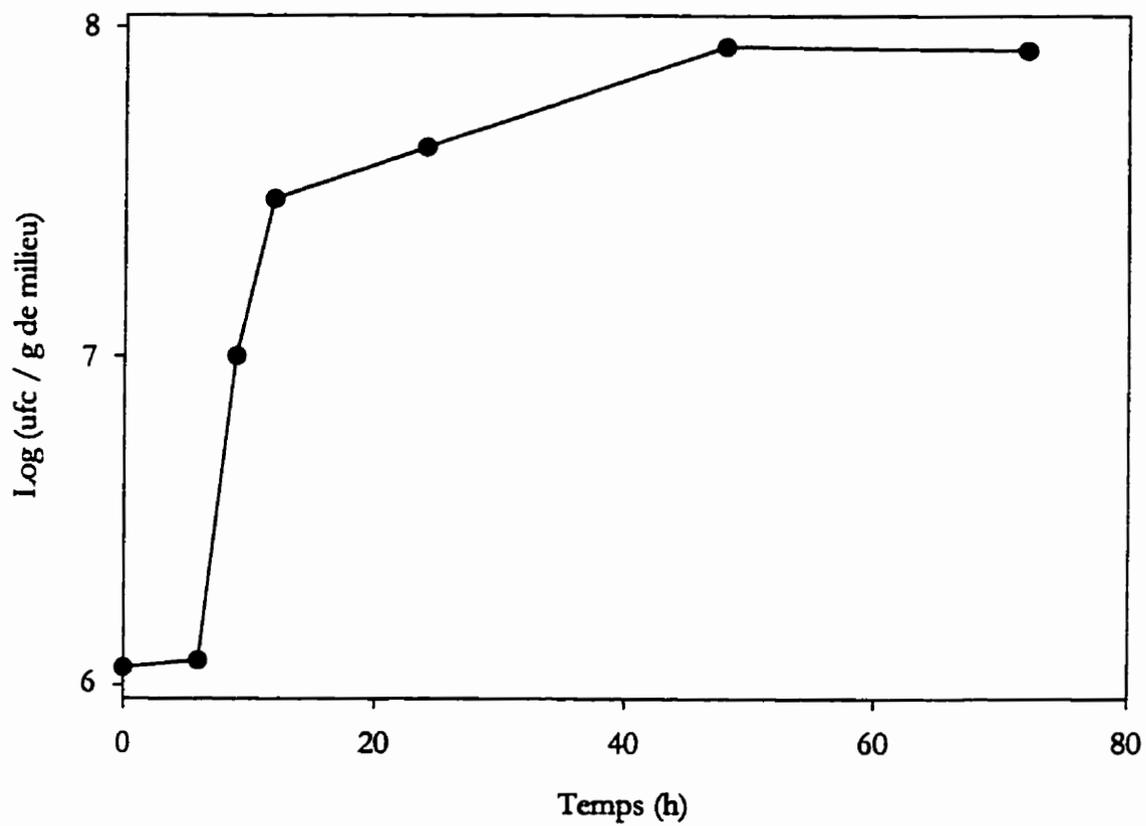


FIGURE 2.2
CROISSANCE DE *Geotrichum candidum* ATCC 62217 À 30°C ET
300 CYCLES PAR MINUTE DANS UN MILIEU CONTENANT 35 %
DE PAINS BROYÉS.



2.5 CONCLUSION

Les différentes méthodes d'analyses ont permis d'identifier plusieurs des composés aromatiques volatils constituant l'arôme des milieux fermentés. Plusieurs esters d'éthyle d'acide gras, deux alcools, un ester propylique et l'acide 2-hexénoïque ont notamment été identifiés par analyse de l'espace de tête (Headspace) et par extraction en phase solide. L'analyse par piège froid (Coldfinger) a pour sa part permis l'identification d'alcools seulement. L'analyse des acides organiques a démontré une diminution de la concentration des acides organiques dosés à l'exception de l'acide citrique qui augmente et de l'acide lactique qui varie peu. La comparaison de l'activité lipolytique de la souche ATCC 62217 avec deux autres souches ATCC de *G. candidum* ne produisant pas d'arôme fruité a permis de constater que l'activité lipolytique de la souche productrice d'arôme est comparable avec celle des autres souches évaluées. Finalement, le suivi de la croissance de *Geotrichum candidum* ATCC 62217 au cours de la fermentation permet de constater que la production d'arôme après 48 heures correspond avec la phase stationnaire de croissance du microorganisme.

La prochaine étape de cette étude consistera à évaluer l'effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur (1) la production de quatre des composés aromatiques sélectionnés, (2) le profil des acides organiques et (3) la croissance du microorganisme. L'étude de l'effet de ces paramètres devrait permettre d'améliorer la production de composés aromatiques au cours de la fermentation.

CHAPITRE 3

OPTIMISATION DE QUELQUES CONDITIONS DE FERMENTATION PAR *Geotrichum candidum*

3.1 RÉSUMÉ

Un arôme fruité est produit par *G. candidum* ATCC 62217 à partir de pains blancs broyés. Les essais d'optimisation de la production de cet arôme ont porté sur l'effet combiné de la température (20°C, 25°C et 30°C) et de l'agitation (0 ou 300 cycles par minute) en fonction du temps sur la production des esters d'éthyle des acides acétique, propionique, butyrique et isobutyrique. L'agitation est essentielle pour la production de ces composés aromatiques alors que l'effet de la température est moindre. Une température plus élevée (30°C) accélère la production des composés aromatiques mais les quantités obtenues à plus faibles températures (25 ou 20°C) sont souvent comparables. La concentration des acides organiques diminue généralement en fonction du développement de *G. candidum* à l'exception de l'acide citrique qui présente le profil contraire. Une forte augmentation de la concentration des acides lactique et acétique après 72 heures de fermentation à 30°C suggère le développement de la flore bactérienne contaminante dans ces conditions. La croissance de *G. candidum* est plus rapide à 30°C mais la quantité de biomasse obtenue à 20°C est comparable.

3.2 INTRODUCTION

Un arôme fruité agréable est produit par *G. candidum* ATCC 62217 sur un substrat constitué de 65 % d'eau et de 35 % de pains broyés inoculé avec 10⁶ spores par gramme de milieu. La production de l'arôme survient notamment après fermentation de ce milieu pendant 24 et 48 heures à une température de 30°C sous une agitation rotative de 300 cycles par minutes. La production d'arôme par les microorganismes est une conséquence directe de leur métabolisme et dépend donc directement des conditions de culture.

Latrasse et coll. (1987) ainsi que Koizumi et coll. (1982) rapportent la production d'un arôme fruité par certaines souches de *G. candidum*. Latrasse et coll. (1987) ont étudié l'influence de la source de carbone et d'azote sur la production de l'arôme mais il y a peu d'informations dans la littérature sur l'influence des paramètres physico-chimiques. L'influence de ces paramètres sur la production d'arôme par d'autres microorganismes a déjà été démontrée (Collins, 1972; Raymond et coll., 1990).

