


Filière Technologies du vivant


Orientation Biotechnologie


Travail de bachelor Diplôme 2023

Yannick Erismann

*Fermentation des tourteaux de noix pour
libération d'acide ellagique et d'urolithines à
partir des ellagitanins*

 Professeur
Prof. Dr. Wolfram Brück

 Expert
Prof. Dr. Thomas Brück

 Date de la remise du rapport
18.08.2023

Ce rapport est l'original remis par l'étudiant.
Il n'a pas été corrigé et peut donc contenir des inexactitudes ou des erreurs.

HES-SO Valais

Données du travail de diplôme
Aufgabenstellung der Bachelorarbeit

FO 1.2.02.07.EB
 che/31/05/2021

SYND	ETE	TEVI
X	X	X

Filière / Studiengang TEVI	Année académique / Studienjahr 2022-23	No TB / Nr. BA BT/2023/11
Mandant / Auftraggeber X HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire <i>Partnerinstitution</i>	Etudiant / Student Erismann Yannick Professeur / Dozent Wolfram Brück	Lieu d'exécution / Ausführungsort X HES—SO Valais <input type="checkbox"/> Industrie <input type="checkbox"/> Etablissement partenaire <i>Partnerinstitution</i>
Travail confidentiel / vertrauliche Arbeit <input type="checkbox"/> oui / ja X non / nein	Expert / Experte (données complètes) Prof. Dr. Thomas Brück, Technische Universität München, Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching, Tel +49 89 289 13253, brueck@tum.de	

Titre / Titel Fermentation of nut press cakes to release ellagic acid and urolithins from ellagitannin
Description / Beschreibung <p>The food industry generates a large quantity of underused by-products of potential high value due to their phytochemical content. However, most of these residues are sold as animal feed but in principle could provide added value after an additional recovery step for use as functional food or cosmetic product. The optimization of the recovery of this biomass is part of a vision of a sustainable circular bioeconomy and therefore of sustainable nutrition.</p> <p>The aim of this work is to optimize the fermentation of nut press cakes, resulting from the manufacture of nut oils. Apart from the fermentation conditions to be optimized, there is also the combination of GRAS molds and bacteria to be evaluated which aid the release of ellagic acid and urolithins from ellagitannins. The fermentation product is envisioned to be a Tempeh-like food product for human consumption.</p> <p>Throughout his work, the student will benefit from the scientific supervision of the Wolfram Brück and support by Wilfried Andlauer, and Thomas Brück (Chair of Synthetic Biotechnology at the Technical University of Munich). Technical support for the familiarization and the execution of the analyzes in the laboratory also be provided.</p>
Objectifs / Ziele <ul style="list-style-type: none"> — Produce a Tempeh-like product with press cakes from various food wastes originating from the food oil industry using optimized parameters for fermentation and production of ellagic acid and urolithins. — Analyze the contents of the product using HPLC-(DAD, MS). — Evaluate the influence of fermentation on ellagitannins and the release of ellagic acid and urolithins. — Write a report and participate in any communication (poster and/or publication) — Positioning of the project relative to the 17 UN sustainable development goals

Rapport reçu le / Schlussbericht erhalten am Visa du secrétariat / Visum des Sekretariats

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum	Délais / Termine
<p>Responsable de l'orientation / <i>Leiter der Vertiefungsrichtung:</i></p>  <p>¹ Etudiant / Student:</p> 	<p>Attribution du thème / <i>Ausgabe des Auftrags:</i></p> <p>01.05.2023</p> <p>Fin des travaux de diplôme dans les laboratoires de l'école / Ende der Diplomarbeiten in den Labors der Schule:</p> <p>14.07.2023, 16:15</p> <p>Remise du rapport final / <i>Abgabe des Schlussberichts:</i></p> <p>18.08.2023</p> <p>Expositions / <i>Ausstellungen der Diplomarbeiten:</i></p> <p>25.08.2023 – HEI</p> <p>28.08.2023 – Monthey</p>

¹ Par sa signature, l'étudiant-e s'engage à respecter strictement la directive DI.1.2.02.07 liée au travail de diplôme.

Durch seine Unterschrift verpflichtet sich der/die Student/in, sich an die Richtlinie DI.1.2.02.07 der Diplomarbeit zu halten.

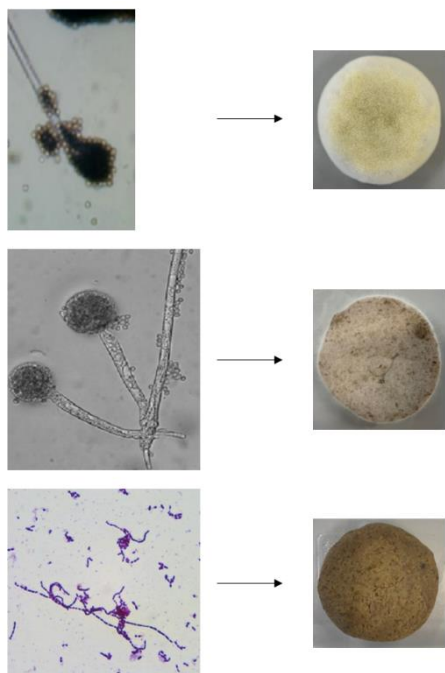


Figure 1 : Tourteaux de noix fermentés pendant 72 h avec (de haut en bas) : *A. oryzae*, *R. oligosporus* et *S. thermophilus*.

Travail de diplôme | édition 2023 |

Filière

Technologies du vivant

Domaine d'application

Biotechnologie

Professeur responsable

Wolfram Brück

wolfram.bruck@hevs.ch

Fermentation des tourteaux de noix pour libération d'acide ellagique et d'urolithines à partir des ellagitannins

Diplômant/e

Yannick Erismann

Objectif du projet

Le but de ce travail est d'évaluer la libération d'acide ellagique et d'urolithines à partir des ellagitannins naturellement présents dans le tourteau de noix par des fermentations en milieu solide avec trois souches GRAS différentes.

Méthodes | Expériences | Résultats

Chaque souche GRAS, c'est-à-dire *Streptococcus thermophilus*, *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus*, sera testée séparément et la meilleure sera sélectionnée pour un essai de coculture. Le processus de fermentation devra être optimisé de manière à obtenir un produit alimentaire de type tempeh destiné à la consommation humaine. La quantification d'acide ellagique et d'urolithines, composés intéressants de par leurs propriétés bénéfiques sur la santé humaine, sera réalisée par HPLC-DAD. L'acide ellagique contenu dans les échantillons déshydratés et prélevés en triplicata à des intervalles de 24 h sera préalablement extrait grâce à du méthanol.

La meilleure libération d'acide ellagique a été observée avec la souche *R. oligosporus* après une durée de fermentation de 72 h. La coculture réalisée avec *S. thermophilus* & *R. oligosporus* n'était pas la solution optimale pour parvenir à une concentration finale d'acide ellagique élevée. Finalement, aucune urolithine A n'a pu être détectée avec la méthode HPLC-DAD appliquée. À l'avenir, une technique plus sensible comme l'HPLC-MS devrait être considérée.

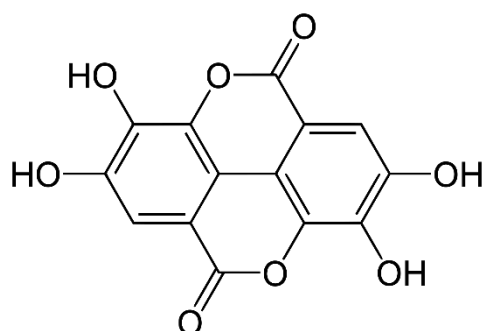


Figure 2 : Structure de l'acide ellagique.

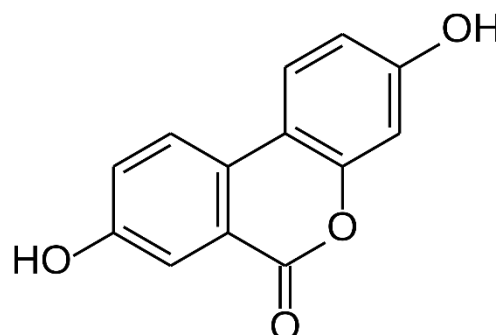


Figure 3 : Structure de l'urolithine A.

Remerciements

J'aimerais faire part de ma reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont soutenu durant l'accomplissement de ce projet. Leur présence et leur encouragement ont été essentiels pour mener à bien ce travail.

Je souhaite exprimer en premier lieu ma sincère gratitude envers le Prof. Dr. Wolfram Brück, qui m'a octroyé ce sujet passionnant et dont la disponibilité est digne d'être remarquée.

J'adresse également mes remerciements envers tout le personnel du laboratoire microbiologie (Bruno Lehner, Martine Baudin et Martine Emery Mabillard) et chimie analytique (Nancy Nicolet), dont leur expertise et leurs retours constructifs ont permis d'améliorer considérablement la qualité de cette recherche.

Enfin, je rends grâce à mes proches pour leur réconfort inconditionnel tout au long de cette thèse enrichissante.

Table des matières

1. Introduction	1
1.1. Ellagitannins et acide ellagique	1
1.2. Urolithines, métabolites et fonctions physiologiques.....	2
1.3. Système digestif, microbiote intestinal et distribution dans les tissus/fluides biologiques	3
2. But et hypothèse du travail	6
3. Durabilité	7
4. Matériel et méthodes	8
4.1. Isolement et vérification de pureté des souches GRAS	8
4.2. Récupération des spores et suspension en milieu liquide.....	8
4.3. Walnut Press Cake (WPC)	9
4.4. Solution d'hydratation (HS).....	9
4.5. Solution acide (AS).....	9
4.6. Sel.....	10
4.7. Inoculation du WPC.....	10
4.8. Fermentation	10
4.9. Echantillonnage, mesure du pH et de l'activité de l'eau (a_w)	10
4.10. Extraction d'acide ellagique	11
4.11. Analyse à l'HPLC-DAD	11
4.12. Courbes de calibration	12
4.13. LOD & LOQ	12
4.14. Tests sur l'aberration	12
4.15. Mesure de la dispersion et intervalle de confiance.....	13
5. Résultats	14
5.1. Suivis de fermentation.....	14
5.2. HPLC-DAD.....	17
6. Discussion.....	22
6.1. Suivis de fermentation.....	22
6.2. HPLC-DAD.....	23
7. Conclusion et perspectives.....	25
8. Bibliographie	26
9. Annexe.....	30
9.1. Annexe 1 : Courbes de calibration.....	30
9.2. Annexe 2 : Spectre UV de l'acide ellagique	30
9.3. Annexe 3 : Spectre UV de l'urolithine A.....	31

1. Introduction

1.1. Ellagitanins et acide ellagique

Les ellagitanins (ETs, de l'anglais *ellagitannins*) sont connus comme étant des tannins hydrolysables, basés sur l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP, de l'anglais *hexahydroxydiphenic acid*) estérifié à un noyau polyol [1]. Il en existerait plus de 500 structures différentes [2]. Les ellagitanins se retrouvent dans certaines fleurs et certains fruits comme les grenades, fraises, canneberges, myrtilles, mûres et noix. Sous hydrolyse enzymatique ou chimique forte, il y a rupture de la liaison ester des ellagitanins et libération du groupe HHDP, comme le montre la Figure 1.

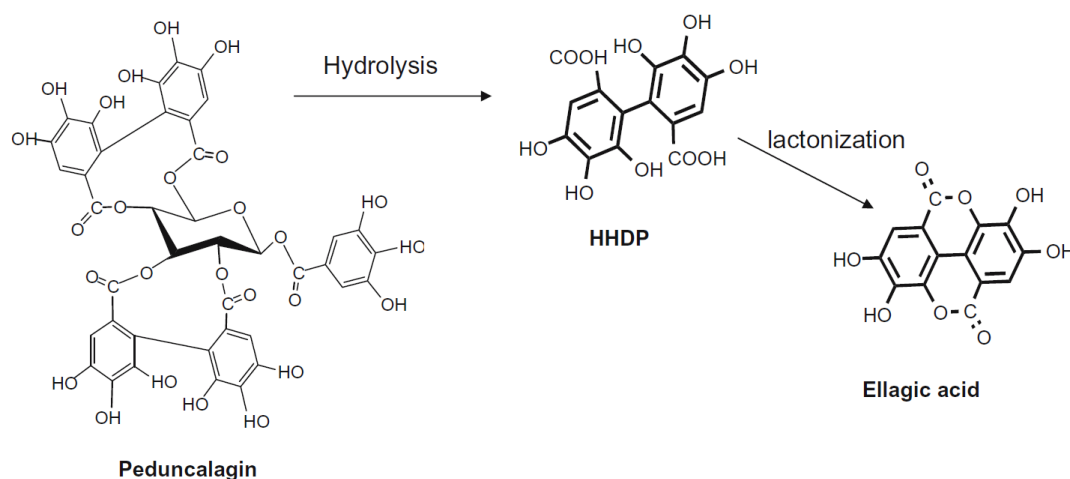


Figure 1 : Hydrolyse enzymatique d'un ellagitanin produisant de l'acide ellagique par une conversion microbienne [3].