Les esters d'éthyle d'acides gras à courte chaîne, constituant les arômes fruités, sont généralement produits par l'activité lipolytique des microorganismes. Les facteurs physico-chimiques qui influencent le métabolisme du microorganisme, sont susceptibles d'affecter la production d'enzymes et par conséquent la production d'un arôme fruité. De plus, ces facteurs peuvent modifier directement l'activité des enzymes produites. Baillargeon et coll., (1989) ont démontré que la production de lipase était supérieure à 30°C qu'à 20°C, bien qu'à cette température, l'activité était maintenue plus longtemps. L'activité lipolytique diminuait en fonction de l'agitation entre 300 et 0 cycles par minute. L'étude de l'effet de certains paramètres physico-chimiques sur la production d'un arôme fruité par *G. candidum* ATCC 62217 devrait permettre d'améliorer la production de cet arôme dans un milieu à base de pains blancs broyés.

Le travail de ce chapitre a pour objectif l'étude de l'effet de la température, de l'agitation et du temps sur la production de quatre composés aromatiques

produits par *G. candidum* ATCC 62217 au cours de la fermentation. L'effet de ces paramètres sur la croissance du microorganisme et sur le profil des acides organiques est également observé.

3.3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.3.1 Microorganismes

La souche de *Geotrichum candidum* ATCC 62217 était maintenue sur gélose inclinée (PDA; BBL, Cockeysville, Maryland) à 4°C recouverte d'huile de paraffine (Anachemia, Montréal, Québec) préalablement stérilisée à 160°C pendant 2 heures dans un four à sec. Une suspension de spores était produite de la façon suivante; une colonie isolée sur gélose était resuspendue dans 5 mL d'eau peptonée (0,1 %) stérile. 1 mL de cette suspension était ajoutée à 100 mL de malt extract broth (MEB ; Oxoid, Melbourne, Australie) dans un Erlenmeyer de 250 mL. La culture était incubée pendant 48 heures à 30°C sous une agitation rotative de 300 cycles par minute (Lab-Line Orbit Instruments Inc., Melrose Park, Illinois). Les spores produites étaient ensuite récupérées par centrifugation de 15 minutes à 2800 g (Beckman GS-6, Beckman Instruments, Toronto, Ontario) et le culot de spores obtenu était lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile puis resuspendu dans 50 mL d'eau distillée stérile. La concentration de la suspension était évaluée par détermination du nombre d'unités formant des colonies (ufc) sur milieu PDA et/ou par compte sur un hémacymètre. Les suspensions étaient conservées à 4°C.

3.3.2 Fermentations

Une journée avant l'expérience, les sacs contenant les pains blancs broyés étaient placés à la température de la pièce (environ 22°C) pour décongélation. Les milieux de fermentation étaient préparés en mélangeant 35 % de pains blancs broyés et 65 % d'eau distillée. Le mélange était homogénéisé à l'aide d'un mélangeur électrique (model K45SS, Kitchen-Aid, St-Joseph, Michigan). Le milieu de fermentation était ensuite inoculé avec 10^6 ufc/g de milieu puis distribué en portions de 150 g dans des erlenmeyers de 250 mL. Les échantillons étaient incubés à 20°C, 25°C ou 30°C avec (300 cycles par minute) ou sans agitation rotative dans un incubateur (Lab-Line Orbit Instruments Inc., Melrose Park, Illinois) muni d'une plaque agitatrice et d'une tablette fixe. Des échantillons étaient prélevés pour analyse après 24, 48 et 72 heures d'incubation. Une solution de caproate de méthyle était ajoutée à une concentration de 100 ppm au milieu fermenté comme standard interne.

3.3.3 Analyse par piégeage des composés volatils sur une cartouche d'extraction en phase solide

Un échantillon de 10 g de ferment était dilué avec 90 g de tampon phosphate de potassium à 0,05M (pH 7,5) dans une bouteille de type Drechsel 250 mL (Quickfit; Pegasus, Agincourt, Ontario) munie d'une entrée de gaz en verre fritté de porosité no. 3. L'échantillon était chauffé à 80°C pendant 7 minutes suivi d'une purge à 100 mL d'air par minute pendant 60 minutes. Les composés volatils étaient ainsi piégés à la sortie sur une cartouche d'extraction en phase solide contenant une matrice de silice (Silica Sep-Pak) (Waters, Milford, Massachusetts). La cartouche était préalablement conditionnée avec 3 volumes (6 mL) d'hexane. Les composés piégés étaient ensuite désorbés de la cartouche avec 2 mL d'acétone puis l'échantillon était filtré (0,2 μ m) et analysé par GC/FID.

3.3.4 Analyse par GC/FID

La séparation des composés volatils était effectuée sur un chromatographe en phase gazeuse (modèle 6890; Hewlett Packard, Avondale, Pennsylvanie) dans les conditions suivantes : le débit du gaz porteur (hélium) était de 2,0 mL par minute et l'injection était faite en mode "split" dans le ratio 30:1. La température initiale du four (40°C) était augmentée jusqu'à 140°C à 15°C par minute, puis jusqu'à 150°C à 1°C par minute et finalement jusqu'à 220°C à 30°C par minute. Une colonne capillaire DB-FFAP (J&W Scientific, Folsom, Californie) de 30 m X 0,25 mm de diamètre interne était utilisée. Les composés étaient détectés en sortie de colonne par un détecteur à ionisation de flamme (FID).

3.3.5 Analyse des acides organiques

Les acides étaient extraits à partir des milieux fermentés selon la méthode décrite par Lönner & Preve-Akesson (1988). Un mélange de 20 g de milieu et 100 mL d'eau déionisée était homogénéisé. Les échantillons étaient chauffés à 60°C dans un bain thermostaté pendant 5 minutes puis refroidis rapidement dans un bain de glace jusqu'à la température ambiante (environ 22°C), neutralisés à pH 7 avec du NaOH 1 N, soumis à une agitation magnétique pendant 30 minutes puis centrifugés pendant 15 minutes à 11300 g (modèle J2-

21, Beckman Instruments, Toronto, Ontario). Le surnageant était passé sur une cartouche sep-pak C18 (Waters, Milford, Massachusetts) et filtré sur filtres de 0,2 μm (Costar Corporation, Cambridge, Massachusetts). La séparation était effectuée sur un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Waters, Milford, Massachusetts) muni d'une pompe (Modèle 510) et d'un injecteur automatique (WISP Modèle 710B). Les composés étaient séparés sur une colonne échangeuse d'ions ION-300 (InterAction Chromatography, San Jose, Californie) de 300 mm X 7,8 mm (diamètre interne). L'éluant utilisé était le H_2SO_4 à 0,005 N à un débit de 0,4 mL/minute à 25°C. La détection des composés était faite par un détecteur UV à longueur d'onde variable (Modèle 286) fixé à $\lambda=210$ nm. Deux répétitions de 2 échantillons étaient faites.

3.3.6 Courbes de croissance

La croissance était déterminée par compte du nombre d'unités formant des colonies (ufc). À différents temps d'échantillonnage, 1 g de ferment était dilué dans 9 g d'eau peptonée stérile (0,1 %). Des dilutions décimales étaient ensuite effectuées et 1 mL d'une dilution adéquate était déposé dans un plat de Petri auquel 25 mL de PDA maintenu à 45°C était ajouté. Les géloses étaient incubées pendant 24 heures à 30°C et les ufc étaient comptées.