L'acide ellagique est un polyphénol hautement thermostable grâce à ses quatre cycles. Cette molécule est insoluble dans l'eau, mais soluble dans le méthanol acidifié, l'éthanol et le diméthylsulfoxyde (DMSO).

Les ellagitanins et l'acide ellagique ont des effets positifs sur la santé humaine notamment grâce à leurs propriétés antioxydantes, antimutagènes et anticancéreuses. La consommation d'aliments riches en ellagitanin améliorerait notamment la santé cérébrale selon une publication récente [4]. Elle aurait un impact bénéfique sur le flux sanguin, la modulation du microbiote intestinal et la barrière intestinale en contribuant à une augmentation de la neuroprotection, de la mémoire et de la fonction cognitive. En effet, l'interaction bidirectionnelle entre les ellagitanins et le microbiote intestinal se traduirait par une hausse de croissance de bactéries totales et de souches probiotiques. À l'échelle industrielle, les ellagitanins et l'acide ellagique sont employés dans les produits cosmétiques (crèmes, eaux de toilette) pour leur influence bénéfique sur la peau. Néanmoins, ces applications restent limitées compte tenu de la faible solubilité dans l'eau de l'acide ellagique et sa pauvre biodisponibilité. En effet, une petite quantité seulement se retrouve absorbée par les cellules épithéliales de l'intestin grêle

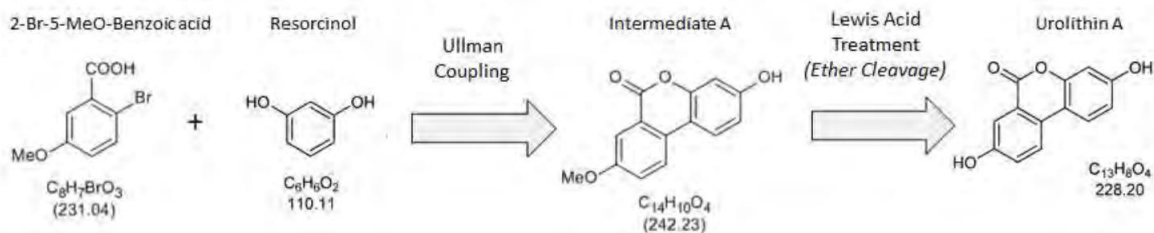
[5]. La flore intestinale humaine et animale a cependant la capacité de transformer l'ellagitanin ou l'acide ellagique non absorbé en urolithines.

1.2. Urolithines, métabotypes et fonctions physiologiques

Les urolithines sont plus facilement absorbées que leurs précurseurs et subissent un métabolisme de phase II (méthylation, glucuronidation et sulfonation) par des enzymes cellulaires humaines pour créer des conjugués d'anhydride gluconique et de sulfate [6]. Ces produits sont ensuite distribués dans différents tissus et fluides biologiques. Les différences entre individus ainsi que celles liées à l'âge influencent la capacité de bioconversion de l'acide ellagique en urolithines. Il existe trois métabotypes distincts : UM-A (métabolisme de l'acide ellagique en urolithine A seulement), UM-B (métabolisme de l'acide ellagique en iso-urolithine A et urolithine B, mais aussi en urolithine A à faible concentration) et UM-0 (aucune urolithine générée à partir de l'acide ellagique). Le pourcentage de métabotype UM-A est plus élevé chez les jeunes et personnes ayant un poids normal [7]. Le métabotype UM-B prédomine chez les personnes en surpoids et obèses. Ce dernier a été révélé plus fréquent chez des patients atteints de syndrome métabolique ou de cancer colorectal. Outre le poids, le microbiote intestinal de la mère influence par ailleurs considérablement l'intestin de l'enfant pendant la grossesse et l'allaitement. Le lait maternel est riche en bactéries lactiques et sa concentration en urolithines accroît avec le temps.

L'urolithine A aurait un nombre de fonctions physiologiques plus élevé que l'urolithine B et l'iso-urolithine A. Elle réduirait l'accumulation de triglycérides dans le foie, inhiberait les facteurs inflammatoires, stimulerait la mitophagie, améliorerait la santé musculaire tant chez la souris que chez l'homme et empêcherait l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles pour prolonger la durée de vie du nématode *Caenorhabditis elegans*. L'entreprise Amazentis a d'ailleurs commercialisé l'urolithine A comme un produit nutritionnel améliorant la force musculaire et luttant contre le vieillissement. Jusqu'à l'heure actuelle, la méthode chimique était l'unique moyen de synthétiser l'urolithine A, mais la découverte d'espèces microbiennes GRAS (en anglais *Generally Recognized As Safe*) ayant la capacité de transformer l'acide ellagique en urolithine A est une approche prometteuse pour non seulement comprendre le mécanisme de biotransformation, mais aussi développer des probiotiques et des aliments fonctionnels.

Synthesis Process 1



Synthesis Process 2

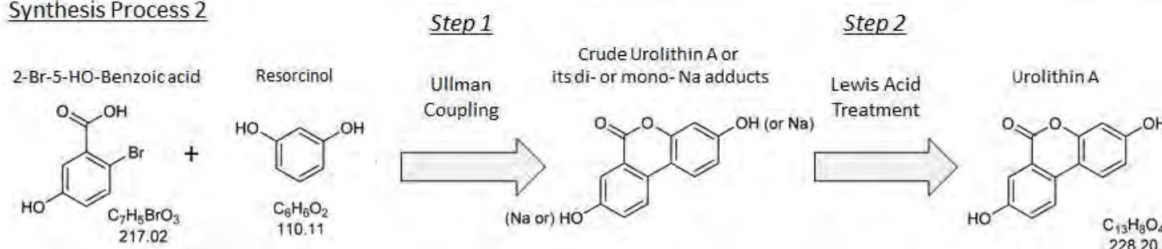


Figure 2 : Procédés de synthèse chimique d'urolithine A [8].

À ce jour, les souches recensées produisant des urolithines à partir d'acide ellagique sont les suivantes : *Gordonibacter urolithinifaciens* (urolithine C), *Gordonibacter pamelaee* (urolithine C), *Ellagibacter isourolithinifaciens* (iso-urolithine A) et *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (urolithines A et B). Des niveaux plus élevés de *Gordonibacter* ont été trouvés chez les individus possédant le métabotype UM-A que chez ceux au métabotype UM-B [9]. Des publications récentes ont au même titre démontré que *Streptococcus thermophilus* et *Enterococcus faecium* étaient capables de produire de l'urolithine A à partir d'acide ellagique [10,11].

Tableau 1 : Liste des différentes souches productrices d'urolithines à partir d'acide ellagique [12].

Souches métaboliques	Urolithines produites
<i>G. urolithinifaciens</i>	Urolithines M6 et C
<i>G. pamelaee</i>	Urolithines M6 et C
<i>E. isourolithinifaciens</i>	Urolithines M6, C et iso-urolithine A
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Urolithines M6, D, C, A, B et iso-urolithine A
<i>S. thermophilus</i>	Urolithine A

1.3. Système digestif, microbiote intestinal et distribution dans les tissus/fluides biologiques

Le système digestif est composé du tube digestif (bouche, pharynx, œsophage, estomac, intestin grêle et gros intestin) et d'organes digestifs annexes (dents, glandes salivaires, langue, foie, vésicule biliaire et pancréas) [13]. Son rôle est de digérer les aliments en les rendant suffisamment petits dans un but d'absorption. Les nutriments, transitant de l'intestin grêle jusqu'à la lymphe ou au sang, sont distribués finalement aux cellules. L'eau, les nutriments et

certaines vitamines restants sont également absorbés dans le colon. Ce qui n'est pas digéré (fèces) est évacué du corps via l'anus.

L'estomac et l'intestin grêle hébergent peu de bactéries compte tenu de la présence d'acide chlorhydrique dans l'estomac et de l'avancée rapide des aliments dans l'intestin grêle. L'intestin grêle possède des moyens de défense comme les cellules de Paneth (phagocytent les bactéries), des défensines (protéines antibactériennes) et le lysozyme (enzyme antibactérienne). Pour ce qui est du gros intestin, il contient une grande quantité de bactéries (100 milliards de bactéries par gramme de fèces) qui sont majoritairement anaérobies stricts ou facultatives. Le microbiote intestinal, de par son effet barrière, empêche la colonisation de l'intestin par des agents pathogènes.

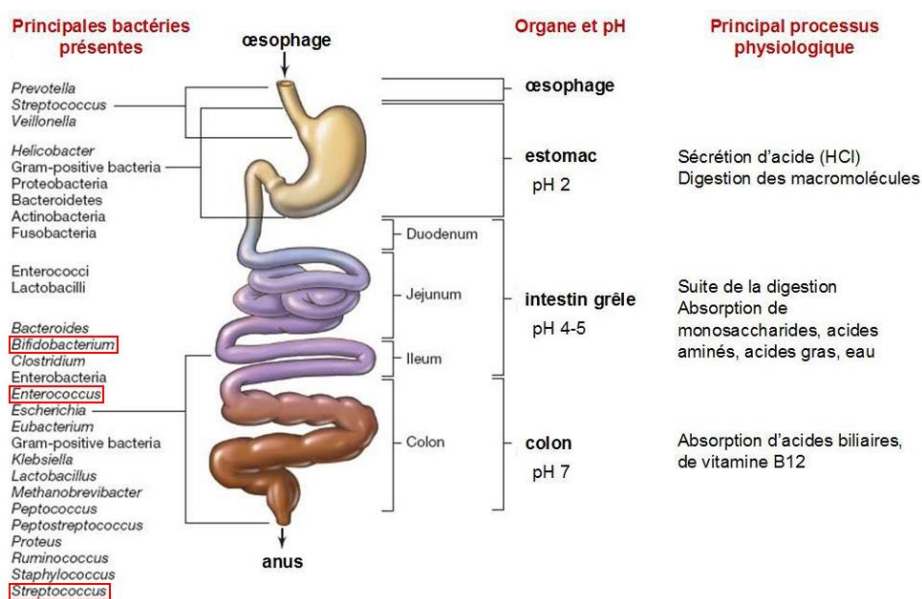


Figure 3 : Microbiote intestinal [14].

À noter que les espèces *Bifidobacterium*, *Streptococcus* et *Enterococcus* citées précédemment se retrouvent parmi la liste des principales bactéries présentes de la Figure 4 (encadrées en rouge). D'après la GRAS Notice Inventory disponible sur le site de l'U.S. Food & Drug Administration (FDA), plusieurs espèces bactériennes de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* ont déjà obtenu le statut GRAS [15]. Ce processus de notification proposé par la FDA permet à une entreprise de fournir des informations utiles visant à démontrer qu'une substance particulière est considérée comme GRAS dans les conditions d'utilisation prévues. L'agence examine ensuite la base de ces informations et rend une lettre de réponse disponible publiquement. En Europe, il existe un système d'évaluation similaire nommé présomption d'innocuité reconnue (QPS, de l'anglais *Qualified Presumption of Safety*) [16]. L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, de l'anglais *European Food Safety Authority*) déclenche le processus d'évaluation QPS après réception d'une demande d'autorisation de mise sur le marché. L'identité taxonomique, le corpus de connaissance et les problèmes de sécurité potentiels relatifs au micro-organisme sont alors évalués.

La production d'urolithines dans le système digestif se fait de manière séquentielle [17]. Comme expliqué dans les parties précédentes, les ellagitannins sont d'abord transformés en

acide ellagique. De par l'effet du métabolisme bactérien, l'acide ellagique se verra enlever l'un de ses lactones et de ses hydroxyles pour devenir l'urolithine M6. Pour l'urolithine C, A et B, un hydroxyle est retiré à chaque étape. Ces éliminations de lactone/hydroxyle sont respectivement indiquées par un cercle et des flèches rouges dans la Figure 5.

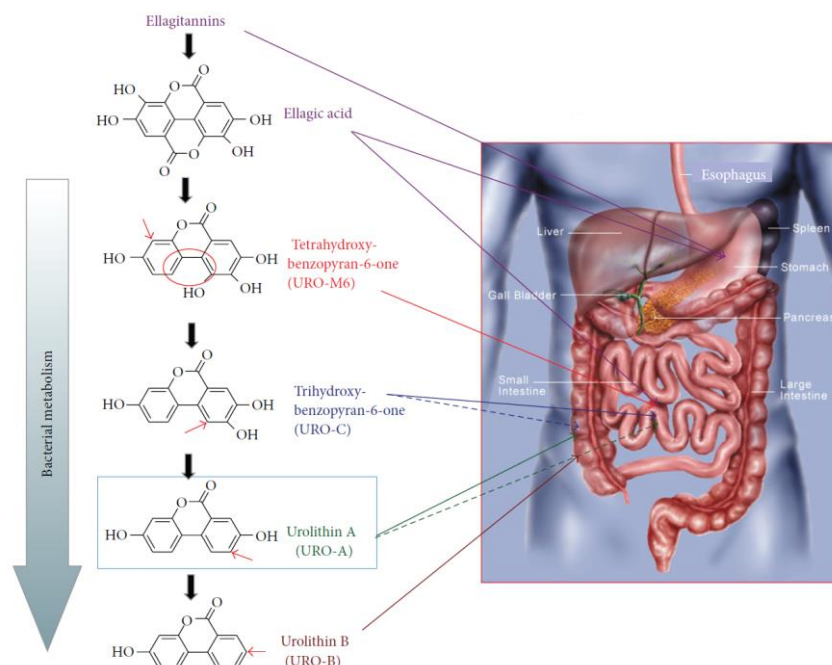


Figure 4 : Production séquentielle d'urolithines à travers le système digestif [18].

Un autre aspect important est de comprendre la distribution des urolithines à travers les tissus. Ces dernières années, plusieurs études ont été menées chez des modèles animaux et humains. Par administration orale, l'urolithine A a été retrouvée dans le tissu musculaire squelettique chez les humains [19]. Des recherches récentes ont également décelé la présence de conjugués glucuronide et sulfate d'urolithine A et d'urolithine B dans les tissus mammaires humains, après consommation d'un mélange d'extraits contenant entre autres de l'extrait de grenade.

La dose administrée, la source des ellagitannins et les méthodes analytiques utilisées ont un impact non négligeable sur la variabilité des concentrations d'urolithines observées dans les fluides biologiques humains. Typiquement, les tests réalisés ont démontré des concentrations allant de 0.003 à 5.2 μM dans le plasma et jusqu'à 50 μM dans l'urine.

À des doses élevées, quelques études ont montré que l'urolithine A aurait des effets indésirables comme la génotoxicité ou l'inhibition la biosynthèse des œstrogènes [20]. Toutefois, de telles concentrations toxiques ne pourraient être atteintes in situ, compte tenu de la faible solubilité du composé qui limite la biodisponibilité.

2. But et hypothèse du travail

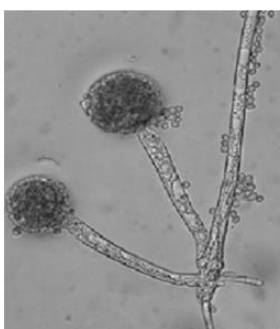
L'objectif du présent travail est d'étudier la libération de l'acide ellagique et des urolithines à partir des ellagitannins naturellement présents dans le tourteau de noix par des fermentations en milieu solide (SSF, en anglais *solid state fermentations*) avec trois souches GRAS différentes : *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* et *Streptococcus thermophilus*. Il s'agira d'optimiser les conditions de fermentation afin d'obtenir un produit alimentaire de type tempeh destiné à la consommation humaine. En plus des effets bénéfiques des urolithines sur le corps humain, le processus de fermentation représente une alternative intéressante dans le cadre de la biotechnologie verte et des objectifs de développement durable, puisque les déchets agricoles et agro-industriels ont le potentiel d'être revalorisés [21]. Elle évite en outre les coûts de production élevés, la génération de produits secondaires et le faible rendement que pourrait engendrer la libération industrielle d'acide ellagique.

Il s'agira donc de trouver les conditions de fermentation optimales pour la libération de l'acide ellagique et des urolithines. La nouveauté par rapport aux travaux réalisés précédemment est de tester cette libération à partir de *Streptococcus thermophilus*, une bactérie lactique thermophile anaérobie facultative se présentant sous forme de coques non mobiles à Gram+ [22]. Elle se trouve dans le lait cru et joue un rôle dans la fabrication de yaourt et de fromage, surtout en combinaison avec les espèces *Lactobacillus*. *Aspergillus oryzae* et *Rhizopus oligosporus* sont des champignons filamenteux aérobies thermophiles, utilisés dans la production de nourriture fermentée telle que le tempeh. Ce plat typique indonésien est fabriqué à partir de soja [23]. Dans certaines régions du pays, d'autres légumineuses ou déchets de noix de coco peuvent servir de substrat à la fabrication de ce produit. En plus d'être à prix abordable, le tempeh a de bonnes valeurs nutritionnelles et des effets bénéfiques sur la santé. En effet, des composés bioactifs autres que les urolithines, nommés isoflavones, sont contenus dans le soja. Durant la fermentation, les moisissures forment des isoflavones libres grâce à leur sécrétion de β -glucosidase. Ces isoflavones libres ont une propriété antioxydante puissante et sont facilement absorbables en grande quantité par l'intestin. À nouveau, cet exemple démontre le potentiel riche de ces souches et de ces molécules bioactives.

A. oryzae



R. oligosporus



S. thermophilus

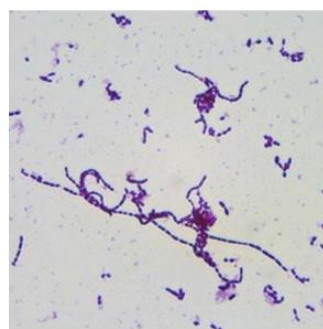


Figure 5 : Morphologies des trois souches utilisées dans le présent travail [24,25,26].

Les expériences déjà effectuées ont démontré les plus fortes teneurs en acide ellagique avec la fermentation de *Rhizopus oligosporus* seulement. Il sera donc ici possible de comparer ces

résultats avec la nouvelle souche *Streptococcus thermophilus*. Un test de reproductibilité sera d'abord fait en tenant compte des meilleures conditions du travail précédent. Ensuite, chaque souche sera testée séparément et la meilleure sera sélectionnée pour une coculture avec *Streptococcus thermophilus*. Le contenu de ces composés sera analysé par HPLC-(DAD, MS). L'HPLC-DAD (de l'anglais *High Performance Liquid Chromatography - Diode-Array Detector*) sépare et quantifie les composés en fonction de leurs propriétés chimiques et physiques [27]. Le détecteur à barrettes de diodes mesure la quantité de lumière absorbée par les composés.

3. Durabilité

Ce projet s'inscrit dans la biotechnologie verte et la durabilité, puisqu'il revalorise les sous-produits ayant un contenu phytochimique intéressant. L'objectif final est l'obtention d'un aliment fonctionnel destiné à la consommation humaine qui esquivé les coûts de production élevés, la génération de produits secondaires et le faible rendement engendrés par l'industrie. Cette approche se différencie donc des systèmes économiques linéaires et s'intègre dans une vision de bioéconomie circulaire.

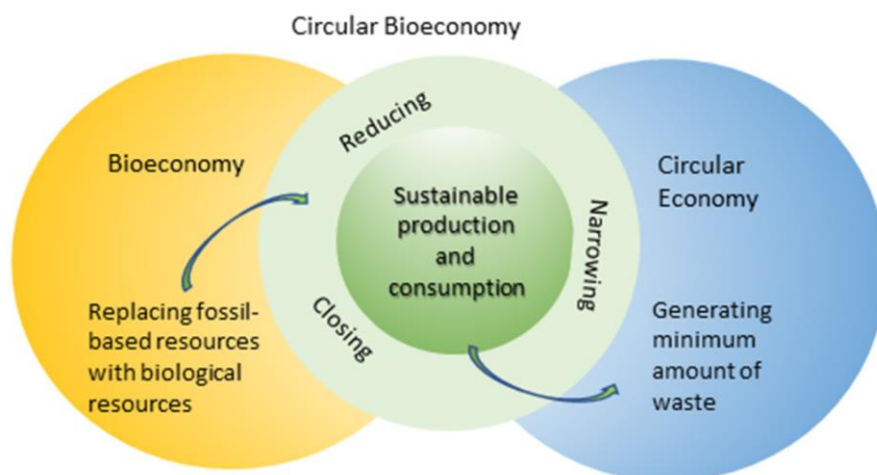


Figure 6 : Représentation schématique de la bioéconomie circulaire, à cheval entre les concepts d'économie circulaire et de bioéconomie [28].

Cette approche rejoint d'ailleurs le douzième objectif de développement durable établi par les États membres des Nations unies. Cet objectif vise à établir de modes de consommation et de production durables. D'après le site de la Confédération suisse, « cela inclut une gestion des produits chimiques et des déchets qui respecte l'environnement, la diminution de la production de déchets, notamment au moyen du recyclage, et à réduire de moitié le gaspillage alimentaire » [29]. Cette notion de recyclage fait partie intégrante de ce travail, puisque les sous-produits sont revalorisés dans le but de générer un aliment fonctionnel de type tempeh. Le site des Nations unies résume cette politique de consommation et de production durables avec le slogan suivant : « faire plus et mieux avec moins » [30].

4. Matériel et méthodes

4.1. Isolement et vérification de pureté des souches GRAS

Les trois souches GRAS *Aspergillus oryzae* DSM 1863, *Rhizopus oligosporus* DSM 1862 et *Streptococcus thermophilus* FAM2932 sont d'abord inoculées sur des boîtes de Pétri standards 92 x 16 mm contenant un milieu agar adapté. Cette étape permet d'abord de vérifier si les souches sont pures et d'isoler des spores/colonies pour une mise en suspension liquide. Le milieu agar choisi et préparé pour *Aspergillus oryzae* DSM 1863 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862 est du Sabouraud Dextrose Agar (4020052, Biolife). Pour *Aspergillus oryzae* DSM 1863 en particulier, la croissance est plus optimale sur du Potato Dextrose Agar (4019352, Biolife). Pour *Streptococcus thermophilus* FAM2932, deux milieux agar ont été testés : MRS Broth Agar (BK089HA, BIOKAR Diagnostics) et M17 Agar (4017192, Biolife). Le M17 Agar (4017192, Biolife) est celui convenant mieux à la croissance de *Streptococcus thermophilus* FAM2932. La température d'incubation pour *Aspergillus oryzae* DSM 1863 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862 est de 25 °C, celle pour *Streptococcus thermophilus* FAM2932 est de 37 °C. Pour favoriser la sporulation, les champignons peuvent être retirés de l'incubateur après quelques jours (lorsque le mycélium est déjà formé) et exposés à la lumière du jour. La germination des spores peut également être facilitée en utilisant du Malt Extract Agar (BK045HA, BIOKAR Diagnostics) pour les deux souches de champignons.

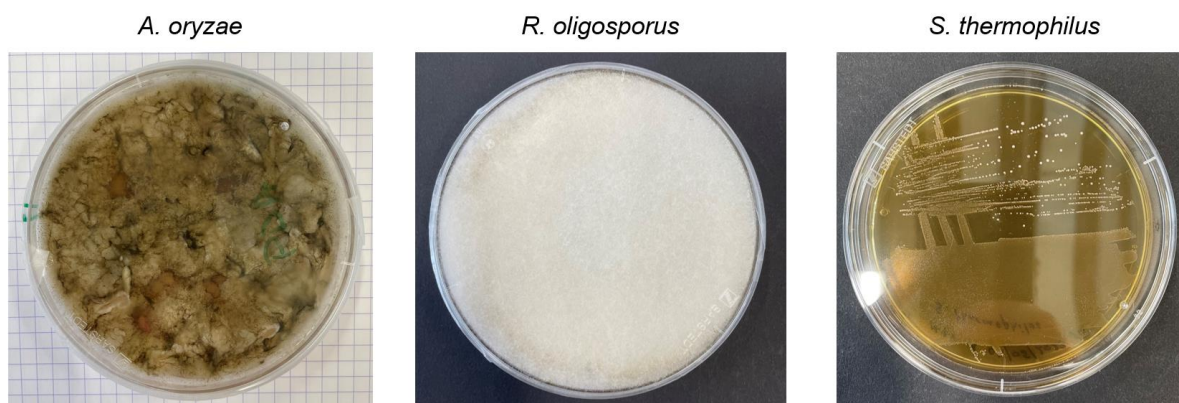


Figure 7 : Isolement et vérification de pureté des trois souches GRAS sur plaques de Pétri standards 92 x 16 mm avec milieu PDA pour *A. oryzae*, SDA pour *R. oligosporus* et M17A pour *S. thermophilus*.

4.2. Récupération des spores et suspension en milieu liquide

Les spores isolées et pures récupérées pour les souches *Aspergillus oryzae* DSM 1863 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862 à l'aide de boîtes de Pétri carrées 120 x 120 mm sont transférées dans une solution VL+ préalablement autoclavée et contenant 1.0 g/L de peptone et 8.5 g/L de NaCl (Maximum Recovery Diluent) (4016912, Biolife) avec en complément 5.0 g/L de Tween® 80 (93781, Fluka). La concentration de spores peut être mesurée par chambre de comptage de Neubauer (profondeur : 0.02 mm, surface : 0.0025 mm²).