3.4 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.4.1 Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la production de composés aromatiques volatils

Les résultats présentés à la figure 3.1 montrent que l'agitation a un effet critique sur la production de composés aromatiques par *Geotrichum candidum*. En fait, la production des quatre composés testés est pratiquement nulle en absence d'agitation à toutes les températures, à l'exception du propionate d'éthyle et de l'acétate d'éthyle produits en très faibles quantités à 30°C. L'agitation permet une aération supérieure du milieu de fermentation, un paramètre important pour un organisme aérobic comme *G. candidum*. L'agitation du milieu de culture favorise également la mise en contact des cellules et des éléments nutritifs de même que des enzymes et de leurs substrats. Baillargeon et coll., (1989) ont aussi démontré que la production de lipases par *G. candidum* augmentait en fonction de la vitesse d'agitation entre 0 et 300 cycles par minute à 30°C. La lipase étant l'enzyme responsable de la production des esters d'éthyle d'acides gras, les conditions favorisant la production de lipases sont donc susceptibles de favoriser également la production d'arôme fruité.

L'effet de la température est moins important. La production de composés aromatiques est plus rapide à 30°C pour les composés testés à l'exception de l'acétate d'éthyle qui est produit sensiblement à la même vitesse à 25 et à 30°C. À 30°C, les quantités maximales sont généralement atteintes après 48 heures de fermentation. À 25°C, la concentration de propionate d'éthyle atteint également un maximum après 48 heures alors que la concentration des autres composés augmente de façon plus ou moins importante de 48 à 72 heures. Une durée de fermentation de 72 heures ne permet pas d'atteindre la production maximale d'aucun des 4 composés à 20°C. Certains des composés volatils pourraient donc être produits en plus grande quantité à 20°C en prolongeant la fermentation au delà de 72 heures. Cependant, cette option serait moins intéressante à l'échelle industrielle à cause des coûts supplémentaires

qu'entraîne une fermentation plus longue à une température nécessitant un refroidissement (Raymond et coll., 1990).

Les conditions de fermentation étudiées ont permis de produire un excellent rendement de composés aromatiques, soit un maximum de 63 ppm d'acétate d'éthyle, 162 ppm de propionate d'éthyle, 24 ppm de butyrate d'éthyle et de 65 ppm d'isobutyrate d'éthyle. La production de propionate d'éthyle est particulièrement élevée. Le propionate de calcium est un ingrédient utilisé régulièrement dans les pâtes à pain pour prévenir le développement des moisissures. Il est donc plausible que cet ingrédient soit une source importante d'acide propionique servant de précurseur à la production du propionate d'éthyle. Les quantités produites d'esters d'éthyle des acides propionique, butyrique et isobutyrique rapportées par Latrasse et coll., (1987) étaient toutes inférieures à 1 ppm. Cependant, le milieu de culture utilisé était un milieu synthétique contenant 30 g par litre d'une source de carbone (glycérol ou glucose) et 0,9 g par litre d'équivalent azote. Koizumi et coll., (1982) ont obtenu 53,8 à 102,85 ppm d'acétate d'éthyle et 4,29 à 5,69 ppm de butyrate d'éthyle avec trois souches de *G. candidum* sur un milieu complexe appelé *Koji* (culture fongique d'*Aspergillus oryzae* ou d'*A. soyae* dans un milieu de céréales cuites et/ou de fèves de soja). Aussi, aucun essai d'optimisation n'a été fait par ces auteurs. Un milieu de culture élémentaire contenant une source de carbone et d'azote est suffisant pour la production, mais en très faible quantité, des composés aromatiques. Par contre, un milieu plus riche et complexe, comme le milieu à base de sous-produits de pain, contient suffisamment d'éléments nécessaires pour produire les composés aromatiques en beaucoup plus grande quantité.

3.4.2 Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur le profil des acides organiques

Tel que montré aux tableaux 3.1 (30°C), 3.2 (25°C) et 3.3 (20°C), l'agitation accélère la disparition des acides organiques en fonction du temps. Avec agitation, les concentrations des acides propionique, fumarique et malique diminuent fortement après 72 heures alors la concentration de l'acide acétique

baisse surtout après 48 heures. Cette diminution de la concentration de ces acides organiques est observée à toutes les températures. Par contre, sans agitation, cette diminution est fortement ralentie. Comme nous l'avons mentionné au chapitre 2, ces acides organiques peuvent être métabolisés comme source de carbone ou comme donneurs d'électrons. Les acides acétique et propionique sont également estérifiés pour produire les esters d'éthyle correspondants. De ce fait, la transformation de ces acides s'accélère dans les conditions de température et d'agitation favorisant la multiplication de *G. candidum*.

La concentration d'acide citrique diminue au cours des fermentations sans agitation et augmente avec agitation, à l'exception d'une forte baisse à 30°C entre 48 à 72 heures. L'augmentation de la concentration d'acide citrique dans les conditions favorisant le développement de *G. candidum* suggère que l'activité métabolique de cet organisme entraîne la production d'acide citrique. Par ailleurs, cet acide n'est pas assimilable comme source de carbone par toutes les souches de *G. candidum* (Gueguen & Schmidt, 1992). La forte diminution de la concentration d'acide citrique entre 48 et 72 heures à 30°C coïncide avec la forte augmentation de la concentration d'acide lactique discutée plus loin et pourrait donc être attribuable au métabolisme de la flore bactérienne contaminante.