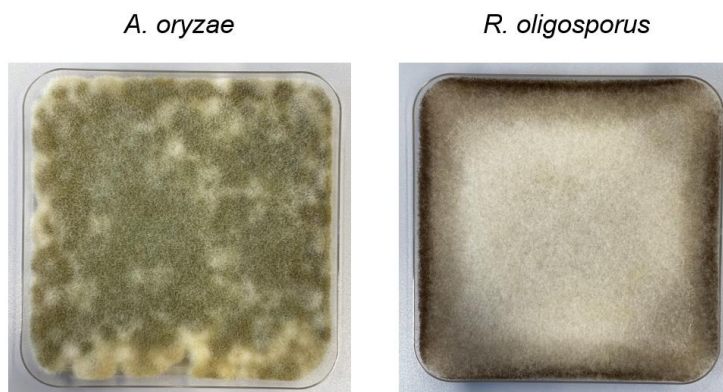


Figure 8 : Récupération des spores sur plaques de Pétri carrées 120 x 120 mm avec milieu PDA pour *A. oryzae* et SDA pour *R. oligosporus*.

À partir colonies isolées et pures, la souche *Streptococcus thermophilus* FAM2932 est mise en suspension liquide dans du M17 Broth (56156-500G-F, Sigma-Aldrich) à l'aide d'un Erlenmeyer et incubée à 37 °C avec une agitation de 150 RPM. La mesure est réalisée par chambre de comptage de Neubauer (profondeur : 0.02 mm, surface : 0.0025 mm²).

4.3. Walnut Press Cake (WPC)

Le WPC sous forme de poudre sèche a été fourni par l'Huilerie Pré Girard située à Pompaples en Suisse. Cinq sachets d'une contenance située entre 500 et 700 g sont mis à disposition et stockés à température ambiante.

4.4. Solution d'hydratation (HS)

Une HS contenant les éléments suivants a été préparée : 2.5 g/L NaNO₃ (71757, Fluka), 1 g/L KH₂PO₄ (205925000, Acros Organics), 0.5 g/L KCl (60130, Sigma-Aldrich) et 0.5 g/L MgSO₄ (63135, Fluka). Cette solution a été autoclavée pendant 15 minutes à 121 °C et permet d'hydrater le WPC. 80 mL de HS sont introduits pour chaque 100 g de WPC. L'ensemble est malaxé manuellement pendant quelques minutes à température ambiante dans un sac plastique stérile.

4.5. Solution acide (AS)

L'acidification du WPC est réalisée au moyen d'une solution d'acide acétique aqueuse (6755.1, Carl Roth) préparée selon une concentration voulue de 45 g/L (pH mesuré = 2.18). 5 mL d'AS sont introduits pour chaque 100 g de WPC. L'AS est ajoutée au WPC déjà hydraté. Le malaxage est effectué de la même manière que l'étape précédente.

4.6. Sel

Du sel (A2942.1000, PanReac AppliChem) est également ajouté dans le WPC hydraté et acidifié à hauteur de 1% (w/w). Le malaxage est effectué de la même manière que les étapes précédentes.

4.7. Inoculation du WPC

Le WPC sera inoculé de manière à contenir 3.6×10^7 spores ou colonies pour chaque 100 g de WPC préalablement hydraté, acidifié et salé. Le malaxage est effectué de la même manière que les étapes précédentes. Pour la coculture de *Streptococcus thermophilus* FAM2932 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862, 1.8×10^7 spores ou colonies de chaque souche est inoculé pour chaque 100 g de WPC préalablement hydraté, acidifié et salé.

4.8. Fermentation

Une fois le WPC hydraté, acidifié, salé et inoculé, des petits disques sont formés en moulant la pâte homogénéisée avec des petites boîtes de Pétri stériles 60 x 15 mm. La masse d'un disque équivaut à environ 30 g. Ces derniers sont disposés et espacés dans un plateau en verre couvert d'un film alimentaire perforé. La température d'incubation dépend de la souche inoculée (25 °C pour *Aspergillus oryzae* DSM 1863 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862, 37 °C pour *Streptococcus thermophilus* FAM2932 et 30 °C pour la coculture de *Streptococcus thermophilus* FAM2932 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862).

Les valeurs CO₂ [ppm] et l'humidité relative [%] des trois incubateurs ont été mesurées grâce à un analyseur de climat (0560 4401, Testo) et une sonde Bluetooth® (0554 1111, Testo) :

Tableau 2 : Mesure des valeurs CO₂ [ppm] et de l'humidité relative [%] des trois incubateurs utilisés pour la fermentation.

	CO ₂ [ppm]	HR [%]
Incubateur @ 25 °C	611	57.2
Incubateur @ 30 °C	611	46.1
Incubateur @ 37 °C	499	33.9

4.9. Echantillonnage, mesure du pH et de l'activité de l'eau (a_w)

2 g du WPC fermenté sont prélevés au moyen d'une spatule pour chacun des disques formés dès l'inoculation et après 24, 48 et 72 h dans un tube Falcon 15 mL. Les échantillons sont stockés dans un congélateur à une température de -18 °C. 2 g du WPC fermenté sont également ajoutés à 20 mL d'eau déminéralisée pour mesure du pH (691, Metrohm). Ce mélange peut être réalisé dans un tube Falcon 50 mL afin de faciliter la mesure avec la sonde. Pour *Streptococcus thermophilus* FAM2932, un volume prédéfini de la solution d'eau déminéralisée contenant les 2 g de WPC fermenté sont également étalés sur une plaque M17

Agar (4017192, Biolife) pour dénombrement aux temps 24, 48 et 72 h afin de suivre l'évolution du nombre de CFU par gramme de WPC. Des dilutions doivent être appliquées pour augmenter la précision des résultats. À noter que cette quantification demeure impossible pour les souches *Aspergillus oryzae* DSM 1863 et *Rhizopus oligosporus* DSM 1862 étant donné qu'il s'agit de champignons filamenteux.

L'activité de l'eau est parallèlement mesurée par un a_w -mètre (AW SPRINT TH500, Novasina) sur l'un des disques pour chacune des trois souches au début (dès l'inoculation) et à la fin de l'expérience (après 72 h d'incubation).

Avant que l'acide ellagique ne soit extrait, les tubes Falcon 15 mL sont séchés pendant 24 h à 50 °C dans un four (UF110plus, Memmert). Une pesée est effectuée avant et après séchage afin de déterminer la teneur en eau (%Water) de chaque échantillon.

4.10. Extraction d'acide ellagique

Une solution méthanol (6712-25, Macron Fine Chemicals) - eau 80:20 (v/v) est préparée. 5 mL de ce mélange sont ajoutés à 200 mg d'échantillon déshydraté puis l'ensemble est extrait dans un bain à ultrasons (TPC-120, TELSONIC) pendant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 3000 RPM pendant 10 minutes à température ambiante. 500 μ L de surnageant sont collectés et le pellet restant est réextrait selon le même procédé. Les nouveaux 500 μ L sont combinés avec les premiers 500 μ L pour un volume final de 1 mL. Ce volume est finalement filtré avec des CHROMAFIL® Xtra PTFE-45/13, dont la taille des pores vaut 0.45 μ m et le diamètre 13 mm (729209, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG).

4.11. Analyse à l'HPLC-DAD

La quantification d'acide ellagique et d'urolithine A a été réalisée au moyen d'un système HPLC-DAD 1220 Infinity LC (G4294B, Agilent Technologies) avec une colonne Kinetex® 2.6 μ m C18 100 Å de taille 150 x 4.6 mm (00F-4462-E0, Phenomenex). La longueur d'onde sélectionnée était de 255 nm pour l'acide ellagique et 280 nm pour l'urolithine A. La température de la colonne a été maintenue à 40 °C, le débit à 0.5 mL/min et la limite de haute pression à 600 bar. L'éluant A consistait en de l'H₂O + 0.1% acide formique (v/v) (147930010, Acros Organics), l'éluant B en du CH₃CN (2856-25, Macron Fine Chemicals) + 0.1% acide formique (v/v) (147930010, Acros Organics). Le descriptif du gradient se trouve dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Gradient utilisé pour l'analyse à l'HPLC-DAD.

Temps [min]	%A	%B	Débit [mL/min]
0.0	95	5	0.5
10.0	60	40	0.5
18.0	10	90	0.5
24.0	10	90	0.5
24.1	95	5	0.5

Le volume d'injection a été fixé à 2 µL avec un lavage d'aiguille entre chaque échantillon.

4.12. Courbes de calibration

Deux solutions stock concentrées à 1000 µg/mL ont respectivement été préparées pour l'acide ellagique et l'urolithine A. Environ exactement 10.0 mg d'acide ellagique (45140, Fluka) ont été pesés dans un ballon jaugé de 10 mL. Le ballon est complété à la jauge avec du DMSO (67-68-5, Sigma-Aldrich) uniquement. Pour l'urolithine A (1143-70-0, Sigma-Aldrich), les 10.0 mg sont solubilisés avec 1 mL de DMSO (67-68-5, Sigma-Aldrich) puis le ballon est complété à la jauge avec une solution méthanol (6712-25, Macron Fine Chemicals) - eau 80:20 (v/v).

Des dilutions avec une solution méthanol (6712-25, Macron Fine Chemicals) - eau 80:20 (v/v) sont ensuite appliquées pour obtenir des standards ayant les concentrations suivantes : 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.25 µg/mL et 0.1 µg/mL.

Les courbes de calibration et spectres UV de l'acide ellagique et de l'urolithine A se trouvent dans l'annexe [A1,A2,A3].

4.13. LOD & LOQ

La limite de détection (LOD) est déterminée à l'aide de l'équation suivante :

Équation 1 : Détermination de la limite de détection (LOD).

$$LOD [mg/L] = 3.3 \times \frac{\text{standard error}}{\text{slope of the calibration curve}}$$

La limite de quantification (LOQ) est déterminée à l'aide de l'équation suivante :

Équation 2 : Détermination de la limite de quantification (LOQ).

$$LOQ [mg/L] = 10 \times \frac{\text{standard error}}{\text{slope of the calibration curve}}$$

4.14. Tests sur l'aberration

Un premier test du quotient de Dixon (Q-test) est réalisé afin de déterminer si la valeur maximale ou minimale est aberrante pour une taille d'échantillons valant 3 à un niveau de signification $\alpha = 0.05$.

Équation 3 : Quotient Q pour le test de valeur maximale.

$$\text{Test valeur max. } x_{(n)} : Q = \frac{x_{(n)} - x_{(n-1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$$

Équation 4 : Quotient Q pour le test de valeur minimale.

$$\text{Test valeur min. } x_{(1)} : Q = \frac{x_{(2)} - x_{(1)}}{x_{(n)} - x_{(1)}}$$

Si le quotient Q est dans les deux cas inférieur à $r_{n,\alpha} = 0.970$, $x_{(n)}$ et $x_{(1)}$ ne sont pas des valeurs aberrantes.

Un second test de David, Hartley & Pearson (DHP) est exécuté afin de savoir si une erreur grossière est contenue dans un échantillon d'une taille $n = 3$ à un niveau de signification $\alpha = 0.05$.

Équation 5 : Statistique de test P .

$$P = \frac{x_{\max} - x_{\min}}{s}$$

Si P est inférieur à $p_{n,\alpha} = 1.999$, l'échantillon ne contient pas de valeurs aberrantes.

4.15. Mesure de la dispersion et intervalle de confiance

La mesure de la dispersion est obtenue en calculant le coefficient de variation CV .

Équation 6 : Coefficient de variation.

$$CV [\%] = \frac{s}{\tilde{x}} \times 100$$

L'intervalle de confiance T autour de la moyenne \tilde{x} est obtenu avec le facteur de Student $t = 4.303$ à une probabilité $P = 95 \%$ avec un degré de liberté $\phi = 2$.

Équation 7 : Intervalle de confiance.

$$T = \frac{s \times t}{\sqrt{N}}$$

5. Résultats

5.1. Suivis de fermentation

Un suivi de fermentation a été réalisé pour les quatre fermentations, c'est-à-dire pour *S. thermophilus*, *A. oryzae*, *R. oligosporus* et la coculture (*S. thermophilus* & *R. oligosporus*). Les valeurs d'activité de l'eau, de pH et de teneur en eau ont été mesurées. Pour *S. thermophilus* en particulier, l'évolution du nombre de CFU/g. WPC a pu être suivie. Des photographies ont également été prises chaque 24 h.

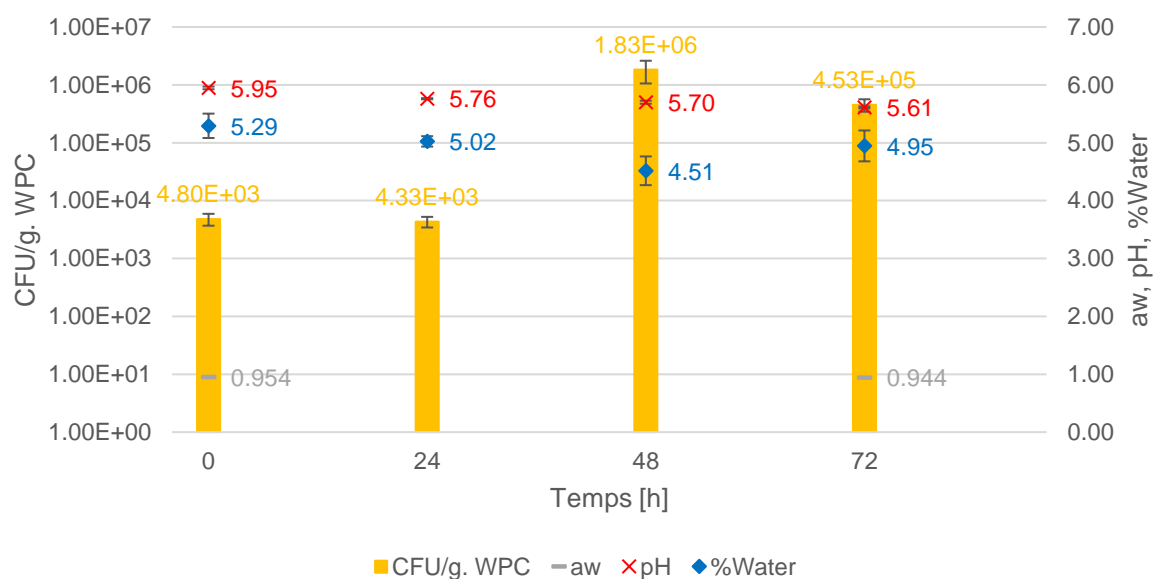


Figure 9 : Suivi de fermentation pour *S. thermophilus* (incubation à 37 °C).

S. thermophilus @ 37 °C

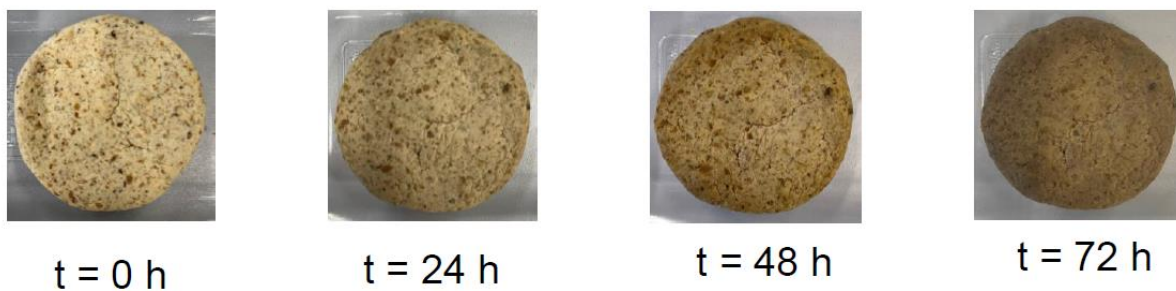


Figure 10 : Photographies des disques inoculés avec *S. thermophilus* prises à des intervalles de 24 h.

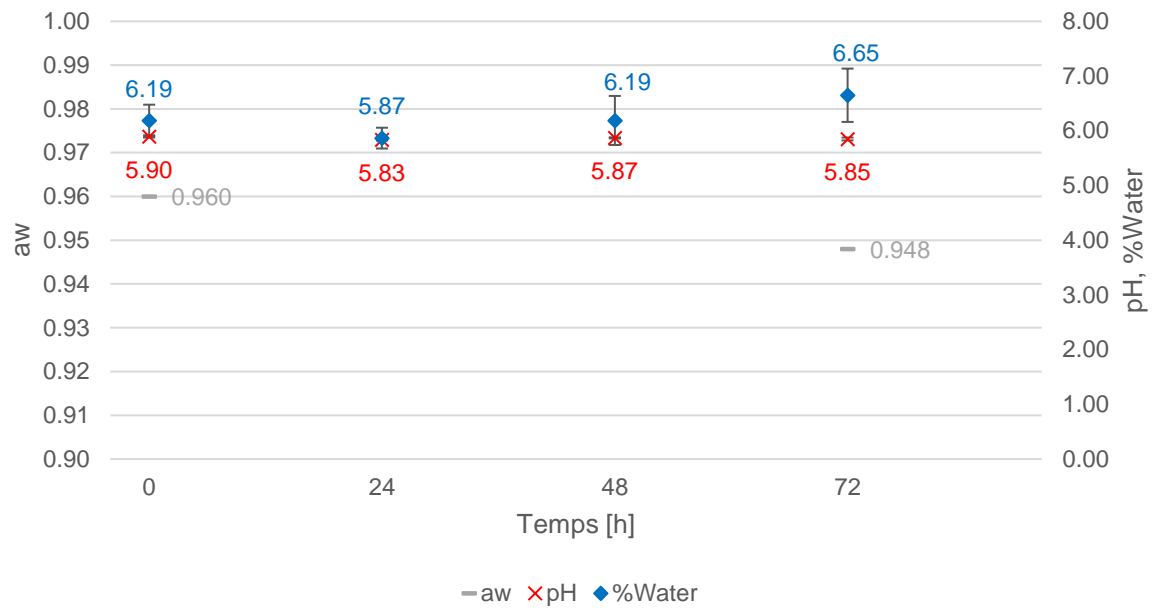


Figure 11 : Suivi de fermentation pour *A. oryzae* (incubation à 25 °C).

A. oryzae @ 25 °C

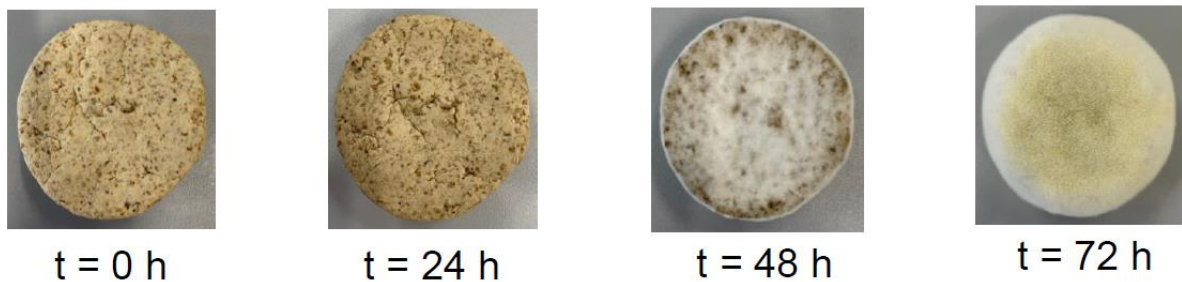


Figure 12 : Photographies des disques inoculés avec *A. oryzae* prises à des intervalles de 24 h.

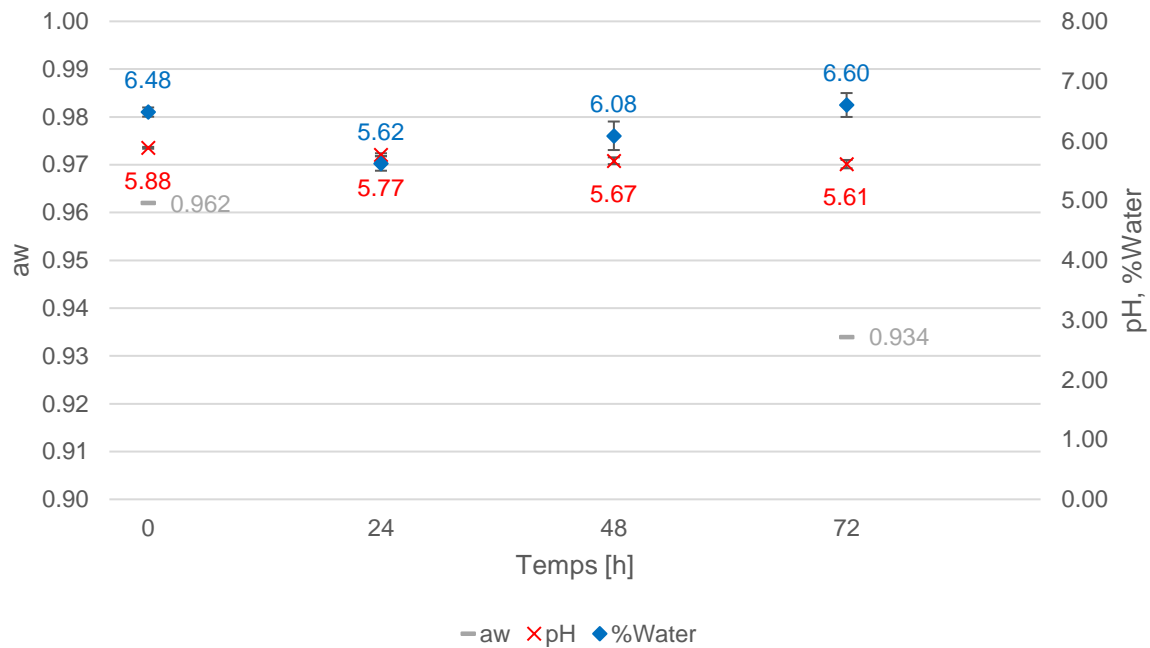


Figure 13 : Suivi de fermentation pour *R. oligosporus* (incubation à 25 °C).

R. oligosporus @ 25 °C

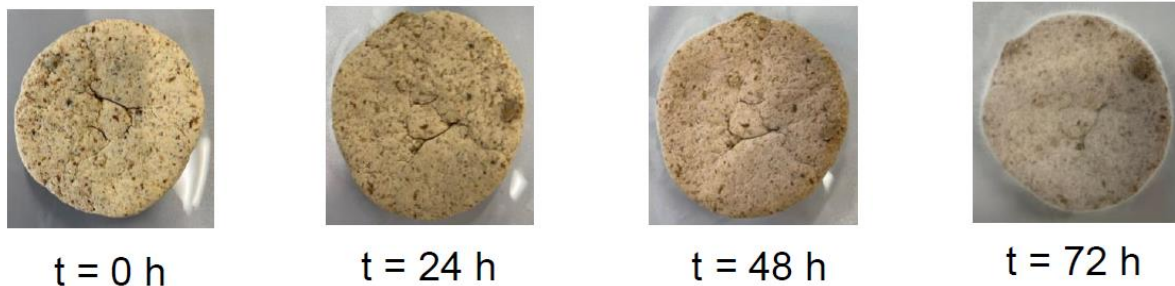


Figure 14 : Photographies des disques inoculés avec *R. oligosporus* prises à des intervalles de 24 h.

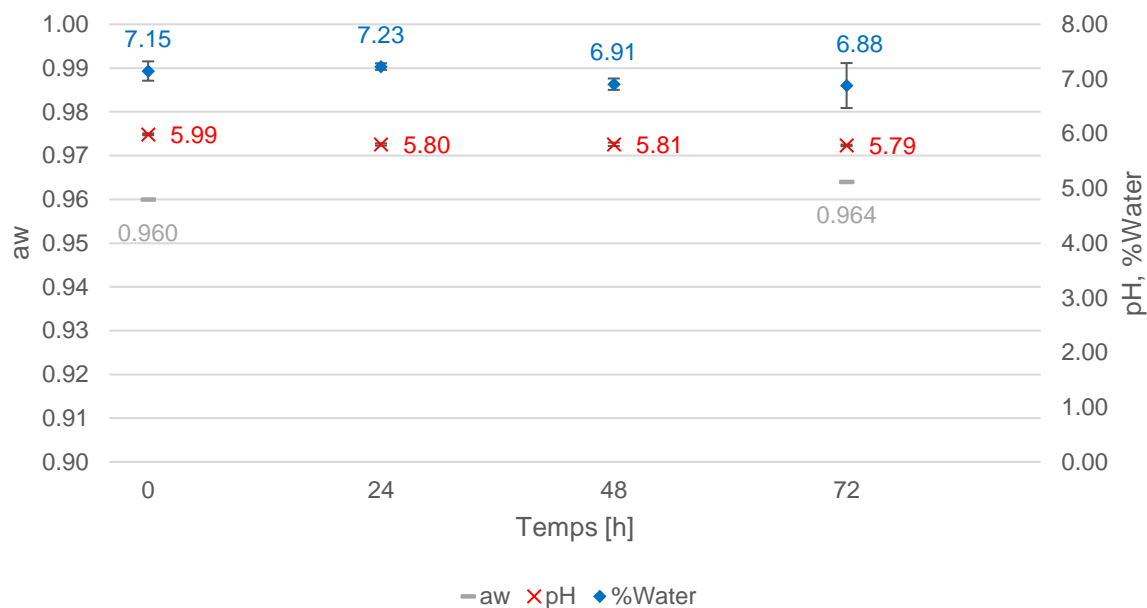


Figure 15 : Suivi de fermentation pour la coculture, c'est-à-dire *S. thermophilus* & *R. oligosporus* cultivés conjointement (incubation à 30 °C).