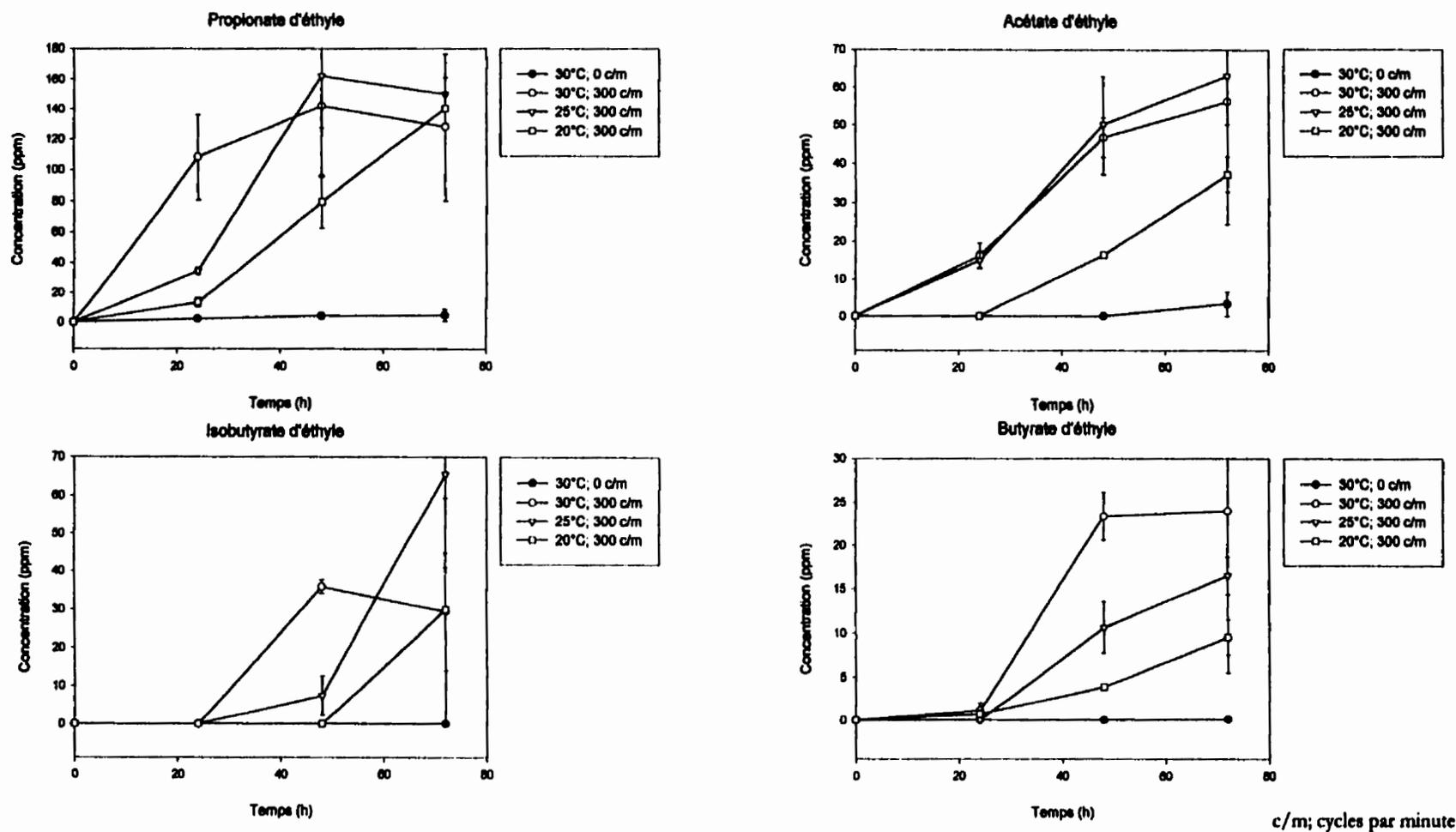
La concentration d'acide lactique diminue légèrement de 0 à 72 heures à 20 et 25°C, mais augmente à 30°C, surtout entre 48 et 72 heures. Après une diminution de concentration entre 0 et 48 heures, la concentration d'acide acétique augmente également de 48 à 72 heures. L'augmentation de ces acides s'explique probablement par la présence de bactéries contaminantes ayant une activité fermentaire. Selon la forte concentration d'acide lactique présente après 72 heures à 30°C, il semble que le développement de ces contaminants soit beaucoup plus important à 30 °C qu'aux températures plus basses. La flore contaminante étant moins bien maîtrisée, on note aussi qu'à 30°C le coefficient de variation est plus élevé qu'à 20 ou 25°C. Une température inférieure à 30°C favorise le développement de *Geotrichum candidum* par rapport au développement de la flore contaminante. Enfin, le suivi de l'acide

lactique pourrait être un bon paramètre pour évaluer le développement des contaminants.

3.4.3 Effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la croissance de *Geotrichum candidum* ATCC 62217

La figure 3.2 présente les courbes de croissance de *Geotrichum candidum* à différentes températures avec ou sans agitation. Tel que prévu pour un organisme aérobic, les résultats obtenus démontrent que l'agitation a un effet important sur la croissance. Sans agitation, la vitesse de croissance et la biomasse obtenues sont fortement réduites. Comme nous l'avons mentionné, l'agitation permet une aération supérieure, mais aussi un meilleur contact entre les cellules et les éléments nutritifs. Cet effet est particulièrement important ici du fait que le milieu employé est semi-liquide et visqueux. C'est à 25 et 30°C que la croissance est la plus rapide mais la concentration d'unités formant des colonies est comparable à toutes les températures entre 24 et 72 heures de croissance. Ces résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus pour certains composés aromatiques dont la quantité produite était parfois plus faible à 20°C. La température aurait un effet notable mais relativement faible sur la capacité du microorganisme à produire des composés aromatiques. Cet effet peut s'expliquer en partie par le fait que le système lipolytique responsable de la formation des esters d'éthyle d'acides gras peut avoir son activité maximale dans des conditions différentes de celles de la croissance du microorganisme. La littérature rapporte que la production de lipase est favorisée dans les conditions favorisant également la croissance du microorganisme (Chander & Klostermeyer, 1983). Cependant, les enzymes ainsi produites peuvent avoir une activité maximale dans des conditions différentes. Finalement, plusieurs composés aromatiques, dont les esters d'éthyl d'acides gras, sont des métabolites secondaires et leur production coïncide donc avec la phase de croissance stationnaire du microorganisme (Lanza et coll., 1976; Scharpf et coll., 1986). C'est probablement pour cette raison que ces composés aromatiques apparaissent plus tardivement à 20°C où la phase stationnaire de croissance est également plus tardive.

FIGURE 3.1
EFFET DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'AGITATION EN FONCTION DU TEMPS SUR
LA CONCENTRATION DE QUATRE COMPOSÉS AROMATIQUES VOLATILS PRODUITS PAR
Geotrichum candidum **DANS UN MILIEU CONTENANT 35 % DE PAINS BLANCS BROYÉS.**
(2 RÉPÉTITIONS DE 2 ÉCHANTILLONS)



c/m; cycles par minute

TABEAU 3.1
PROFIL DE SIX ACIDES ORGANIQUES EN FONCTION DU TEMPS DANS UN MILIEU CONTENANT 35 %
DE PAINS BLANCS BROYÉS, FERMENTÉ AVEC *Geotrichum candidum* ATCC 62217 À 30°C
AVEC (300 CYCLES PAR MINUTE) OU SANS (0 CYCLE PAR MINUTE) AGITATION¹.

Temps (h)	Acides organiques (ppm)											
	Citrique		Malique		Lactique		Acétique		Fumarique		Propionique	
	Agitation(cycles par minute)											
	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300
0	846	---	315	---	219	---	56	---	13	---	409	---
24	762	876	319	270	245	227	45	21	13	11	377	371
48	576	1193	256	129	211	236	56	8	11	1	323	153
72	254	188	180	94	1623	2331	250	67	6	tr	333	99

¹Les valeurs sont exprimées en parties par million (ppm) et sont obtenues à partir de courbes-étalons de standards.

Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 répétitions de 2 échantillons (moyenne de 4 valeurs).

Coefficient de variation moyen : 33%.

TABLEAU 3.2
PROFIL DE SIX ACIDES ORGANIQUES EN FONCTION DU TEMPS DANS UN MILIEU CONTENANT 35 %
DE PAINS BLANCS BROYÉS, FERMENTÉ AVEC *Geotrichum candidum* ATCC 62217 À 25°C
AVEC (300 CYCLES PAR MINUTE) OU SANS (0 CYCLE PAR MINUTE) AGITATION¹.