S. thermophilus & *R. oligosporus* (coculture) @ 30 °C

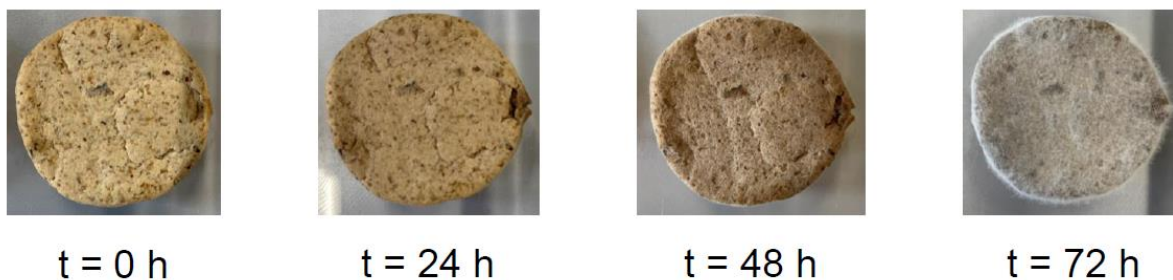


Figure 16 : Photographies des disques inoculés avec *S. thermophilus* & *R. oligosporus* (coculture) prises à des intervalles de 24 h.

5.2. HPLC-DAD

Grâce aux courbes de calibration de l'HPLC-DAD, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de l'acide ellagique et de l'urolithine A ont pu être déterminées.

Tableau 4 : LOD & LOQ calculées pour l'acide ellagique et l'urolithine A.

	Acide ellagique	Urolithine A
LOD [mg/L]	8.12	3.55
LOQ [mg/L]	24.6	10.8

Aucune urolithine A n'a été détectée dans les échantillons avec la méthode HPLC-DAD. La concentration d'acide ellagique a néanmoins pu être définie pour chacun d'entre eux. Les valeurs des tests sur l'aberration, de la mesure de la dispersion et de l'intervalle de confiance sont données.

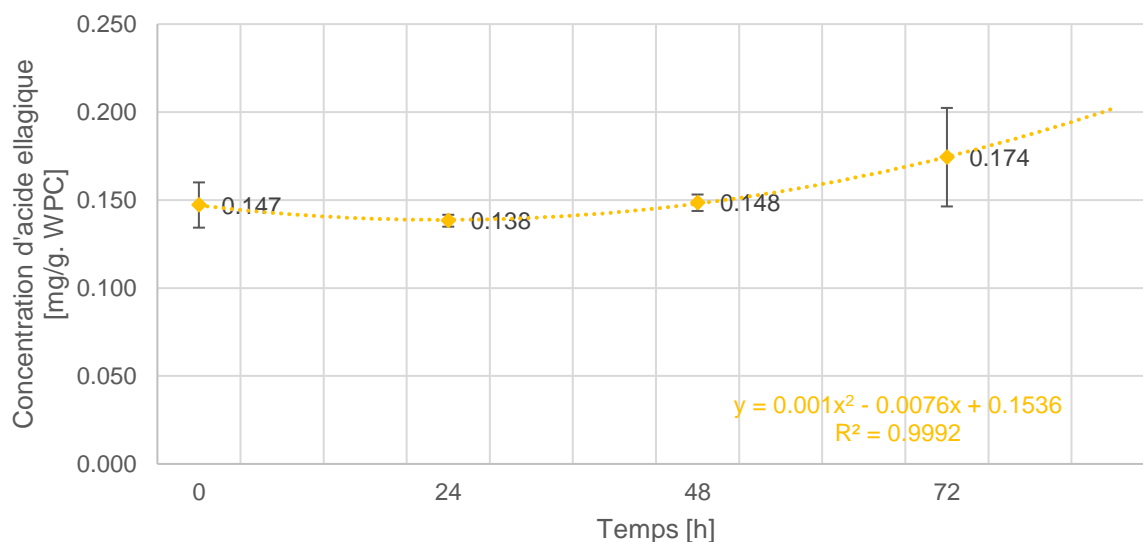


Figure 17 : Libération d'acide ellagique pour *S. thermophilus*. Une courbe de tendance polynomiale d'ordre 2 a été appliquée.

Tableau 5 : Tests sur l'aberration pour la fermentation de *S. thermophilus*.

	Q-test : valeur max.	Q-test : valeur min.	Test DHP
0 h	0.656	0.344	1.968
24 h	0.238	0.762	1.914
48 h	0.603	0.397	1.986
72 h	0.564	0.436	1.995
Limite ($r_{n=3, \alpha=0.05}$) = 0.970			Limite ($p_{n=3, \alpha=0.05}$) = 1.999

Tableau 6 : Mesure de la dispersion et intervalle de confiance pour la fermentation de *S. thermophilus*.

	CV [%]	T [mg/g. WPC]
0 h	8.74	3.19E-02
24 h	2.44	8.38E-03
48 h	3.15	1.16E-02
72 h	16.1	6.95E-02

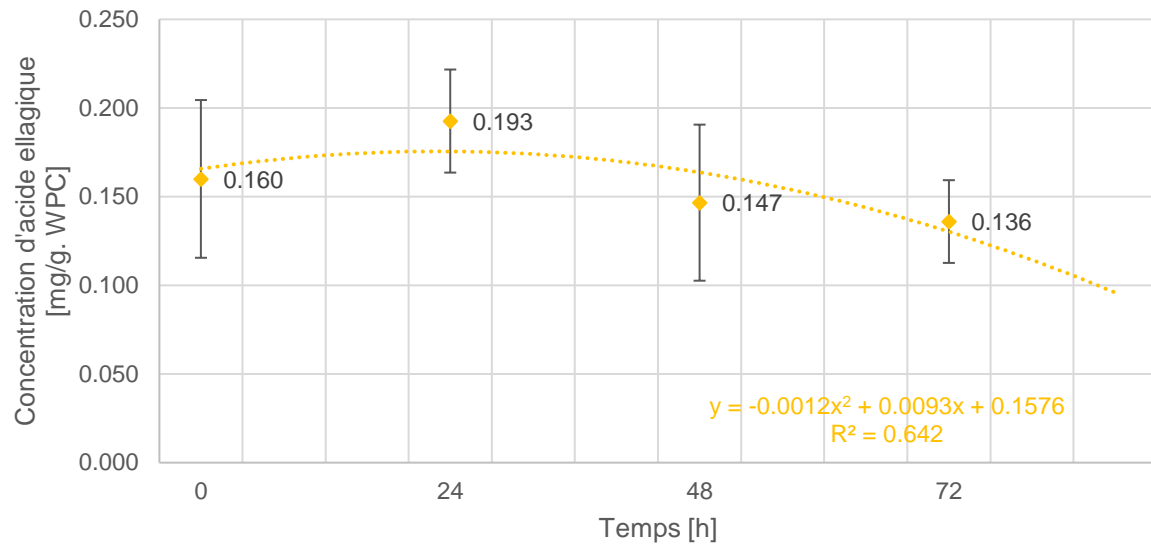


Figure 18 : Libération d'acide ellagique pour *A. oryzae*. Une courbe de tendance polynomiale d'ordre 2 a été appliquée.

Tableau 7 : Tests sur l'aberration pour la fermentation de *A. oryzae*.

	Q-test : valeur max.	Q-test : valeur min.	Test DHP
0 h	0.959	0.0410	1.767
24 h	0.760	0.240	1.915
48 h	0.969	0.0306	1.758
72 h	0.947	0.0534	1.778
Limite ($r_n = 3, \alpha = 0.05$) = 0.970			Limite ($p_n = 3, \alpha = 0.05$) = 1.999

Tableau 8 : Mesure de la dispersion et intervalle de confiance pour la fermentation de *A. oryzae*.

	CV [%]	T [mg/g. WPC]
0 h	27.8	1.11E-01
24 h	15.1	7.22E-02
48 h	30.0	1.09E-01
72 h	17.2	5.79E-02

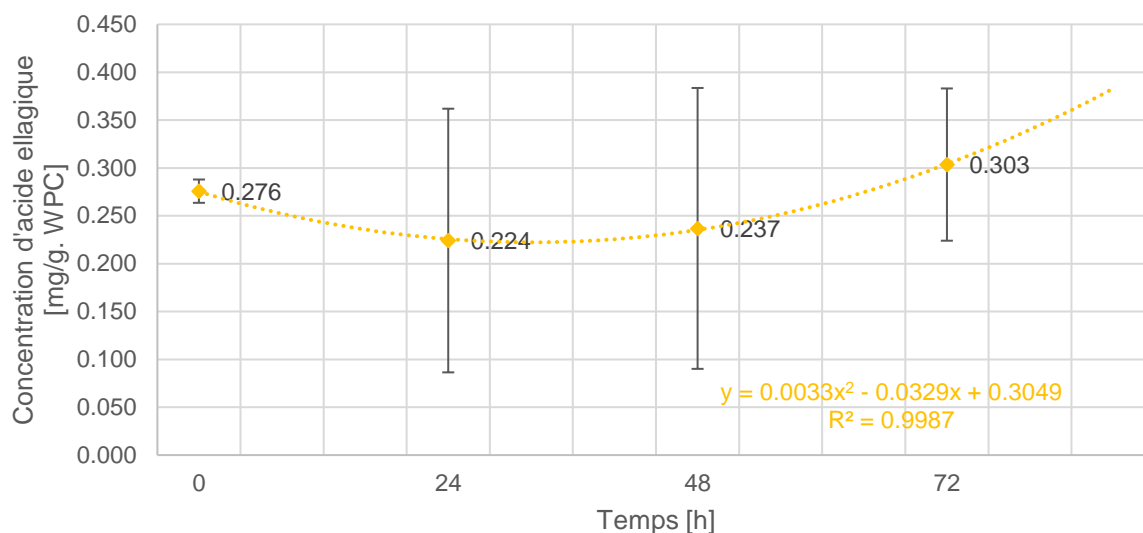


Figure 19 : Libération d'acide ellagique pour *R. oligosporus*. Une courbe de tendance polynomiale d'ordre 2 a été appliquée. Les écarts-types aux temps 24, 48 et 72 h sont élevés compte tenu de la présence d'un double pic difficile à intégrer manuellement (échantillons concernés : 24.3, 48.1 et 72.1).

Tableau 9 : Tests sur l'aberration pour la fermentation de *R. oligosporus*.

	Q-test : valeur max.	Q-test : valeur min.	Test DHP
0 h	0.382	0.618	1.982
24 h	0.949	0.0510	1.776
48 h	0.960	0.0398	1.766
72 h	0.406	0.594	1.988
Limite ($r_{n=3, \alpha=0.05}$) = 0.970			Limite ($p_{n=3, \alpha=0.05}$) = 1.999

Tableau 10 : Mesure de la dispersion et intervalle de confiance pour la fermentation de *R. oligosporus*.

	CV [%]	T [mg/g. WPC]
0 h	4.42	3.03E-02
24 h	61.4	3.42E-01
48 h	62.0	3.65E-01
72 h	26.2	1.98E-01

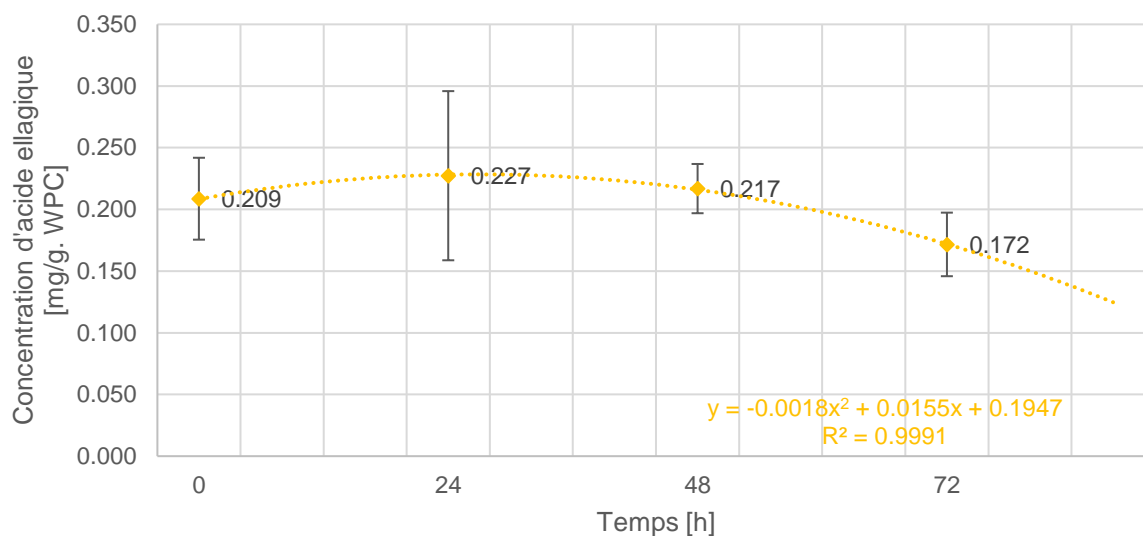


Figure 20 : Libération d'acide ellagique pour *S. thermophilus* & *R. oligosporus* (coculture). Une courbe de tendance polynomiale d'ordre 2 a été appliquée.

Tableau 11 : Tests sur l'aberration pour la fermentation de *S. thermophilus* & *R. oligosporus* (coculture).

	Q-test : valeur max.	Q-test : valeur min.	Test DHP
0 h	0.802	0.198	1.888
24 h	0.903	0.0968	1.813
48 h	0.0669	0.933	1.789
72 h	0.452	0.548	1.997
Limite ($r_n = 3, \alpha = 0.05$) = 0.970			Limite ($p_n = 3, \alpha = 0.05$) = 1.999

Tableau 12 : Mesure de la dispersion et intervalle de confiance pour la fermentation de *S. thermophilus* & *R. oligosporus* (coculture).

	CV [%]	T [mg/g. WPC]
0 h	15.9	8.25E-02
24 h	30.2	1.70E-01
48 h	9.20	4.96E-02
72 h	15.0	6.40E-02

6. Discussion

6.1. Suivis de fermentation

Les suivis de fermentation sont importants à considérer, en ce sens qu'ils permettent d'analyser les facteurs affectant la croissance et la survie des micro-organismes dans les denrées alimentaires. Le livre « Food Microbiology » de Martin R Adams, Maurice O Moss et Peter McClure classe le pH et l'activité de l'eau comme facteurs intrinsèques (limitations du substrat), tandis que l'humidité relative, la température et l'atmosphère gazeuse appartiennent aux facteurs extrinsèques (limitations environnementales) [31].

Lors des différentes fermentations, la production d'acides organiques par les différentes souches a pour effet de diminuer le pH au fil du temps. La diminution maximale de pH est observée pour la fermentation de *S. thermophilus* (différence calculée de 0.34 pour 72 h de fermentation). Selon la littérature existante, le pH optimal de croissance vaut 6.5 pour *S. thermophilus* [32]. Un pH initial et optimal pour *A. oryzae* a été observé entre 5 et 8 et celui de *R. oligosporus* équivaudrait à 7 [33]. Le livre cité juste auparavant indique un optimum de pH de 3.5 – 4.0 pour les champignons filamenteux et 5.0 – 6.0 pour les lactobacilles et bactéries acétiques. À ces valeurs, la croissance serait la plus rapide. Les plages de pH varient donc selon les expériences recensées. Dans le cas de ce projet, la gamme de pH pour *A. oryzae* et *R. oligosporus* se situe entre 5.61 et 5.90 et celle pour *S. thermophilus* entre 5.61 et 5.95. Pour *S. thermophilus* en particulier, le nombre de CFU/g. WPC est le plus élevé à un pH de 5.70.

L'activité de l'eau (a_w) donne une indication sur le mouvement de l'eau de l'environnement vers le cytoplasme ou vice-versa. La teneur en eau (%Water), cependant, ne donne pas d'information sur le degré de disponibilité de l'eau. D'après le livre déjà cité, la relation entre ces deux propriétés semblerait être très sensible à la température et dépendre de l'ajout ou retrait d'eau d'un substrat. En l'occurrence, l'activité de l'eau et la teneur en eau restent indépendamment stables entre elles durant toutes les fermentations.

Tableau 13 : Activités minimales de l'eau auxquelles une croissance active est possible [34].

Group of micro-organism	Minimum a_w
Most Gram-negative bacteria	0.97
Most Gram-positive bacteria	0.90
Most yeasts	0.88
Most filamentous fungi	0.80
Halophilic bacteria	0.75
Xerophilic fungi	0.61

Toutes les mesures effectuées pour l' a_w sont supérieures à 0.80 pour les champignons filamenteux (*A. oryzae* et *R. oligosporus*) et supérieures à 0.90 pour la bactérie à Gram positif (*S. thermophilus*). Une croissance active a donc pu avoir lieu. La teneur en eau atteint un seuil minimal chez *S. thermophilus* (4.51% après 48 h de fermentation), confirmant ainsi l'hypothèse

de la sensibilité à la température, puisque dans ce cas la température d'incubation est la plus élevée (37 °C).

Les mesures des valeurs CO₂ et de l'humidité relative ont également un impact sur le processus de fermentation. Dans des conditions aérobies, l'inhibition de la croissance serait plus importante et cet effet s'accentuerait avec la diminution de température (la solubilité du CO₂ est plus haute à des températures plus basses). À une forte humidité relative, l'eau est transférée de la phase gazeuse à la denrée alimentaire possédant une faible activité de l'eau. Les mesures prises par l'analyseur de climat et la sonde Bluetooth® ont démontré la plus haute humidité relative (57.2 %) dans l'incubateur ayant la température la plus basse (25 °C). Les températures d'incubation pour *A. oryzae* et *R. oligosporus* ont d'ailleurs été arbitrairement choisies d'après les anciens travaux réalisés. L'incubateur à 37 °C pour *S. thermophilus* a été sélectionné d'après un article énonçant que : « optimum growth temperatures for 9 strains of *S. thermophilus* [...] ranged from 35 to 42 °C » [35]. Une température intermédiaire de 30 °C a été adoptée pour la coculture. À noter que chaque micro-organisme possède une température minimale (T_{min}), optimale (T_{opt}) et maximale (T_{max}) auxquelles il peut se développer. Ces trois températures sont communément appelées températures cardinales et chacune d'entre elles a un effet spécifique sur le taux de croissance du micro-organisme en question.

6.2. HPLC-DAD

Concernant les résultats de l'HPLC-DAD, la plus grande libération d'acide ellagique se retrouve dans la fermentation de *R. oligosporus*, à laquelle une concentration de 0.303 ± 0.198 mg/g. WPC (± 0.080 ; 95 % ; 3) est atteinte après 72 h de fermentation. Dans les précédents travaux, il avait également été déduit que la fermentation de *R. oligosporus* permettait la meilleure libération d'acide ellagique. Malgré l'intégration manuelle rendue parfois difficile (tailing peak avec parfois quelques impuretés), les écart-types pourraient être davantage réduits avec un prélèvement sur une zone définie du disque (pas d'échantillonnage sur des régions aléatoires afin de minimiser les variations). Force est de constater que toutes les valeurs des expériences réalisées en triplicata ont néanmoins été prises en compte, puisque aucune n'a dépassé les limites imposées par le Q-test et le test DHP. À titre informatif, le tableau suivant donne la teneur moyenne d'acide ellagique contenu dans certains aliments et boissons :

Tableau 14 : Aliments et boissons contenant de l'acide ellagique (S.D. ^a = standard deviation ; FW ^b = fresh weight ; DB ^c = dry basis) [36].

Food or Beverage		Mean Content	S.D. ^a
Berries	Black Raspberry, raw	38.00 mg/100 g FW ^b	0.00
	Blackberry, raw	43.67 mg/100 g FW	24.54
	Cloudberry, raw	15.30 mg/100 g FW	0.00
	Red raspberry, raw	2.12 mg/100 g FW	8.35
	Strawberry, raw	1.24 mg/100 g FW	0.80
	Red raspberry, jam	1.14 mg/100 g FW	0.00
Berry juices	Black Muscadine grape, pure juice	0.90 mg/100 mL	0.95
	Green Muscadine grape, pure juice	0.93 mg/100 mL	0.78
	Red raspberry, pure juice	0.84 mg/100 mL	1.10
Tropical fruit juices	Pomegranate, pure juice	2.06 mg/100 mL	1.53
	Pomegranate, juice from concentrate	17.28 mg/100 mL	0.00
Nuts	Chestnut, raw	735.44 mg/100 g FW	240.69
	Japanese walnut	15.67 mg/100 g FW	7.64
	Walnut	28.50 mg/100 g FW	4.95
Alcoholic beverages	Walnut, liquor	1.22 mg/100 mL	0.42
	Cognac	1.13 mg/100 mL	1.42
	Rum	0.21 mg/100 mL	0.00
	Scotch, whisky	0.82 mg/100 mL	0.32
Mushrooms	<i>Fistulina hepatica</i>	2378 mg/kg DB ^c	59,3

La teneur moyenne d'acide ellagique contenue dans les noix est de 0.285 mg/g FW. Cette valeur se rapproche de la concentration obtenue après 72 h de fermentation avec la souche *R. oligosporus*, mais doit toutefois être considérée avec précaution puisque l'unité est en poids frais. Le poids frais inclut non seulement le poids sec, mais aussi la potentielle teneur en eau qui serait perdue lors d'un séchage (c'est le cas de la méthode appliquée ici). Selon l'USDA FoodData Central, la valeur moyenne d'eau contenue dans la noix serait de 3.14 g pour une portion de 100 g [37]. Ainsi, l'équivalence en poids sec peut être retrouvée par la formule suivante :

Équation 8 : Calcul de la teneur de référence d'acide ellagique contenue dans les noix.

$$0.285 \frac{\text{mg}}{\text{g FW}} \times \frac{\text{g FW}}{(1 - 0.0314) \text{ g DW}} = 0.294 \frac{\text{mg}}{\text{g DW}}$$

Cette valeur calculée se rapproche davantage à celle reçue expérimentalement pour la fermentation de *R. oligosporus* après 72 h.

L'évolution de la concentration d'acide ellagique en fonction du temps semble par ailleurs suivre une courbe de tendance polynomiale d'ordre 2. L'orientation de la parabole, dépendant du signe du coefficient *a* dans l'équation $f(x) = ax^2 + bx + c$, varie selon les fermentations. Pour *S. thermophilus* et *R. oligosporus*, la parabole s'ouvre vers le haut tandis que pour *A. oryzae* et la coculture (*S. thermophilus* & *R. oligosporus*), la parabole s'ouvre vers le bas. Ce constat démontre que la coculture n'est pas forcément une option efficiente pour obtenir une

teneur finale en acide ellagique élevée. Pour répondre à l'hypothèse de ce projet, *S. thermophilus* n'est pas la souche optimale pour la libération d'acide ellagique ; c'est *R. oligosporus* qui demeure en première place. Une autre constatation intéressante est que la libération d'acide ellagique n'est pas directement liée à la concentration bactérienne présente dans le tourteau de noix. Les résultats expérimentaux pour *S. thermophilus* démontrent spécifiquement une plus forte teneur d'acide ellagique à une concentration de 4.53E+05 CFU/g. WPC et après 72 h de fermentation.

En dernier lieu, l'urolithine A n'a pas pu être détectée dans les échantillons. Avec de telles données, il aurait été possible d'observer si une conversion de l'acide ellagique en urolithine A avait véritablement pu avoir lieu. Typiquement, une diminution progressive de la concentration d'acide ellagique aurait pu amener à une augmentation de la concentration d'urolithine A. Une autre méthode (HPLC-MS) plus sensible devrait être considérée pour confirmer cette hypothèse. L'établissement d'une tendance symétrique ou non par rapport à celle de l'acide ellagique pourrait ainsi être vérifiée. Dans l'éventualité où aucune urolithine A ne serait présente dans les échantillons même avec une méthode HPLC-MS établie, il serait pertinent d'y détecter les possibles autres types d'urolithines cités dans la partie introductive.

7. Conclusion et perspectives

La meilleure libération d'acide ellagique a été observée lors de la fermentation avec la souche *R. oligosporus* après une durée d'incubation de 72 h. La nouvelle souche *S. thermophilus* testée lors de ce projet n'a pas dépassé la teneur en acide ellagique obtenue avec *R. oligosporus*. Il a également été montré que la coculture effectuée avec *S. thermophilus* & *R. oligosporus* n'était pas la solution optimale pour parvenir à une concentration finale d'acide ellagique élevée. Afin de diminuer les écart-types sur les expériences réalisées en triplicata, une zone de prélèvement devrait être définie au préalable.

Concernant l'urolithine A, une méthode HPLC-MS permettrait d'établir un lien réciproque entre la diminution d'acide ellagique et la production d'urolithine A. La détection d'autres types d'urolithines pourrait également être une éventualité intéressante pour le futur.