Temps (h)	Acides organiques (ppm)											
	Citrique		Malique		Lactique		Acétique		Fumarique		Propionique	
	Agitation(cycles par minute)											
	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300
0	846	---	315	---	219	---	56	---	13	---	409	---
24	670	861	308	227	237	193	51	23	12	9	361	407
48	371	1243	267	114	209	165	35	6	10	1	388	207
72	385	1164	270	83	242	153	36	13	12	tr	316	132

¹Les valeurs sont exprimées en parties par million (ppm) et sont obtenues à partir de courbes-étalons de standards.

Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 répétitions de 2 échantillons (moyenne de 4 valeurs).

Coefficient de variation moyen : 21%.

TABLEAU 3.3
PROFIL DE SIX ACIDES ORGANIQUES EN FONCTION DU TEMPS DANS UN MILIEU CONTENANT 35 %
DE PAINS BLANCS BROYÉS, FERMENTÉ AVEC *Geotrichum candidum* ATCC 62217 À 20°C
AVEC (300 CYCLES PAR MINUTE) OU SANS (0 CYCLE PAR MINUTE) AGITATION¹.

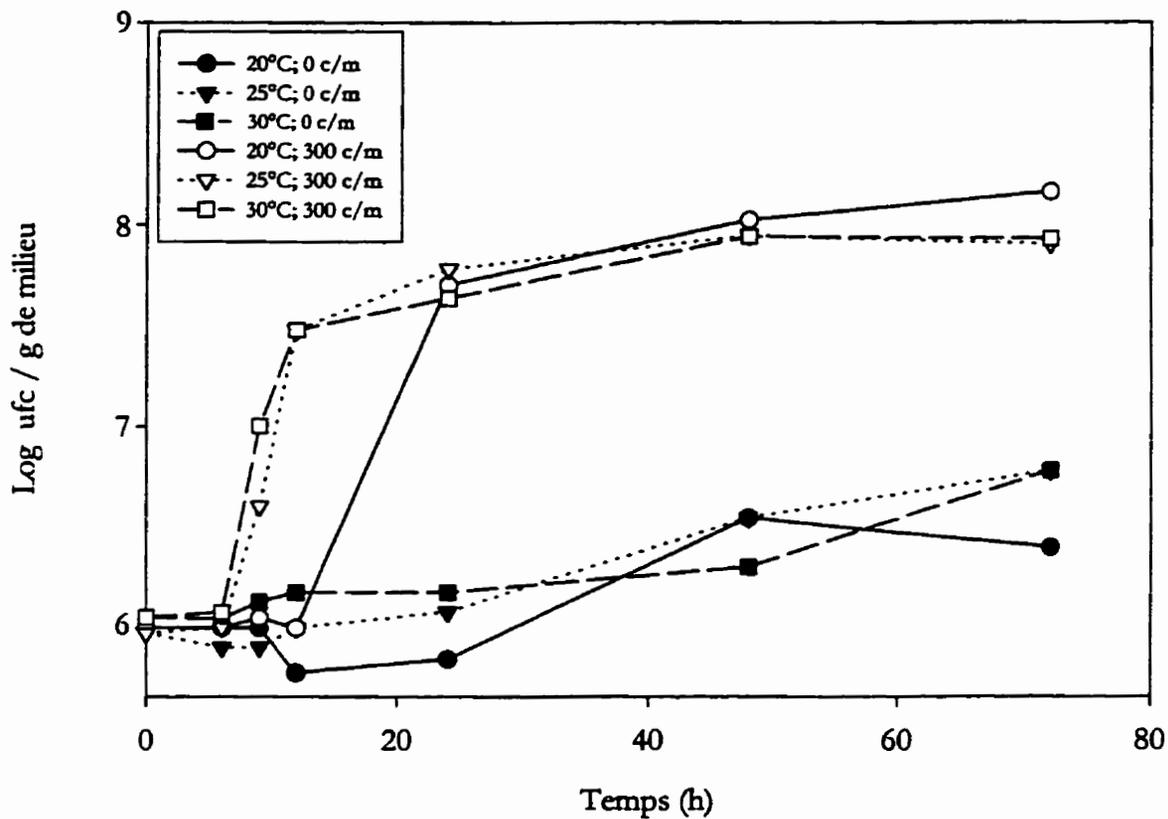
Temps (h)	Acides organiques (ppm)											
	Citrique		Malique		Lactique		Acétique		Fumarique		Propionique	
	Agitation(cycles par minute)											
	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300	0	300
0	846	---	315	---	219	---	56	---	13	---	409	---
24	706	894	280	301	228	208	41	26	11	10	446	410
48	486	1057	237	143	177	127	38	3	11	5	287	296
72	472	1245	223	92	398	123	45	12	12	3	322	197

¹Les valeurs sont exprimées en parties par million (ppm) et sont obtenues à partir de courbes-étalons de standards.

Les valeurs présentées sont la moyenne de 2 répétitions de 2 échantillons (moyenne de 4 valeurs).

Coefficient de variation moyen : 22%.

FIGURE 3.2
EFFET DE LA TEMPÉRATURE ET DE L'AGITATION EN FONCTION
DU TEMPS SUR LA CROISSANCE DE *Geotrichum candidum* ATCC 62217
DANS UN MILIEU CONTENANT 35 % DE PAINS BROYÉS.



c/m; cycles par minute

3.5 CONCLUSION

Les quantités de composés aromatiques produites dans les conditions testées dépassent largement les quantités rapportées précédemment dans la littérature. Les résultats obtenus ont démontré l'importance de l'agitation pour le développement de *Geotrichum candidum* et par conséquent la production de composés aromatiques volatils par cet organisme. La température est un facteur beaucoup moins important, bien que la vitesse de production des composés aromatiques étudiés soit généralement plus rapide à 30°C, les quantités produites à 25 et 20°C sont souvent comparables. L'activité métabolique de *G. candidum* entraîne une diminution de la concentration des acides organiques étudiés à l'exception de l'acide citrique dont la concentration augmente au cours de la fermentation. La forte production des acides lactique et acétique après 48 heures de fermentation à 30°C suggère le développement des contaminants présents dans le milieu. La vitesse de développement de *G. candidum* est plus rapide à 25 et 30°C mais la quantité de biomasse obtenue à 20°C est comparable.

L'étude de plusieurs autres paramètres de fermentation serait nécessaire pour stimuler la production de composés aromatiques par *G. candidum* ATCC 62217. L'optimisation de la composition du milieu de fermentation est aussi souhaitable. Cette souche de *Geotrichum candidum* présente des aptitudes aromatiques très intéressantes qui méritent d'être étudiées plus en détail.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire a permis d'identifier une souche du mycète *Geotrichum candidum*, produisant un arôme fruité agréable sur un substrat à base de pains blancs broyés. L'objectif visé par cette étude était d'évaluer la capacité de levures utilisées comme ferment d'affinage en fromagerie, à produire des composés aromatiques intéressants lors de la fermentation de sous-produits provenant de l'industrie de la boulangerie. L'importation de ces organismes du secteur laitier vers le secteur de la boulangerie constitue une innovation importante. Ces organismes d'affinage sont reconnus pour leurs aptitudes aromatiques et les milieux riches rencontrés en boulangerie contiennent les éléments nutritifs nécessaires au développement de ces microorganismes et permettent la production d'arômes intéressants. Cette méthode de transformation des sous-produits de boulangerie permet de revaloriser ces sous-produits qui représentent actuellement des pertes importantes pour l'industrie.