8. Bibliographie

- [1] Ascacio-Valdés, Leonardo Sepúlveda, J. B.-F. A., Barragán, A. P.-, González, M. Ángel A., & Aguilar, C. N. (2018). Ellagic acid production by solid-state fermentation influenced by the inert solid supports. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(9), 750–757. <https://doi.org/https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i9.1796>
- [2] Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- [3] Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied microbiology and biotechnology*, 78(2), 189–199. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- [4] García-Villalba, R., Tomás-Barberán, F. A., Iglesias-Aguirre, C. E., Giménez-Bastida, J. A., González-Sarriás, A., Selma, M. V., & Espín, J. C. (2023). Ellagitannins, urolithins, and neuroprotection: Human evidence and the possible link to the gut microbiota. *Molecular aspects of medicine*, 89, 101109. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101109>
- [5] Zhang, X., Fang, Y., Yang, G., Hou, X., Hai, Y., Xia, M., He, F., Zhao, Y., & Liu, S. (2022). Isolation and characterization of a novel human intestinal *Enterococcus faecium* FUA027 capable of producing urolithin A from ellagic acid. *Frontiers in nutrition*, 9, 1039697. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1039697>
- [6] Liu, Q., Liu, S., Ye, Q., Hou, X., Yang, G., Lu, J., Hai, Y., Shen, J., & Fang, Y. (2022). A Novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 Isolated from Human Breast Milk Capable of Producing Urolithin A from Ellagic Acid. *Foods*, 11(20), 3280. <https://doi.org/10.3390/foods11203280>
- [7] Selma, M. V., Romo-Vaquero, M., García-Villalba, R., González-Sarriás, A., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2016). The human gut microbial ecology associated with overweight and obesity determines ellagic acid metabolism. *Food & function*, 7(4), 1769–1774. <https://doi.org/10.1039/c5fo01100k>
- [8] GRAS Notice for Urolithin A, <https://www.fda.gov/media/132889/download> (visité le 24.02.2023)
- [9] Kang, I., Buckner, T., Shay, N. F., Gu, L., & Chung, S. (2016). Improvements in Metabolic Health with Consumption of Ellagic Acid and Subsequent Conversion into Urolithins: Evidence and Mechanisms. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 7(5), 961–972. <https://doi.org/10.3945/an.116.012575>
- [10] Liu, Q., Liu, S., Ye, Q., Hou, X., Yang, G., Lu, J., Hai, Y., Shen, J., & Fang, Y. (2022). A Novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 Isolated from Human Breast Milk Capable of Producing Urolithin A from Ellagic Acid. *Foods*, 11(20), 3280. <https://doi.org/10.3390/foods11203280>
- [11] Zhang, X., Fang, Y., Yang, G., Hou, X., Hai, Y., Xia, M., He, F., Zhao, Y., & Liu, S. (2022). Isolation and characterization of a novel human intestinal *Enterococcus faecium*

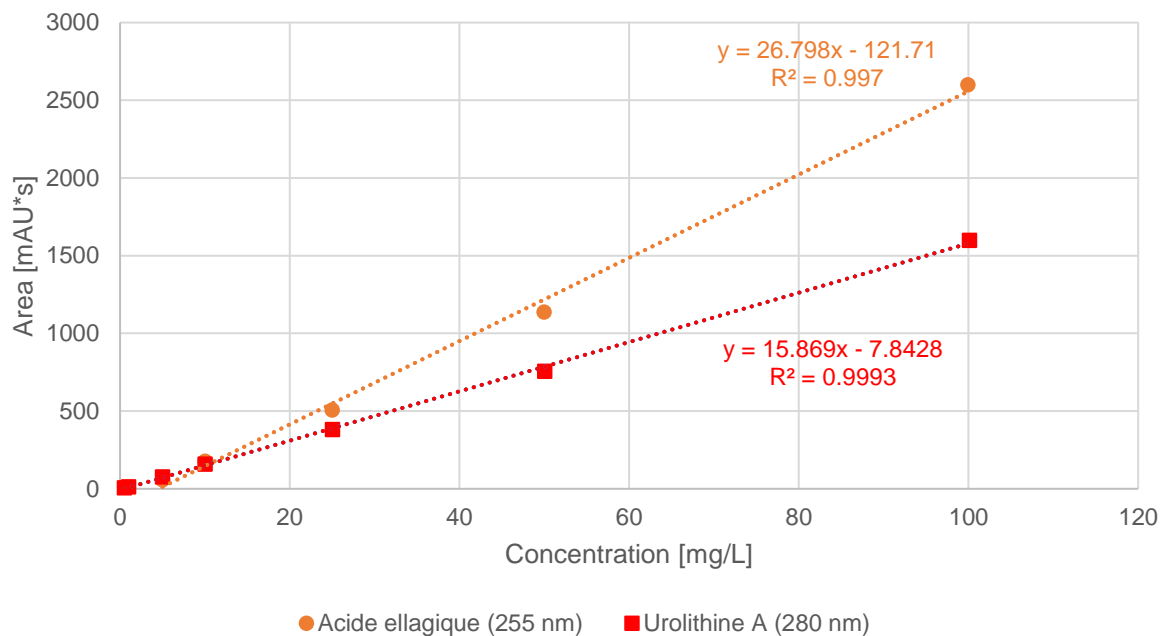
- FUA027 capable of producing urolithin A from ellagic acid. *Frontiers in nutrition*, 9, 1039697. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1039697>
- [12] Liu, Q., Liu, S., Ye, Q., Hou, X., Yang, G., Lu, J., Hai, Y., Shen, J., & Fang, Y. (2022). A Novel *Streptococcus thermophilus* FUA329 Isolated from Human Breast Milk Capable of Producing Urolithin A from Ellagic Acid. *Foods*, 11(20), 3280. <https://doi.org/10.3390/foods11203280>
- [13] G. Tortora, B. Funke, Ch. Chas, Introduction à la Microbiologie, Pearson ERPI (2017, 3e édition), p. 833-834
- [14] Microbiote intestinal, https://patrice-hardouin.canoprof.fr/eleve/Sciences%20en%20H%C3%B4tellerie-Restauration/1_STHR/nutrition_humaine_eleve/activities/microbiote.xhtml (visité le 03.03.2023)
- [15] GRAS notices, https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=51&type=basic&search= (visité le 03.03.2023)
- [16] Présomption d'innocuité reconnue (QPS), <https://www.efsa.europa.eu/fr/applications/qps-assessment> (visité le 03.03.2023)
- [17] Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. (2013). Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 270418. <https://doi.org/10.1155/2013/270418>
- [18] Espín, J. C., Larrosa, M., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. (2013). Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 270418. <https://doi.org/10.1155/2013/270418>
- [19] García-Villalba, R., Giménez-Bastida, J. A., Cortés-Martín, A., Ávila-Gálvez, M. Á., Tomás-Barberán, F. A., Selma, M. V., Espín, J. C., & González-Sarrías, A. (2022). Urolithins: a Comprehensive Update on their Metabolism, Bioactivity, and Associated Gut Microbiota. *Molecular nutrition & food research*, 66(21), e2101019. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202101019>
- [20] Aichinger, G., Stevanoska, M., Beekmann, K., & Sturla, S. J. (2023). Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling of the Postbiotic Supplement Urolithin A Predicts its Bioavailability Is Orders of Magnitude Lower than Concentrations that Induce Toxicity, but also Neuroprotective Effects. *Molecular nutrition & food research*, e2300009. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300009>
- [21] Brück, W. M., Díaz Escobar, V. D., Droz-Dit-Busset, L., Baudin, M., Nicolet, N., & Andlauer, W. (2022). Fermentative Liberation of Ellagic Acid from Walnut Press Cake Ellagitannins. *Foods* (Basel, Switzerland), 11(19), 3102. <https://doi.org/10.3390/foods11193102>
- [22] J. Harnett, G. Davey, A. Patrick, C. Caddick, L. Pearce, Lactic Acid Bacteria | *Streptococcus thermophilus*, John W. Fuquay (2011, 2nd edition), p. 143-148

- [23] Romulo, M., Surya, R (2021). Tempe: A traditional fermented food of Indonesia and its health benefits. International Journal of Gastronomy and Food Science, Volume 26, 100413. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100413>
- [24] *A. oryzae*, https://www.researchgate.net/figure/Light-microscopy-shows-the-influence-of-different-growth-media-on-the-microscopic_fig2_369259408 (visité le 30.03.2023)
- [25] *R. oligosporus*, https://www.researchgate.net/figure/Morphology-of-R-oligosporus-Photo-Inger-Ohlsson_fig5_36163381 (visité le 30.03.2023)
- [26] *S. thermophilus*, https://www.researchgate.net/figure/Colonies-of-S-thermophilus-on-5-horse-blood-agar-after-24-h-incubation-in-5-CO-2_fig2_281225505 (visité le 30.03.2023)
- [27] Measurlabs - HPLC-DAD Analysis, <https://measurlabs.com/methods/hplc-dad-analysis/> (visité le 30.03.2023)
- [28] Tan, E. C. D., & Lamers, P. (2021). Circular Bioeconomy Concepts — A Perspective. Frontiers in Sustainability, Volume 2, 701509. <https://doi.org/10.3389/frsus.2021.701509>
- [29] Confédération suisse - Objectif 12: Établir des modes de consommation et de production durables, <https://www.eda.admin.ch/agenda2030/fr/home/agenda-2030/die-17-ziele-fuer-eine-nachhaltige-entwicklung/ziel-12-fuer-nachhaltige-konsum-und-produktionsmuster-sorgen.html> (visité le 10.07.2023)
- [30] Nations unies - Objectif 12: Établir des modes de consommation et de production durables, <https://www.un.org/sustainabledevelopment/fr/sustainable-consumption-production/> (visité le 10.07.2023)
- [31] M. R. Adams, M. O. Moss, P. McClure, Food Microbiology, Royal Society of Chemistry (2016, 4th edition), p. 27-54
- [32] Rault, A., Bouix, M., & Béal, C. (2009). Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. Applied and environmental microbiology, 75(13), 4374–4381. <https://doi.org/10.1128/AEM.02725-08>
- [33] Mitchell, D.A., Doelle, H.W., & Greenfield, P.F. (2004). Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid-state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 28, 598-602. <https://doi.org/10.1007/BF00250419>
- [34] M. R. Adams, M. O. Moss, P. McClure, Food Microbiology, Royal Society of Chemistry (2016, 4th edition), p. 44
- [35] Radke-Mitchell, L. C., & Sandine, W. E. (1986). Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of dairy science, 69(10), 2558–2568. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(86\)80701-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(86)80701-9)
- [36] Ceci, C., Lacal, P., Tentori, L., De Martino, M., Miano, R., & Graziani, G. (2018). Experimental Evidence of the Antitumor, Antimetastatic and Antiangiogenic Activity of Ellagic Acid. Nutrients, 10(11), 1756. <https://doi.org/10.3390/nu10111756>

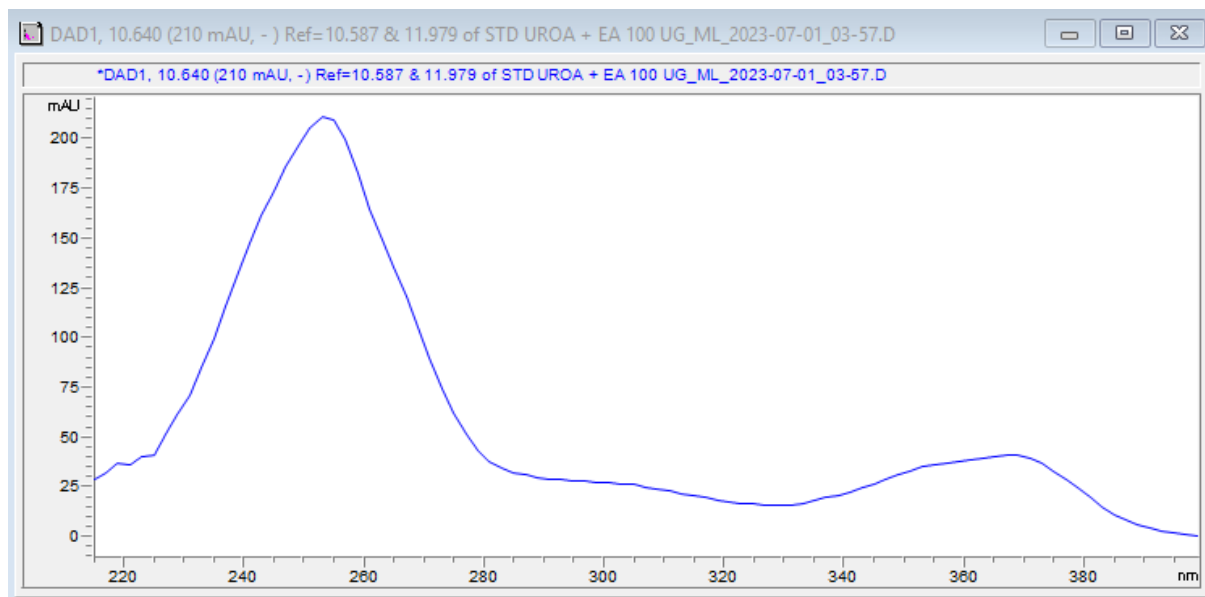
[37] USDA FoodData Central - Nuts, walnuts, English, halves, raw,
<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/2346394/nutrients> (visité le
24.07.2023)

9. Annexe

9.1. Annexe 1 : Courbes de calibration



9.2. Annexe 2 : Spectre UV de l'acide ellagique



9.3. Annexe 3 : Spectre UV de l'urolithine A