Dans un premier temps, huit souches de levures ont été évaluées selon leur capacité à produire des arômes intéressants sur des milieux à base de sous-produits de boulangerie. La plupart des cultures de levures testées ont donné des arômes intéressants, ce qui démontre le potentiel d'application des levures de fromagerie pour la transformation des produits de boulangerie. Suite à cette étape de sélection, la combinaison de la souche de *Geotrichum candidum* ATCC 62217 et du milieu à base de pains blancs a été retenue. Le milieu fermenté obtenu avec cette combinaison a un arôme fruité agréable et pourrait être utilisé sous forme de préferments liquides comme ingrédient aromatique dans les produits de boulangerie. Les composés aromatiques produits pourraient aussi être extraits et utilisés comme ingrédients à haute valeur ajoutée. L'application de cette fermentation dans l'industrie alimentaire serait facilitée par le fait que le substrat ainsi que le microorganisme utilisés sont d'origine

alimentaire. Il serait aussi intéressant d'étudier le potentiel de cette souche à produire des composés aromatiques à partir de différents sous-produits alimentaires complexes comme le lactosérum.

Dans un second temps, l'arôme fruité obtenu a été caractérisé et plusieurs composés aromatiques constituant l'arôme ont été identifiés. Plusieurs composés sont des esters d'éthyle d'acides gras à courte chaîne, composés caractéristiques des arômes fruités. D'autres esters d'acides gras et des alcools ont également été identifiés. L'étude de 6 acides organiques présents avant et après fermentation dans le milieu a permis de constater que la concentration des acides malique, acétique, fumarique et propionique diminue au cours de la fermentation, alors que la concentration d'acide citrique augmente et que la concentration d'acide lactique varie peu. La production de métabolites secondaires comme les esters survient au cours de la phase stationnaire de croissance des microorganismes. L'étude de la croissance de *G. candidum* au cours de la fermentation a permis de constater que la production de l'arôme fruité correspond effectivement à cette phase du développement. L'activité lipolytique de la souche ATCC 62217 de *G. candidum* est comparable à celle d'autres souches de cet organisme ne produisant pas d'arômes fruités.

Finalement, dans un troisième temps, l'effet de la température et de l'agitation en fonction du temps sur la production de quatre composés aromatiques sélectionnés, sur le profil de 6 acides organiques et sur la croissance de *G. candidum* ATCC 62217 a été observé. Les quatre composés aromatiques étudiés sont produits en grande quantité comparativement à ce qui est rapporté dans la littérature pour ce microorganisme. L'agitation est un facteur déterminant pour la croissance et la production de composés aromatiques par *G. candidum*. En absence d'agitation, la croissance du microorganisme demeure très faible et aucun des 4 composés suivis n'est produit de façon significative. Dans l'intervalle de températures testées, ce facteur a un effet beaucoup moins important. Bien que la production des composés aromatiques soit plus rapide à 30°C, les composés sont généralement produits en quantités semblables aux autres températures (20 ou 25°C).

Dans son ensemble, cette étude a permis de démontrer que les levures d'affinage utilisées en fromagerie, notamment *Geotrichum candidum*, ont la capacité de produire rapidement des arômes agréables au cours de la transformation de produits de boulangerie. La production de composés à l'arôme fruité sur un milieu à base de pains blancs par la souche de *G. candidum* ATCC 62217 constitue un exemple. Cette étude a permis de caractériser en partie cet arôme et la souche de *G. candidum* utilisée. Toutefois, il serait pertinent d'effectuer des études de mise à l'échelle et d'approfondir la caractérisation de cette fermentation, afin d'optimiser la production d'arôme et la rendre applicable à l'échelle industrielle. La nature alimentaire du milieu et du microorganisme utilisé constitue un bon point de départ en ce sens. Il serait aussi intéressant de caractériser plus à fond la souche de *G. candidum* productrice de cet arôme fruité. Par exemple, il serait intéressant de comprendre pourquoi certaines souches de *G. candidum* produisent un arôme fruité alors que la majorité des souches ne semblent pas avoir cette capacité. Enfin, ce mémoire met en évidence le grand potentiel des levures d'affinage des fromages pour la transformation des produits de boulangerie.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akinrele, I.A. 1964. Fermentation of cassava. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 15 : 589-594.

Akinyosoye, F.A. 1988. Studies on the microbiology of the fermentation of cassava tuber for the production of an indigenous food. *Chemie Mikrobiologie Technologie Der Lebensmittel* 11 : 169-174.

Alford, J.A. & Smith, J.L. 1965. Production of microbial lipases for the study of triglyceride structure. *Journal of American Oil Chemists Society* 42 : 1038-1040.

Anonyme. 1979. Produit de boulangerie et son procédé de fabrication. Pain Jacquet Biscotte. Demande de brevet d'invention français 2 409 007.

Anonyme. 1995. Catalog of Flavors and Fragrances. Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

Armstrong, D.H. & Yamazaki, H. 1986. Natural flavours production: a biotechnological approach. *Trends in Biotechnology* 4 : 264-268.

Baillargeon, N.W., Bistline, R.G. & Sonnet, P.E. 1989. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30 : 92-96.

Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. 1990. *Geotrichum candidum*. In : Yeasts: Characteristics and identification. 2e édition, Cambridge University Press, Cambridge, p. 367.

Belin, J.M. 1991. Des aptitudes aromatiques variées. Revue Laitière Française (Supplément) 512 : 34.

Belin, J.M., Bensoussan, M. & Serrano-Carreón, L. 1992. Microbial biosynthesis for the production of food flavors. Trends in Food Science & Technology 3 : 11-14.

Carmichael, J.W. 1957. *Geotrichum candidum*. Mycologia 49 : 820-830.

Chander, H. & Klostermeyer, H. Production of lipase by *Geotrichum candidum* under various growth conditions. Milchwissenschaft 38 : 410-412.

Charton, E., Davies, C. & Macrae, A.R. 1992. Use of specific polyclonal antibodies to detect heterogeneous lipases from *Geotrichum candidum*. Biochimica & Biophysica Acta 1127 : 191-198.

Coillard, P. & Levi, S. 1959. A two-stage fermentation of cassava. Nature 183 : 620-621.

Collins, E.B. 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. Journal of Dairy Science 55 : 1022-1028.

Cormier, F., Raymond, Y., Champagne, C.P. & Morin, A. 1991. Analysis of odor-active volatiles from *Pseudomonas fragi* grown in milk. Journal of Agricultural and Food Chemistry 39 : 159-161.

Degorce-Dumas, J.R., More, J., Goursaud, J. & Leveau, J.Y. 1984. Production d'arômes par les microorganismes : les potentialités. Industries Alimentaires et Agricoles 101 : 11-15.

El-Dash, A.A. 1971. The precursors of bread flavor: Effect of fermentation and proteolytic activity. *The Bakers Digest* 45 (6) : 26-31.

Essers, A.J.A., Witjes, C.M.J.W., Schurink, E.W. & Nout R.M.J. 1994. Role of fungi in cyanogens removal during solid substrate fermentation of cassava. *Biotechnology Letters* 16 : 755-758.

Fallows, S.J. & Wheelock, V. 1982. By-product from the U.K. food system 4. The cereals industries. *Conservation and Recycling* 5 : 191-201.

Fox, P.F. & Law, J. 1991. Enzymology of cheese ripening. *Food Biotechnology* 5 : 239-262.

Gatfield, I.L. 1988. Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. *Food Technology* 73 : 110-122, 169.

Gilbert, E.J., Drozd, J.W. & Jones, C.W. 1991. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology* 137 : 2215-2221.

Ginzburg, A.G. 1977. Conversion of waste bread to bread crumbs - using preliminary fragmentation and fluidised bed drying to accelerate the process. Russian Patent 563941.

Greenberg, R.S. & Ledford, R.A. 1979. Deamination of glutamic and aspartic acids by *Geotrichum candidum*. *Journal of Dairy Science* 62 : 368-372.

Gueguen, M. & Jacquet, J. 1982. Études sur les caractères cultureux et la morphologie de *Geotrichum candidum* Link. *Le Lait* 62 : 625-644.

Gueguen, M. & Lenoir, J. 1975a. Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le Lait* 543-544 : 145-162.

Gueguen, M. & Lenoir, J. 1975b. Aptitude de l'espèce *Geotrichum candidum* à la production d'enzymes protéolytiques. Note complémentaire. Le Lait 549-550 : 621-629.

Gueguen, M. & Lenoir, J. 1976. Caractères du système protéolytique de *Geotrichum candidum*. Le Lait 557 : 439-448.

Gueguen, M. & Schmidt, J.L. 1992. Les levures et *Geotrichum candidum*. In : Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris, pp. 180-185.

Gueguen, M., Jacquet, J., Allain-Garnier, M., Pineau, A. & Kogbo, W. 1984. Sur les interactions microbiennes de *Geotrichum candidum* Link. Microbiologie Aliments Nutrition 2 : 139-152.

Hannan, Y. & Gueguen, M. 1985. Activités endopeptidasiques du levain fongique *Geotrichum candidum* en fonction de sa croissance. Sciences des Aliments 5 (Hors série V) : 147-152.

Hironaka, Y. 1986. Relationships between sensory flavor evaluation and gas-chromatographic profiles of french bread. Cereal Chemistry 63 : 369-372.

Jacobsen, T. & Poulsen, O.M. 1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochemica & Biophysica Acta* 1257 : 96-102.

Jacobsen, T., Olsen, J. & Allermann, K. 1990. Substrate specificity of *Geotrichum candidum* lipase preparation. *Biotechnology Letters* 12 : 121-126.

Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M. & Vandamme, E.J. 1992. Production of flavours by microorganisms. *Process Biochemistry* 27 : 195-215.

Janssens, L., De Pooter, H.L., Vandamme, E.J. & Schamp, N.M. 1988. Bio-synthesis of esters by *Geotrichum penicillatum*. In: Bioflavour '87; Analysis Biochemistry Biotechnology. ed. Peter Schreier. Walter de Gruyter, Berlin, pp. 453-463.

Jollivet, N., Chataud, J., Vayssier, Y., Bensoussan, M. & Belin J.M. 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link. Journal of Dairy Research 61 : 241-248.

Koizumi, T., Kakuta, K., Ohsawa, R., Kodama, K. & Nojiri, K. 1982. On the aroma substances produced by tree exudate yeast (on the aroma produced by yeast. Part XII). Nippon Nôgeikagaku Kaishi 56 : 757-763.

Kreger Van Rij, N.J.W. 1987. *Geotrichum candidum*. In : The yeasts. Vol. I: Biology of Yeasts. 2e édition, A.H. Rose & J.S. Harrison ed. Academic Press, London, p. 54.

Lanza, E., Ko, K.H. & Palmer, J.K. 1976. Aroma production by culture of *Ceratocystis moniliformis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 24 : 1247-1250.

Latrassé, A., Dameron, P., Hassani, M. & Staron, T. 1987. Production d'un arôme fruité par *Geotrichum candidum* (Staron). Sciences des Aliments 7 : 637-645.

Latrassé, A., Degorce-Dumas, J.R. & Leveau, J.Y. 1985. Production d'arômes par les microorganismes. Sciences des Aliments 5 : 1-26.

Lecocq, J. & Gueguen, M. 1994. Effects of pH and sodium chloride on the interactions between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. Journal of Dairy Science 77 : 2890-2899.

Lecocq, J., Gueguen, M. & Coiffier, O. 1996. Importance de l'association *Geotrichum candidum* - *Brevibacterium linens* pour l'affinage de fromages à croûte lavée. Sciences des Aliments 16 : 317-327.

Lönner, C. & Preve-Akesson, K. 1988. Acidification properties of lactic acid bacteria in rye sour doughs. *Food Microbiology* 5 : 43-58.

Macrae, A.R. 1983. Extracellular microbial lipases. *In* : *Microbial Enzymes and Biotechnology*. ed. W.M. Fogarty. Applied Science Publishers, London, pp. 225-250.

Macrae, A.R. 1985. Interesterification of fats and oils. *In* : *Biocatalysts in Organic Syntheses*. Ed. J. Tramper, H.C. Van der Plas & P. Linko. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 195-208.

McIver, R.C. & Reineccius, G.A. 1986. Synthesis of 2-methoxy-3-alkylpyrazines by *Pseudomonas perolens*. *In* : *ACS Symposium Series: Biogenesis of Aroma*. Ed., T.H. Parliment & R. Croteau, American Chemical Society, Washington, DC., pp. 266-274.

McKay, A.M. 1993. Microbial carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1) in food biotechnology. A review. *Letters in Applied Microbiology* 16 : 1-6.

Menge, W. 1986. Method for making an acidic fermenting dough for the preparation of bread and bakery products, using waste bread. U.S. Patent 4 613 506.

Mourgues, R., Bergère, J.L. & Vassal, L. 1983. Possibilités d'améliorer les qualités organoleptiques des fromages de Camembert grâce à l'utilisation de *Geotrichum candidum*. *La Technique Laitière* 978 : 11-15.

Nkumah, N.I., Doelle, H.W. & Ogunye, A.F. 1980. The effect of different inoculum preparations and pH on the growth of *Geotrichum candidum* using different types of starch. *In* : *Food Process Engineering*. Volume 1. Applied Science Publishers, London, pp. 914-919.

Nuraida, L., Wachter, M.C. & Owens, J.D. 1995. Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11 : 567-571.

Okafor, N. & Uzuegbu, J.O. 1987. Studies on the contributions of microorganisms to the organoleptic properties of "Gari"; a fermented food derived from cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *Journal of Food and Agriculture* 1 : 99-105.

Raymond, Y., Morin, A., Cormier, F., Champagne, C.P. & Dubeau, H. 1990. Physical factors influencing the production of strawberry aroma by *Pseudomonas fragi* grown in skim milk. *Biotechnology Letters* 12 : 931-936.

Richard-Molard, D. & Drapron, R. 1978. L'arôme du pain. *Technique des Industries Céréalières* 166 : 3-11.

Sanni, A.I. & Lönner, C. 1993. Identification of yeasts isolated from Nigerian traditional alcoholic beverages. *Food Microbiology* 10 : 517-523.

Scharpf, L.G. Jr., Seitz, E.W., Morris, J.A. & Farbood, M.I. 1986. Generation of flavor and odor compounds through fermentation process. *In* : ACS Symposiums Series: Biogeneration of Aroma. Ed., T.H. Parliment & R. Croteau, American Chemical Society, Washington, DC., pp. 323-346.

Seibel, W. 1987. Use of flour and crumbs made from waste bread and baker's confectionery in production of bakery products. *Getreide Mehl und Brot* 41 : 39-42.

Sidebottom, C.M., Charton, E., Dunn, P.P.J., Mycock, G., Davies, C., Sutton, J.L., Macrae, A.R. & Slabas, A.R. 1991. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. *European Journal of Biochemistry* 202 : 485-491.

Smith, J.L. & Alford, J.A. 1969. Action of microorganisms on peroxides and carbonyls of fresh lard. *Journal of Food Science* 34 : 75-78.

Sugihara, A., Hata, S., Shimada, Y., Goto, K., Tsunasawa, S. & Tominaga, Y. 1993. Characterization of *Geotrichum candidum* lipase III with some preference for the inside ester bond of triglyceride. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:279-283.

Sugihara, A., Shimada, Y. & Tominaga, Y. 1991. A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2-position on a triglyceride molecule. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35 : 738-740.

Sutherland, R. 1989. Hydrogen ion concentration (pH) and total titrable acidity tests. *American Institute of Baking Technical Bulletin* 11 : 1-6.

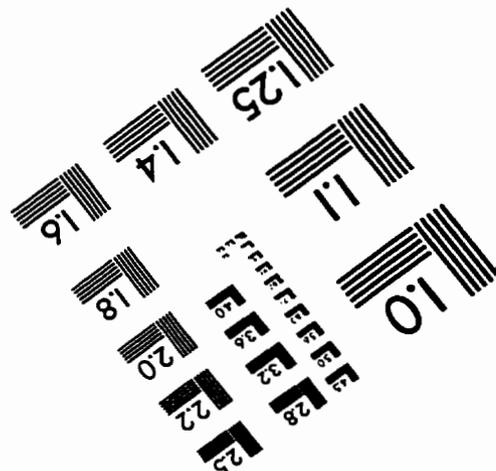
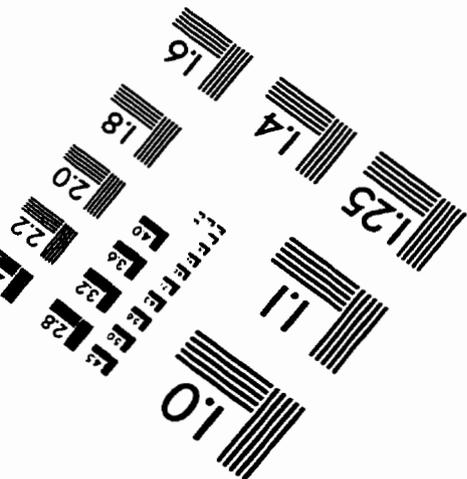
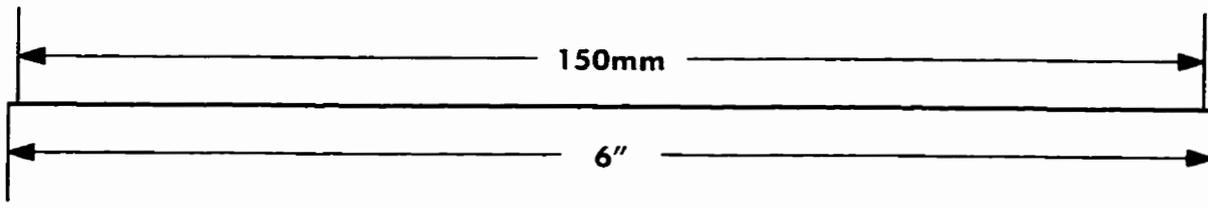
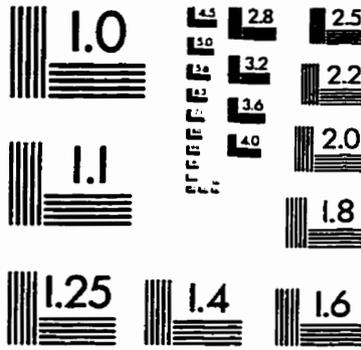
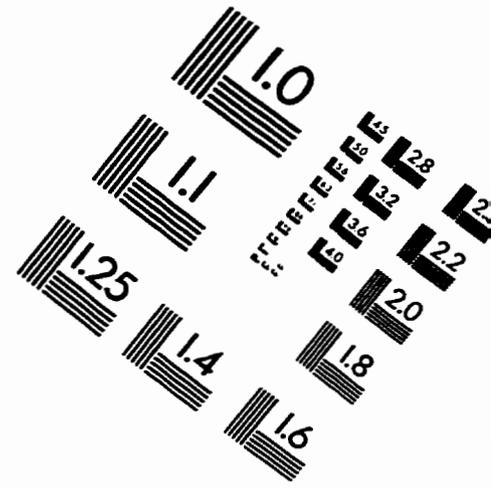
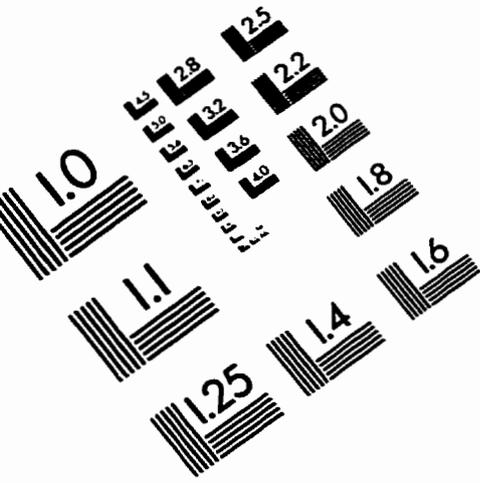
Tahoun, M.K., Mostafa, E., Mashaley, R. & Abou-Donia, S. 1987. Purification and properties of mycelial triacylglycerol lipase from *Geotrichum candidum*. *Alexandria Journal of Agricultural Research* 32 : 141-151.

Tsujisaka, M.K., Iwai, M., Fukumoto, J. & Okamoto, Y. 1973. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link. *Agricultural and Biological Chemistry* 37 :837-842.

van Dam, H.W. & Hille, J.D.R. 1992. Yeast and enzymes in breadmaking. *Cereal Foods World* 37 : 245-252.

Zetelaki-Horváth, K. & Vas, K. 1980. Protein production by microfungi from conventional and unconventional carbon sources. *Acta Alimentaria* 9 (3) : 191-207.

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)




APPLIED IMAGE, Inc
 1653 East Main Street
 Rochester, NY 14609 USA
 Phone: 716/482-0300
 Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved