

**Augmentation de l'activité antioxydante de
préparations/boissons végétales par
fermentation lactique**

Introduction

La fermentation lactique des fruits et des légumes est reconnue pour sa capacité à préserver et/ou augmenter les propriétés sanitaires, organoleptiques et nutritionnelles. C'est une voie de transformation permettant d'augmenter la durée de conservation des fruits et des légumes tout en apportant des propriétés fonctionnelles, grâce au métabolisme des bactéries lactiques.

A la Réunion, le secteur de transformation de fruits et de légumes produits localement est encore restreint. En effet, 95 % des fruits et légumes transformés consommés à la Réunion sont des produits d'importation. Les produits transformés localement sont des conserves (tomate transformée, achards, pâte de piments), des confitures et marmelades, des jus pasteurisés et récemment des produits de 4^{ème} gamme [134]. Les produits de 4^{ème} gamme sont des produits frais, lavés, épluchés et découpés prêts à l'emploi généralement conditionnés en sachets plastiques. Contrairement à d'autres régions du monde (Chine, Afrique, Inde), les boissons fermentées lactiques à base de fruits ne font pas partie de l'alimentation traditionnelle réunionnaise. On retrouve cependant quelques produits sur les marchés réunionnais, comme le kombucha, le kéfir et la limonade indienne (Hindu lemonade). Elargir le secteur de transformation des fruits et des légumes est un enjeu économique considérable pour la Réunion, d'une part pour diversifier le panel de produits commercialisés sur le marché et d'autre part de limiter les pertes de production, surtout pour les fruits saisonniers, comme la mangue.

D'autre part, la population réunionnaise est fortement touchée par le diabète et l'obésité, deux troubles métaboliques liés à une condition de stress oxydant. Les fruits et les légumes de par leur composition diversifiée en nutriments essentiels (minéraux, fibres alimentaires) et en antioxydant (vitamines, caroténoïdes, composés phénoliques) sont fortement recommandés pour lutter contre ces maladies métaboliques.

Les enjeux de cette étude sont doubles :

- Proposer aux consommateurs de nouveaux goûts dans la vision d'étendre le secteur de la transformation de fruits et/ou de légumes à la Réunion
- Concevoir des produits fermentés riches en fruits et ou légumes aux propriétés nutritionnelles améliorées, qui participeraient à la baisse de l'incidence du diabète et de l'obésité à la Réunion

La recherche de telles fonctions a animé ce projet de recherche et nous a motivé à concevoir un produit fermenté à base de fruits tropicaux aux propriétés nutritionnelles améliorées. La conception d'un produit alimentaire implique plusieurs étapes : conditionnement, étiquetage, durée de vie, rédaction des cahiers des charges et la conception de fiches techniques. Pour un produit fermenté, la première étape est la sélection de starter, cette étape est indispensable au conditionnement du produit. L'utilisation de starters est une voie plus sûre que la fermentation spontanée et apporte l'ensemble des propriétés finales désirées. Les starters autochtones, c'est-à-dire isolés de la même matrice que celle utilisée pour la fermentation, seraient préférables pour conduire une fermentation lactique, car les bactéries sont a priori mieux adaptées à la niche écologique.

Suite à la première partie de l'étude, nous avons à disposition plusieurs souches de bactéries lactiques isolées de papaye, de tomate ou d'achards. Nous avons choisi trois fruits tropicaux emblématiques de la Réunion pour la fermentation : l'ananas, la papaye et la mangue, qui diffèrent par leurs propriétés organoleptiques mais aussi par leur composition en nutriments et en molécules antioxydantes (**Tableaux 6 et 7**). L'ananas est un fruit riche en acides phénoliques (acide gallique, acide férulique, acide caféique, acide ρ -coumarique), en dérivés glycosidiques, en minéraux et en vitamine C [135]. La papaye est très riche en acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide ρ -coumarique, acide caféique), en caroténoïdes (lycopène, β -cryptoxanthine, β -carotène), en minéraux et en vitamine C [136]. La mangue est très riche en composés phénoliques (gallotanins et mangiférine), en vitamine C et en caroténoïdes [137]. Nous avons également inclus des infusions de thé vert et de thé noir dans cette étude. Le thé est une boisson riche en flavonoïdes (catéchine, épicatechine) et en tanins (théaflavine, théarubigine) et peut être impliquée dans la lutte contre les troubles métaboliques [138,139]. Le thé fermenté est déjà consommé sous forme de Kombucha, issu d'une fermentation qui implique des champignons et des bactéries acétiques. L'augmentation de l'activité antioxydante lors de la fermentation du thé a déjà été mise en évidence [89]. Cette étude a permis également de tester la capacité de nos isolats à moduler l'activité antioxydante de thés tout en apportant des qualités organoleptiques acceptables.

Nous avons donc recherché dans notre collection d'isolats autochtones, des bactéries lactiques capables de fermenter et d'augmenter les propriétés antioxydantes de préparations végétales à base d'ananas, de mangue, de papaye ou de thés, en fabriquant un produit qui plaise aux consommateurs du point de vue sensoriel.

Tableau 6 : Composition en nutriments de l'ananas, la papaye, la mangue et d'infusions de thé [140,141]

		Fruits			Boissons	
		Ananas	Papaye	Mangue	Thé vert	Thé noir
g/100g ou g/100mL	Carbohydrates	13,12	10,2	14,98	nd	2,5
g/100g	Fibres	1,4	1,7	1,6	nd	nd
Macro-nutriments	Vitamine C	47,8	60,9	36,4	nd	nd
mg/100g ou mg/100mL	Phosphore	8	10	14	nd	nd
	Potassium	109	182	168	nd	nd
	Magnésium	12	21	10	nd	nd
	Sodium	1	8	1	nd	nd
	Calcium	13	20	11	nd	nd
Micro-nutriments	Vitamine A	3	47	54	nd	nd
μg/100g	Fer	290	250	160	nd	nd
	Selenium	0,1	0,6	0,6	nd	nd
	Cuivre	110	40	110	nd	nd
	Manganèse	930	40	60	nd	nd
	Zinc	120	80	90	nd	nd
Caroténoïdes						
μg β-carotène équivalent/100g		52,6	1573,4	572,6	nd	nd
Composés phénoliques (Teneur)						
Fruit: mg acide gallique équivalent/100g		33	41,3	41,1	5,067	3,529
Boissons: g/L						
pH		3,5	4,36	3,6	5,39	4,97

Tableau 7 : Composés phénoliques et acides organiques présents dans l'ananas, la papaye, la mangue et les infusions de thé [137,141–144]

	Fruits			Boissons	
	Ananas	Papaye	Mangue	Thé vert	Thé noir
Composés phénoliques	Acide <i>p</i> -coumarique Acide férulique Acide caféique Acide hydroxyférulique-rhamnoside Acide sinapique-hexoside	Acide <i>p</i> -coumarique Acide férulique Acide caféique Rutine	Mangiférine Gallotanins Acide chlorogénique Acide gallique Acide vanillique Acide protocatéchuique Acide gallique-hexoside	(+)Catéchine (-)Epigallocatechine (-)Epicatechine (-)Epigallocatechine gallate	Théaflavine Théarubigine Epicatechine digallate
Acides organiques	Acide citrique Acide malique Acide oxalique Acide quinique Acide succinique	Acide oxalique Acide citrique Acide tartrique Acide malique Acide quinique Acide succinique Acide fumarique	Acide citrique Acide malique Acide tartrique Acide oxalique	Acide citrique Acide fluorique Acide quinique Acide oxalique Acide malique Acide aspartique Acide glutamique	Acide fluorique Acide glutamique Acide citrique Acide quinique Acide aspartique Acide oxalique Acide malique

Résultats

Les résultats de cette étude sont décrits dans un article publié dans le journal *Microorganisms*, intitulé **Lactic fermentation as an efficient tool to enhance the antioxidant activity of tropical fruit juices and teas**.

Fessard A., Kapoor A., Patche J., Assemat S., Hoarau M., Bourdon E., Bahorun T., Remize F., Lactic fermentation as an efficient tool to enhance the antioxidant activity of tropical fruit juices and teas. *Microorganisms* 2017, 5(2), 23; doi: 10.3390/microorganisms5020023

Article 2 : *Lactic fermentation as an efficient tool to enhance the antioxidant activity of tropical fruit juices and teas*



Article

Lactic Fermentation as an Efficient Tool to Enhance the Antioxidant Activity of Tropical Fruit Juices and Teas

Amandine Fessard ¹, Ashish Kapoor ¹, Jessica Patche ², Sophie Assemat ¹, Mathilde Hoarau ¹, Emmanuel Bourdon ², Theeshan Bahorun ³ and Fabienne Remize ^{1,*}

¹ UMR C-95 QualiSud, Université de La Réunion, CIRAD, Université Montpellier, Montpellier SupAgro, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, ESIROI, 2 rue Wetzell, 97490 Sainte Clotilde, France; amandine.fessard@univ-reunion.fr (A.F.); 113ft0556@nitrkl.ac.in (A.K.); sophie.assemat@cirad.fr (S.A.); mathilde.hoarau@cirad.fr (M.H.)

² Université de La Réunion, INSERM, UMR 1188, Diabète athérombose Thérapies Réunion Océan Indien (DéTROl), plateforme CYROI, 97490 SaintDenis de La Réunion, France; jessica.patche@univ-reunion.fr (J.P.); emmanuel.bourdon@univ-reunion.fr (E.B.)

³ ANDI Centre of Excellence for Biomedical and Biomaterials Research, MSIRI Building, University of Mauritius, 80837 Réduit, Mauritius; tbahorun@uom.ac.mu

* Correspondence: fabienne.remize@univ-reunion.fr; Tel.: +26-269-220-0785

Academic Editors: Régine Talon and Monique Zagorec

Received: 29 March 2017; Accepted: 3 May 2017; Published: 10 May 2017

Abstract: Tropical fruits like pineapple, papaya, mango, and beverages such as green or black teas, represent an underestimated source of antioxidants that could exert health-promoting properties. Most food processing technologies applied to fruit beverages or teas result in an impairment of inherent nutritional properties. Conversely, we hypothesise that lactic acid fermentation may constitute a promising route to maintain and even improve the nutritional qualities of processed fruits. Using specific growth media, lactic acid bacteria were selected from the fruit phyllosphere diversity and fruit juice, with the latter undergoing acidification kinetics analyses and characterised for exopolysaccharide production. Strains able to ferment tropical fruit juices or teas into pleasant beverages, within a short time, were of particular interest. Strains *Weissella cibaria* 64 and *Leuconostoc mesenteroides* 12b, able to increase antioxidant activity, were specifically studied as potential starters for lactic fermented pineapple juice.

Keywords: lactic acid fermentation; fruits; pineapple; tea; antioxidant

1. Introduction

One of the objectives of food research is to investigate new food products that promote health. During the last decade, consumers have increasingly believed that food contributes directly and effectively to health promotion. In this context it has been widely suggested that high intake of fruits and vegetables, nutrient-rich plants and antioxidant-rich beverages like tea and coffee may reduce the risk of degenerative and oxidative-stress related diseases [1,2]. Fresh fruit and vegetables are, however, rapidly perishable; thus the interest for processing which guarantees their safety for consumption. Nevertheless, food processing can trigger undesirable chemical and physical changes [3]. For instance, it has been reported that vitamins and natural antioxidants are rapidly degraded during thermal processing techniques like blanching, cooking, pasteurisation or sterilisation [4], leading to a decrease in antioxidant activity. Significant loss in the vitamin C and flavonoid contents was observed after blanching, air drying, water immersion or boiling of green leafy vegetables, celery and onion

bulbs [5,6]. The food industry has thus increasingly considered new alternatives in order to preserve the nutritional and antioxidant properties of foods during food processing.

Lactic acid fermentation is one of the oldest ways of food processing and preservation, liable to keep or increase the safety, nutritional, sensory and shelf-life properties of foods. Lactic acid bacteria (LAB) are a group of gram-positive bacteria, producing lactic acid as the main product of carbohydrate fermentation. During fermentation, LAB produce substances such as bacteriocins, exo-polysaccharides (EPS), aroma compounds, enzymes, B vitamins (mainly folate, riboflavin, cobalamin) or low-calorie polyols (mannitol, sorbitol), which enhance the safety, nutritional quality, sensory properties or antioxidant activities of food [7]. In this vein, *Kimchi*, a traditional fermented mix of vegetables and *Kombucha*, a fermented tea beverage, were associated with antimutagenic, antioxidative, antiaging, cholesterol-lowering activities and prevention against cancer and cardiovascular diseases [8,9]. Several studies have also investigated the ability of lactic acid fermentation to improve the antioxidant properties of fruits and vegetables [10–13]. An improved preservation of ascorbic acid, glutathione, phenolic compounds and antioxidant activity was observed following lactic acid fermentation of smoothies and tomato juice with *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* or *Weissella cibaria* [10,14]. Lactic acid fermentation started with *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *P. pentosaceus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium breve* and *B. thermophilum* increases Vitamin C concentration, phenolic content and antioxidant activity of carrots, French beans, marrows, black beans, pomegranate juice, soy milk and cowpeas [11,15–18]. Enhancement of antioxidant propensity during fermentation is mainly ascribed to the release of bioactive compounds by LAB [12]. It was reported that LAB were able to increase the antioxidant activity of tea extracts as a result of the modification of tea phenolics [19]. Lactic acid fermentation is thus a promising alternative to expand the range of utilisation of processed foods, while concurrently maintaining and/or boosting nutritional benefits.

In this study, we aimed to develop an attractive fermented beverage through the action of autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit and vegetables grown in Réunion Island. Tropical fruits like pineapple, papaya and mango, together with antioxidant-rich beverages like green and black teas, were chosen as substrates for lactic acid fermentation. The selected raw materials characterised by varying phytochemical composition, more particularly phenolic compounds, were subjected to lactic acid fermentation with the view to identifying pairs of lactic acid bacteria strains and raw material that result in fermented beverages which are technologically feasible, characterised by a pleasant sensory and endowed with increased antioxidant activity.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strain and Culture Media

A total of 28 lactic acid bacteria, isolated from tomatoes (*Lycopersicon esculantum*), papaya (*Carica papaya*) and sliced cabbage (*Brassica oleacea* var. *capitata*) grown on Réunion Island, were studied to produce a fermented beverage [20]. Isolates were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. These LAB strains were identified by 16S-rRNA, *pheS* and *recA* gene sequencing. *Lc. citreum* DSM20188, *W. confusa* DSM20196, *W. cibaria* DSM14295, *Lc. pseudomesenteroides* DSM20193 and DSM5625, *Lb. plantarum* DSM2601 were used as reference strains. LAB were grown on MRS (Man Rogosa Sharpe) agar at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 72 h. For strain reactivation, one or two colonies or a loop of $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stock were suspended in 9 mL of MRS broth and incubated at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. Thereafter, cultures were homogenised by vortex and 0.2 mL of this suspension was used to inoculate 9 mL of MRS broth. Cell population was estimated by measuring absorbance at 660 nm wavelength.

DNA extraction was performed by using Instagen protocol (Instagen Matrix, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). *Leuconostoc* and *Weissella* spp. were identified by 16S-rRNA and *pheS* gene sequencing while *Lactobacillus* spp. was identified by *recA* gene sequencing. 16S rRNA gene sequencing was performed using FD1m and RD1m primers as previously described [20]. The amplification of *pheS* gene was performed according to Naser et al., (2005) and Rubio et al.,

(2014) [21,22] with some modifications. Primers pheS-21-F (5'-CAYCCNGCHCGYGAYATGC-3') and pheS-23-R (5'-GGRTGRACCATVCCNGCHCC-3') were used. The reaction mixture contained buffer 1×, 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP, 0.5 μmol·L⁻¹ each primer, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂ and 0.04 U·μL⁻¹ *Taq* polymerase (Thermo Fisher Scientific, Villebon, France). The PCR reaction was performed in a 45 μL volume with 10 μL of DNA solution. The thermal program consisted of 5 min at 95 °C; 35 cycles of 1 min at 95 °C, 30 s at 56 °C, 1 min 15 s at 72 °C; 7 min at 72 °C. In order to differentiate *Lb. plantarum/paraplantarum/pentosus*, *recA* gene sequencing was performed according to Torriani et al., (2001) [23]. Multiplex PCR was performed using primers PlanF (5'-CCGTTTATGCGGAACACCTA-3'), ParaF (5'-GTCACAGGCATTACGAAAAC-3'), PentF (5'-CAGTGGCGCGTTGATATC) and PREV (5'-TCGGGATTACCAAACATAAC-3'). The reaction mixture contained buffer 1×, 1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 0.25 μmol·L⁻¹ ParaF, PentF and PREV, 0.12 μmol·L⁻¹ PlanF, 12 μmol·L⁻¹ dNTP and 0.025 U·μL⁻¹ *Taq* polymerase. The thermal program consisted of 3 min at 94 °C; 30 cycles of 30 s at 94 °C, 10 s at 56 °C, 30 s at 72 °C; 5 min at 72 °C. The products of positive PCRs (a 318 bp amplicon for *Lb. plantarum* spp. or a 107 pb amplicon for *Lb. paraplantarum* spp.) were purified with a GelElute Extraction kit (5Prime, Duscher SA, Brumath, France).

PCR products were sequenced by the Sanger method with FD1m, pheS-21F, PlanF and ParaF primers as previously described [20].

2.2. EPS Production

EPS production was determined using MRS sucrose (40 g·L⁻¹) agar as previously described [20].

2.3. Kinetics of Acidification

Kinetics of acidification was performed as previously described using MRS broth as culture media [20]. Each culture was performed in triplicate. Parameters of acidification lag time, pH_{min}, V_M, t_M, pH_M were determined from dpH/dt = f(t) curves as previously described. Lag time (λ) was the time corresponding to an initial pH variation of less than 0.1. Minimal pH (pH_{min}) was the final constant pH value. Maximum acidification rate (V_M), time to reach the maximum acidification rate without the lag phase (t_M), and pH at maximal acidification rate (pH_M) were determined from dpH/dt = f(t) curves.

2.4. Growth in Apple Juice

Growth in apple juice was performed in sterile 96-well microplates. LAB were grown for 48 h at 30 °C in 9 mL MRS broth. Bacterial suspension was centrifuged at 8000×g for 5 min. The supernatant was removed and the cell pellet was washed twice with sterile distilled water and re-suspended in 9 mL of water. Then, 20 μL of this bacterial suspension were inoculated in 180 μL of clarified apple juice (Carrefour, Sainte Clotilde, France). This juice contained 19.4 g·L⁻¹ glucose, 63.1 g·L⁻¹ fructose and 9.7 g·L⁻¹ sucrose. The control medium corresponds to apple juice plus 20 μL of distilled water. Microplates were incubated at 30 °C for 96 h. OD at 660 nm was measured every 2 h (Infinite M200 Pro, Tecan, Lyon, France). Results were expressed as log (OD₉₆/OD₀). Apple juice culture was performed in triplicate for each strain.

2.5. Preparation of Substrate

Commercial pineapple juice was used directly for all experiments. Pineapple juice contained 41.1 g·L⁻¹ glucose, 41.8 g·L⁻¹ fructose and 42.1 g·L⁻¹ sucrose. Papayas or mangoes were washed and peeled. The seeds or stones were removed and mixed in order to obtain a purée. The latter was pasteurised for 5 min at 75 °C using a water bath with temperature monitoring and cooled to room temperature before fermentation. For the tea infusion, sugar cane syrup was added to distilled water in order to reach 10% sucrose concentration. One tea bag was infused for 5 min in 250 mL of boiling sweetened water and the infusion was cooled at room temperature before fermentation.

2.6. Fermentation

LAB strains were reactivated for 48 h at 30 °C in 9 mL of MRS broth. Then, 48 h reactivated cultures were used to inoculate 50 mL pre-culture of MRS broth with an initial optical density at 660 nm of 0.05. Pre-cultures were incubated at 30 °C for 48 h. After centrifugation at 8000× *g* for 5 min, the cell pellet was washed twice with sterile distilled water and re-suspended in 20 mL of sterile water in order to have a concentrated cell culture. Optical density at 660 nm was measured and volume of inoculation was calculated in order to have an initial OD of 0.05. With the appropriate volume, 40 mL of pineapple juice or green tea or black tea or 40 g of papaya or mango purée were inoculated with the concentrated culture. Substrates were incubated at 30 °C without agitation. Thereafter, fermented products were incubated at −20 °C for 15 min to stop the fermentation. Fermentation was performed in triplicate for each strain.

2.7. Qualitative Sensory Analysis and Determination of Fermentation Optimal Time

In order to determine optimal time for fermentation and select a reduced number of potential starters, pineapple juice was subjected to fermentation at 30 °C for two days or four days with each of the 35 strains and placed at 4 °C for 24 h before sensory analysis. A qualitative sensory analysis was carried out by five non-trained people. Substrates were scored from “excellent” to “unsatisfactory” for colour, aroma, appearance and uniformity. Strains were scored as (++) if global sensory analysis was excellent, (+) for a good global sensory analysis and (−) for an unsatisfactory global sensory analysis.

2.8. Shelf-Life Determination

After 48 h of fermentation, control juice and started pineapple juice with *W. cibaria* 64 and *Lc. pseudomesenteroides* 12b were placed at 4 °C for 16 days. After inoculation, following fermentation or periodically over storage, 1 mL of non-started and started juices were suspended into 9 mL sterile peptone water solution and homogenised. Lactic acid bacteria population was determined on MRS agar at 30 °C for 48–72 h. Yeast counts were determined on glucose chloramphenicol agar at 25 °C for 5 days. Total mesophilic bacteria counts were determined on nutritive agar at 30 °C for 72 h. Enterobacteria population was calculated from colonies observation on VRBG agar after 48 h at 37 °C. The pH, sugar concentration and antioxidant activity were also monitored during the same period.

2.9. Sugar Content Determination

The Miller method was used to determine reducing sugar concentration [24], with glucose as standard. Sugar concentration (sucrose, glucose and fructose) were also analysed by HPLC (UltiMate 3000 system 6-1, Dionex, Thermo Fisher Scientific, Villebon, France) with a refractometry detector. For the HPLC column, milliQ water was used as the mobile phase and injection volume was 20 µL. The analysis was performed isocratically at 0.6 mL·min^{−1} flow rate at 80 °C with a Ca USP L19 (250 × 4.0 mm) column (Hi-Plex, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Calibration curves were prepared from sucrose, glucose and fructose standards and were used for the quantification. The concentration range for each standard was 0.5 g·L^{−1} to 0.03125 g·L^{−1}. The correlation coefficient *r*² for the calibration curves were 0.9987, 0.9993 and 0.9860 for sucrose, glucose and fructose, respectively. Pineapple and apple juice were 100-fold diluted for HPLC analysis.

2.10. Sensory Analysis

Sensory profile was carried out by a panel of nine trained members. After fermentation, non-started pineapple juice and fermented juice started with the strains *W. cibaria* 64 or *Lc. pseudomesenteroides* 12b were refrigerated, encoded with three-digit random numbers and served (20 mL). Products were served anonymously with randomisation, and the analysis was performed in triplicate. Control and fermented juices were scored from 0 to 10 for colour, odour, texture, flavour, taste and general quality. The sensory attributes used for this study were: yellow, green, and orange

for the colour; pineapple, soft, acid, fermented, fruity, yoghurt and sweet for the odour; smoothness, fluidity, watery and syrupy for texture; acid, sweet, bitter and salt for the flavour; fresh, pineapple, fruity, yoghurt, spicy, astringent, hot, fermented, sweet-sour, and sparkling for the taste.

The fermented juice started with strains *W. cibaria* 64 or *Lc. pseudomesenteroides* 12b were also evaluated by 37 untrained panellists (17–50 years old). The panel was composed of 59.5% women and 40.5% men. Most of the panellists were under 20 years old or 20–30 years old. Most of the panellists are used to drinking pineapple juice at least once per month or not at all (51% and 32%, respectively). The two fermented pineapple juices were placed at 4 °C for two days before hedonic analysis. The samples were identified with random three-digit codes, distributed in portions of 20 mL into transparent cups and served in a randomised order. The panellists were asked to evaluate the overall acceptability, colour, odour, taste, pineapple taste and texture. Scales from 1 (dislike extremely) to 10 (like extremely) were used for overall acceptability, odour and taste. Scales from –2 (very repulsive, too discreet, or too fluid) to 2 (very attractive, too intense or too viscous) were used to evaluate the colour, pineapple taste and texture, respectively.

2.11. Determination of Total Phenolic Content (TPC)

Determination of TPC was performed using the Folin–Ciocalteu method with gallic acid as standard as previously described [20]. Pineapple juice and tea were centrifuged at 8000× g for 5 min at 4 °C. The supernatants were collected and stored at –20 °C until use. For papaya and mango purée, phenolic compounds were extracted according to Septembre-Malaterre et al., (2016) [25] with some modifications. Purée (6 g) was mixed to 30 mL of distilled water and incubated at 4 °C for 90 min. Then after, samples were centrifuged at 4000× g for 20 min at 4 °C. Results are expressed in grams of gallic acid equivalent (GAE) per litre for pineapple juice, green and black tea. For mango and papaya purée, results were expressed in milligrams of GAE per 100 g of puree.

2.12. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Free-Radical Scavenging Activity (RSA)

DPPH radical scavenging activity was performed as previously described [20] with some modifications. Gallic acid and water were used as positive and negative control, respectively. All samples were 10-fold diluted for this assay. Results were expressed in % DPPH according to the formula:

$$\% \text{ of DPPH reduced} = \frac{(\text{OD Control} - \text{OD sample})}{\text{OD Control}} \times 100$$

2.13. Red Blood Cell Haemolysis Assay

Red blood cell haemolysis assay was performed as previously described [20]. Blood samples were obtained from healthy volunteers. Pineapple juices and papaya pulps were 100-fold and 50-fold diluted, respectively. Cell lysis was followed by the decrease of absorbance at 450 nm at 10-min intervals for 16 h at 37 °C (Infinite M200 Pro, Tecan, Lyon, France). Results are expressed as half-time of haemolysis (HT-50), determined from GraphPad Prism 5.01 with a Boltzman sigmoidal nonlinear regression as previously described.

2.14. Low Density Lipoprotein (LDL) Oxidation

Blood samples were obtained from normolipidemic healthy volunteers. Red blood cells and plasma were separated by centrifugation at 2000× g for 5 min. For each preparation, at least 30 mL of pooled plasma was used as starting material. Plasma density was adjusted to 1.22 g·mL^{–1} by adding solid KBr. Three millilitres of KBr-loaded plasma was layered in the bottom of a centrifuge tube (Beckman centrifuge, Beckman Coulter, Villepinte, France). The loaded plasma fraction was gently overlaid with five millilitres of a KBr solution (density 1.063 g·mL^{–1}). Finally, the KBr solution was overlaid with one millilitre of milliQ water. LDLs isolation was performed by ultracentrifugation (24 h, 29,000 rpm, 4 °C) in a Beckman Coulter centrifuge equipped with a SW 41 Ti rotor. This step resulted

in five layers from top to bottom: Residual water solution; Low-density lipoprotein fraction (density lower than $1.063 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$); Residual KBr solution; High-density lipoprotein fraction; Residual plasma solution. LDL was gently collected and dialyzed against PBS $1\times$ (pH 7.4). LDLs were assayed for protein concentration by the Bradford method using Bovine Serum Albumin (BSA) as the standard. LDLs were sterile filtered and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark for no longer than 15 days. LDL oxidation was determined by measuring conjugated diene formation at 234 nm, as previously described [20] with some modifications. Final LDL protein concentration in each well was $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Pineapple juices and papaya pulps were 500-fold and 50-fold diluted, respectively. Results are expressed in half-time oxidation (V-50) in min, obtained from GraphPad Prism 5.01 with a Blotzman sigmoidal nonlinear regression, as previously described.

2.15. Statistics

The software XLSTAT (Addinsoft, Paris, France) was used for all statistical analyses. Significant effects of factors were detected with a Fisher test (p -value < 0.0001). Significant differences versus a control or by pairs were tested with Dunnett's and Ryan, Einot, Gabriel, Welch q (REGWQ) tests respectively.

3. Results and Discussion

3.1. EPS Formation and Acidification Kinetics

In this study, a set of strains originating from tropically grown plant phyllosphere and belonging to several species were used. The strains were classified under the genera *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus* and *Fructobacillus*. Among those, 13 species were represented. Strains were characterised by determination of EPS production ability and acidification kinetic parameters.

EPS formation was observed for all *Leuconostoc* spp., *W. confusa* and *W. cibaria* strains, with liquid or creamy colony phenotypes depending on the strain (Table 1). These three groups were previously reported as EPS producers [26]. Other *Weissella* species and other genera did not exhibit EPS production under these conditions.

Table 1. Identification, origin and exo-polysaccharide (EPS) phenotype of LAB strains used in the study.

Strain	Species	Origin	Production EPS	Aspect
1	<i>Lc. mesenteroides</i>	Papaya	+	Liquid
2	<i>Lc. citreum</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
5	<i>Lc. mesenteroides</i>	Sliced cabbage	+	Liquid
17	<i>W. confusa</i>	Sliced cabbage	ND *	ND *
21	<i>W. cibaria</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
24	<i>Lc. lactis</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
28	<i>Lc. mesenteroides</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
30	<i>W. cibaria</i>	Sliced cabbage	+	Liquid
37	<i>W. paramesenteroides</i>	Papaya	-	-
38	<i>W. confusa</i>	Papaya	+	Creamy
39	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Papaya	+	Liquid
56	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
58	<i>W. soli</i>	Sliced cabbage	-	-
59	<i>W. confusa</i>	Sliced cabbage	+	Liquid
60	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
64	<i>W. cibaria</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
73	<i>Lb. paraplantarum</i>	Sliced cabbage	-	-
75	<i>Lb. plantarum</i>	Sliced cabbage	-	-
77	<i>Fb. tropaeoli</i>	Papaya	-	-
78	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Papaya	+	Liquid
79	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Papaya	+	Liquid
89	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Sliced cabbage	+	Creamy
10b	<i>W. cibaria</i>	Tomato	+	Creamy
12b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Tomato	+	Liquid
17a	<i>Lb. plantarum</i>	Tomato	-	-

Table 1. Cont.

Strain	Species	Origin	Production EPS	Aspect
27b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Papaya	+	Liquid
6a	<i>Lc. mesenteroides</i>	Papaya	+	Creamy
9a	<i>Lc. citreum</i>	Tomato	+	Creamy
DSM14295	<i>W. cibaria</i>	Kimchi	+	Creamy
DSM20188	<i>Lc. citreum</i>	ND *	+	Creamy
DSM20193	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Sugar cane juice	+	Liquid
DSM20196	<i>W. confusa</i>	Cane sugar	+	Creamy
DSM2601	<i>Lb. plantarum</i>	Pickled cabbage	-	-
DSM5625	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	Commercial starter	+	Creamy

* ND, not determined.

Acidification kinetic parameters were obtained from the curves of pH determination over time in MRS (Table 2). Latency time varied greatly, from 2.5 h for *W. confusa* 17 to 26.1 h for *Lc. pseudomesenteroides* 89. Except for those extreme behaviours, half the latency times were in the range 9–14.7 h. Another parameter that varied greatly was the maximal acidification rate, V_M . Extreme values were 84 mUpH·h⁻¹ for *W. paramesenteroides* 37 and 377 mUpH·h⁻¹ for *W. confusa* DSM20196. Half of the strains exhibited V_M in the range 155 to 220 mUpH·h⁻¹. Lastly, T_M , which is the time required for V_M after latency, exhibited a variation coefficient of 13%. This time was comprised between 2.8 h and 8.8 h, respectively, for *W. confusa* DSM20196 and *Lc. pseudomesenteroides* 12b.

Table 2. Parameters of acidification (mean ± SD).

Strain	Species	Latency (h)	pH min	Vm (mUpH·h ⁻¹)	Tm (h)	pHm
1	<i>Lc. mesenteroides</i>	25.3 ± 7.3	3.9 ± 0.4	205 ± 91	4.5 ± 0.2	5 ± 0.1
2	<i>Lc. citreum</i>	12.0 ± 0.8	4.3 ± 0.2	154 ± 2	4.1 ± 0.5	5.1 ± 0.1
5	<i>Lc. mesenteroides</i>	12.3 ± 5.1	3.7 ± 0.2	218 ± 47	5.4 ± 1.2	4.9 ± 0.2
17	<i>W. confusa</i>	2.5 ± 0.0	4.1 ± 0	211 ± 33	3.6 ± 0.3	5.1 ± 0.2
21	<i>W. cibaria</i>	9.0 ± 3.6	4 ± 0.1	180 ± 38	4.1 ± 0.9	5 ± 0.1
24	<i>Lc. lactis</i>	6.6 ± 3.3	4.1 ± 0.1	170 ± 36	3.3 ± 0.7	5.3 ± 0.2
28	<i>Lc. mesenteroides</i>	17.3 ± 5.3	3.9 ± 0.2	212 ± 68	4.7 ± 0.5	5 ± 0.2
30	<i>W. cibaria</i>	8.4 ± 0.2	4.1 ± 0.1	180 ± 72	4.3 ± 0.1	5 ± 0.2
37	<i>W. paramesenteroides</i>	12.0 ± 3.7	3.9 ± 0.1	84 ± 9	4.8 ± 0.3	5 ± 0
38	<i>W. confusa</i>	16.2 ± 2.0	4.1 ± 0.1	144 ± 25	4.3 ± 0.9	5 ± 0.1
39	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	7.5 ± 3.1	4 ± 0.2	196 ± 63	4.9 ± 1.1	5 ± 0.1
56	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	12.2 ± 4.6	4 ± 0.2	258 ± 44	5 ± 0	5 ± 0
58	<i>W. soli</i>	18.2 ± 4.1	4.3 ± 0.2	128 ± 20	8.6 ± 0.4	5 ± 0.5
59	<i>W. confusa</i>	16.1 ± 2.6	4.3 ± 0.1	126 ± 51	4.8 ± 0.5	5.2 ± 0.1
60	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	14.1 ± 0.6	4 ± 0.1	257 ± 55	3.2 ± 0.6	5 ± 0
64	<i>W. cibaria</i>	10.8 ± 2.0	4 ± 0.2	192 ± 11	3.3 ± 0.2	4.9 ± 0.2
73	<i>Lb. paraplantarum</i>	11.2 ± 1.4	3.8 ± 0.1	234 ± 5	5 ± 0.4	5 ± 0
75	<i>Lb. plantarum</i>	8.8 ± 3.4	3.7 ± 0.1	225 ± 83	4.2 ± 0.5	5.1 ± 0.1
77	<i>Fb. tropaeoli</i>	13.3 ± 6.9	3.7 ± 0.1	263 ± 28	4.9 ± 0.3	5 ± 0
78	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	14.7 ± 0.6	4 ± 0.2	206 ± 48	4.3 ± 0.4	4.9 ± 0.1
79	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	17.8 ± 7.1	4.5 ± 0.4	133 ± 12	4.6 ± 0.6	5.1 ± 0.2
89	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	26.1 ± 7.1	3.8 ± 0.3	165 ± 23	6.1 ± 1.5	4.8 ± 0.1
10b	<i>W. cibaria</i>	9 ± ND *	4.1 ± ND	100 ± ND	6.3 ± ND	5 ± ND
12b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	8.6 ± 2.7	4 ± 0.3	138 ± 19	8.8 ± 2.8	5 ± 0.2
17a	<i>Lb. plantarum</i>	7.3 ± 4.7	3.6 ± 0.2	237 ± 35	4.6 ± 1.1	5 ± 0.3
27b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	10 ± 3.9	3.9 ± 0.2	149 ± 13	8.1 ± 1.5	4.9 ± 0.3
6a	<i>Lc. mesenteroides</i>	10.6 ± 5.2	4 ± 0	184 ± 15	4.1 ± 0.8	5.1 ± 0.2
9a	<i>Lc. citreum</i>	16.5 ± 0.7	3.8 ± 0.1	243 ± 40	4.1 ± 0.2	5 ± 0
DSM14295	<i>W. cibaria</i>	10.5 ± 1.4	4 ± 0.1	200 ± 6	3.7 ± 0.6	5.1 ± 0.1
DSM20188	<i>Lc. citreum</i>	10 ± 1.4	4 ± 0.1	184 ± 45	8.1 ± 1.6	5.2 ± 0.1
DSM20193	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	13.1 ± 3	4.1 ± 0.6	221 ± 73	4.1 ± 0.5	5.1 ± 0.1
DSM20196	<i>W. confusa</i>	14.7 ± 3	4 ± 0.1	377 ± 31	2.8 ± 0.5	5 ± 0.1
DSM2601	<i>Lb. plantarum</i>	7.2 ± 1.6	3.6 ± 0	193 ± 52	5.6 ± 0.6	4.8 ± 0
DSM5625	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	10.5 ± 1.9	3.9 ± 0.1	159 ± 36	5.9 ± 0	4.9 ± 0.1

* ND, not determined.

The minimal pH range was narrow, with extreme values of 3.6 and 4.5. The lowest minimal pH was observed for two *Lb. plantarum* strains, 17a and DSM2601, followed by *Lb. plantarum* 75,

Lc. mesenteroides 5 and *Fb. tropaeoli* 77. The highest final acidification pH was observed for *Lc. pseudomesenteroides* 79, followed by *Lc. citreum* 2, *W. confusa* 59 and *W. soli* 58. Dispersion of minimal pH was low with a variation coefficient of 4%. A very low dispersion was also observed for values of pH_M , which is the pH corresponding to the maximal rate of acidification. More than half of strains exhibited a pH_M between 5.0 and 5.1.

A remarkable diversity of behaviour was observed within the group of strains. Acidification kinetic parameters were not related to species or strain origin. This diversity is an opportunity regarding possible application of these strains as starters as it could lead to diverse fermentation profiles. Moreover, a starter preparation requires us to define conditions and duration to obtain strains with a good fitness.

3.2. Growth in Apple Juice

Apple juice was chosen as it was shown to be a substrate which supported growth of *Lactobacillus* spp. strains [27]. Moreover, this substrate resulted in large differences of growth performances within the genus. The growth yield of the 34 strains was determined from turbidity change in apple juice over the 96-hour culture. The growth yield was significantly different from the non-inoculated control, for 19 strains, as assayed by Dunnett's unilateral test (p -value being comprised between 0.05 and <0.0001). Pairwise comparison showed that three strains, *Lc. pseudomesenteroides* 89, *Lc. mesenteroides* 1 and *Lc. mesenteroides* 28 exhibited the highest growth yield. Other strains with significant growth ranked from the highest to the lowest growth yield were *Lc. pseudomesenteroides* 39, *Lc. lactis* 24, *Lc. mesenteroides* 6a, *Lc. pseudomesenteroides* 27b, *W. confusa* 38, *W. confusa* 59, *Lc. pseudomesenteroides* 60, *Lb. plantarum* 17a, *W. cibaria* 21, *Lc. pseudomesenteroides* 56, *Lc. citreum* 2, *Fb. tropaeoli* 77 and *W. paramesenteroides* 37, in addition to three reference strains, *Lc. citreum* DSM20188, *W. confusa* DSM10196 and *W. cibaria* DSM14295 (Figure 1). All the *W. confusa* and the *Lc. mesenteroides* strains were within the 19-strain group, whereas no *Lactobacillus* spp. strain was present in this group. The other 16 strains exhibited a much lower growth yield than the 19-strain group. They were grouped in a narrow range of growth yield close to the first quartile value (Figure 1).

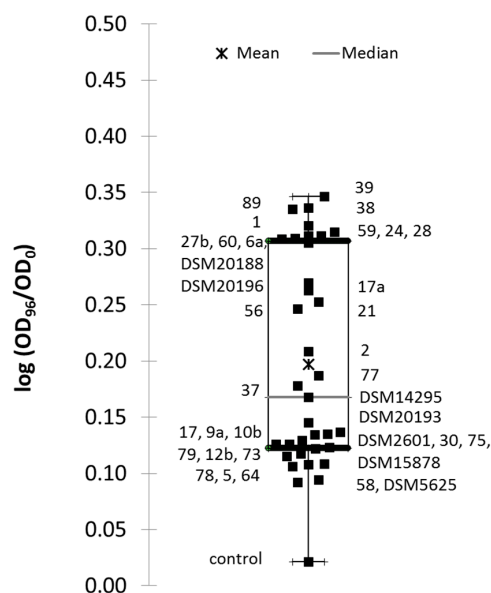


Figure 1. Boxplot of means of growth yield expressed as $\log(OD_{96h}/OD_{0h})$ for strains cultivated into apple juice. Each black square corresponds to the mean growth yield for the indicated strain. Lowest and upper bars correspond to extreme values of yield. The empty box corresponds to second and third quartiles, star to the general mean and line in the box to the median value.

3.3. Starter Selection Based on Hedonic Evaluation

In order to make a selection of starters, each strain was used to start pineapple juice fermentation and hedonic evaluations of fermented juice were performed after two days and four days of fermentation (Table 3). From the results obtained, strains 2, 73, 75, 77, 78, 79, 89, 9a, DSM2601, DSM5625 and DSM20188, were not taken on for further assays. From retained strains, fermentation assays were conducted over two days at 30 °C, then subsequently cooled down before storage. Potential starters were screened for their capacity to increase antioxidant activity of substrate over-fermentation. Fermented products that exhibited off flavours were not included in the antioxidant assay determination.

Table 3. Sensory attributes and optimal time fermentation. (–) not acceptable, (+) acceptable, (++) pleasant odour.

Sensory Properties of Pineapple Juice After Fermentation			
Strain	Species	2 Days	4 Days
5	<i>Lc. mesenteroides</i>	+	+
17	<i>W. confusa</i>	++	++
21	<i>W. cibaria</i>	+	+
37	<i>W. paramesenteroides</i>	++	++
56	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	+	+
58	<i>W. soli</i>	+	++
59	<i>W. confusa</i>	++	++
12b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	+	+
1	<i>Lc. mesenteroides</i>	+	-
24	<i>Lc. lactis</i>	++	-
28	<i>Lc. mesenteroides</i>	+	-
30	<i>W. cibaria</i>	-	++
38	<i>W. confusa</i>	-	++
39	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	+
60	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	+
10b	<i>W. cibaria</i>	+	-
17a	<i>Lb. plantarum</i>	-	+
27b	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	++
6a	<i>Lc. mesenteroides</i>	++	-
64	<i>W. cibaria</i>	+	+
DSM14295	<i>W. cibaria</i>	-	+
DSM20193	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	++
DSM20196	<i>W. confusa</i>	+	+
DSM2601	<i>Lb. plantarum</i>	-	-
2	<i>Lc. citreum</i>	-	-
73	<i>Lb. paraplantarum</i>	-	-
75	<i>Lb. plantarum</i>	-	-
77	<i>Fb. tropaeoli</i>	-	-
78	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	-
79	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	-
89	<i>Lc. pseudomesenteroides</i>	-	-
9a	<i>Lc. citreum</i>	-	-
DSM20188	<i>Lc. citreum</i>	-	-

3.4. Lactic Fermentation of Black or Green Tea Infusion

Control green and black tea infusions differed by their TPC and antioxidant activity (Figure 2A,B). TPC were 0.63 ± 0.03 and 0.48 ± 0.04 g GAE·L⁻¹ and RSA were $85.9\% \pm 1.7\%$ and $80.7\% \pm 1.7\%$, respectively, for green and for black tea. This is consistent with tea characteristics, as green tea has been reported to have a higher antioxidant potency than black tea [28–31]. TPC may vary by time of infusion, teabag and type of tea [32]. Green and black teas differ in their composition but also in their

manufacturing process. After harvest, leaves for green tea are rapidly processed in order to inactivate enzymes and avoid polyphenol oxidation. On the contrary, black tea leaves are first withered in order to concentrate polyphenols. The withered leaves are fermented and in that process the polyphenols are oxidised [33]. As a consequence, green tea is richer in catechins, the most important ones being (–) epigallocatechin gallate, (–) epicatechin gallate, (+) catechin, (–) epicatechin and (–) epigallocatechin, whereas black tea contains high levels of theaflavins and thearubigins, the resulting oxidised and polymerised forms of catechins [19,34]. For green tea infusions, neither TPC nor RSA was modified by the fermentation process (Figure 2A). A mean total polyphenol content of 0.63 g GAE·L⁻¹ was observed, with a variation coefficient of 20%. RSA ranged between 75.6 and 90.7% whatever the nature of sample, fermented or not. For black tea infusions, RSA was not affected by fermentation with any of the strains and ranged between 63.3 and 90.4% (Figure 2B). Concerning TPC, a significant effect was observed for some fermented product. However, the change corresponded to a decrease of the content. The average value of total polyphenols was 0.45 g GAE·L⁻¹ (Figure 2B). *Lactobacillus* spp. have been shown to increase the antioxidant activity of tea extracts by catabolism of tea phenolics [19]. However, to the best of our knowledge, no study has reported on the lactic acid fermentation of tea infusions by *Weissella* or *Leuconostoc* spp.

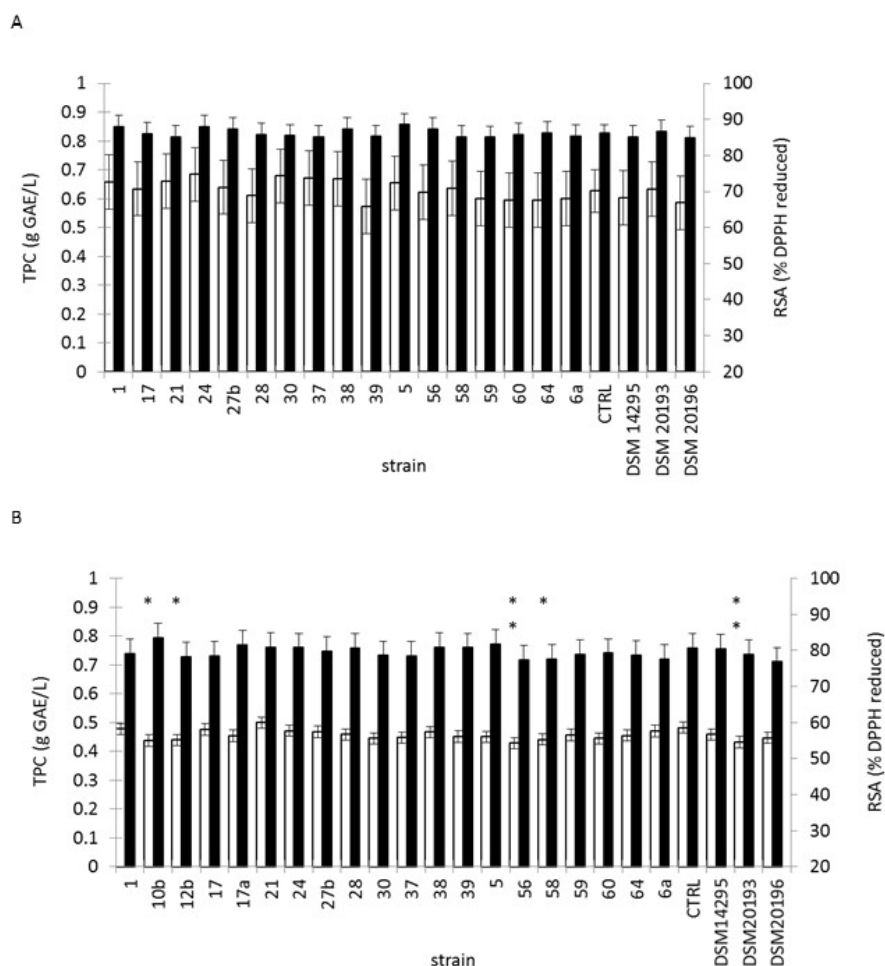


Figure 2. Total phenolic content and radical scavenging activity in tea (a) green tea and (b) black tea. White bar: Total polyphenol content (TPC) of material fermented for 48 h with the indicated starter strain. Black bar: Radical scavenging activity (RSA) of material fermented for 48 h with the indicated starter strain. Control, labelled CTRL, corresponds to incubated juice. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ from Dunnett's test versus control.

3.5. Fermentation of Tropical Fruit Preparations

Mango pulp, papaya pulp and pineapple juice were used as substrates for fermentation, started with previously selected starters.

Mango pulp fermentation resulted in the absence of changes in RSA (Figure 3A). This activity was comprised between 45.3 and 80.3%, with a mean at 69.1%. On the opposite, TPC was decreased during fermentation of several mango pulp samples. Nevertheless, the phenolic content determined for mango pulp was higher than those reported in the literature (41.1 mg GAE/100 g and 78.3 mg GAE/100 g, by Chen et al., 2014 [35] and by Septembre-Malaterre et al., 2016 [25], respectively). Mango fruit was shown to be rich in hydroxybenzoic acids (gallic acid, vanillic acid, protocatechic acid), in chlorogenic acid and in glucoside hydroxybenzoic derivatives (gallic acid-O-hexoside, syringic acid-O-hexoside) [25,36].

Fermentation of papaya pulp resulted for several starter strains in changes in TPC and in RSA, compared to the control conditions (Figure 3B). Dunnett's test pointed out a significant increase of TPC, when fermentation was started with DSM20193 (p -value 0.027). The same test applied to RSA, showed increases for fermented papaya started with DSM10196, 6a, 39, 5, 17, 28, 1, 56, 10b and 12b with p -values ranging from 0.001 to 0.05, respectively. In fermented papaya pulp, TPC ranged between 32.8 and 64.8 mg GAE/100g of pulp. RSA was in the extreme range of 2.9%–57.9% with a mean at 38.6%. These values were notably below the ones observed for tea. The phenolic level detected for papaya was close to that reported by Septembre-Malaterre et al., (2016) [25]: 33.4 and 41.3 mg GAE/100g for papaya Colombo and for papaya Solo respectively.

Non-fermented pineapple juice exhibited a TPC of 0.45 ± 0.02 g GAE·L⁻¹ and a RSA of $57.3\% \pm 1.3\%$, which is consistent with previous data [25]. For pineapple juice, TPC exhibited a significant increase as detected by the Dunnett's unilateral test, only for juice started with *W. cibaria* 64 (p -value 0.045) (Figure 3C). Fermented juice started with strain 17 exhibited a marked decrease in TPC and antioxidant activity (data not shown). A significant increase of antioxidant activity as measured with the DPPH assay was also observed for pineapple juice started with strain 64 (p -value < 0.0001). With this assay, other significant increases of activity were detected for juice started with *Lc. pseudomesenteroides* DSM10193 (p -value 0.005) and *Lc. pseudomesenteroides* 56 (p -value 0.013).

Papaya pulp and pineapple juice share several common features. They are rich in hydroxycinnamic acids (ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid and sinapic acid) and in glucoside hydroxycinnamic derivatives [25,37,38]. By contrast, these molecules are not the main polyphenolics in tea and in mango pulp. The observed increase of phenolic content during lactic acid fermentation may result from the depolymerisation or hydrolysis of phenolic compounds [12]. Several enzymes, like β -glucosidase, tannase, feruloyl-esterase or phenolic acid decarboxylase have been characterised in *Lactobacillus* spp [18,39,40]. Tannase and β -glucosidase were detected in *W. paramesenteroides*, *Lc. mesenteroides* and *Lc. fallax* while feruloyl esterase was observed in *Leuconostoc* spp. [41,42]. Formation of exopolysaccharides, glutathione, superoxide dismutase and catalase was also involved in the increase of antioxidant activities during lactic acid fermentation [12]. EPS production by *W. confusa*, *W. cibaria* and *Leuconostoc* spp. may partly explain the observed changes but RSA modulation was not species-dependent.

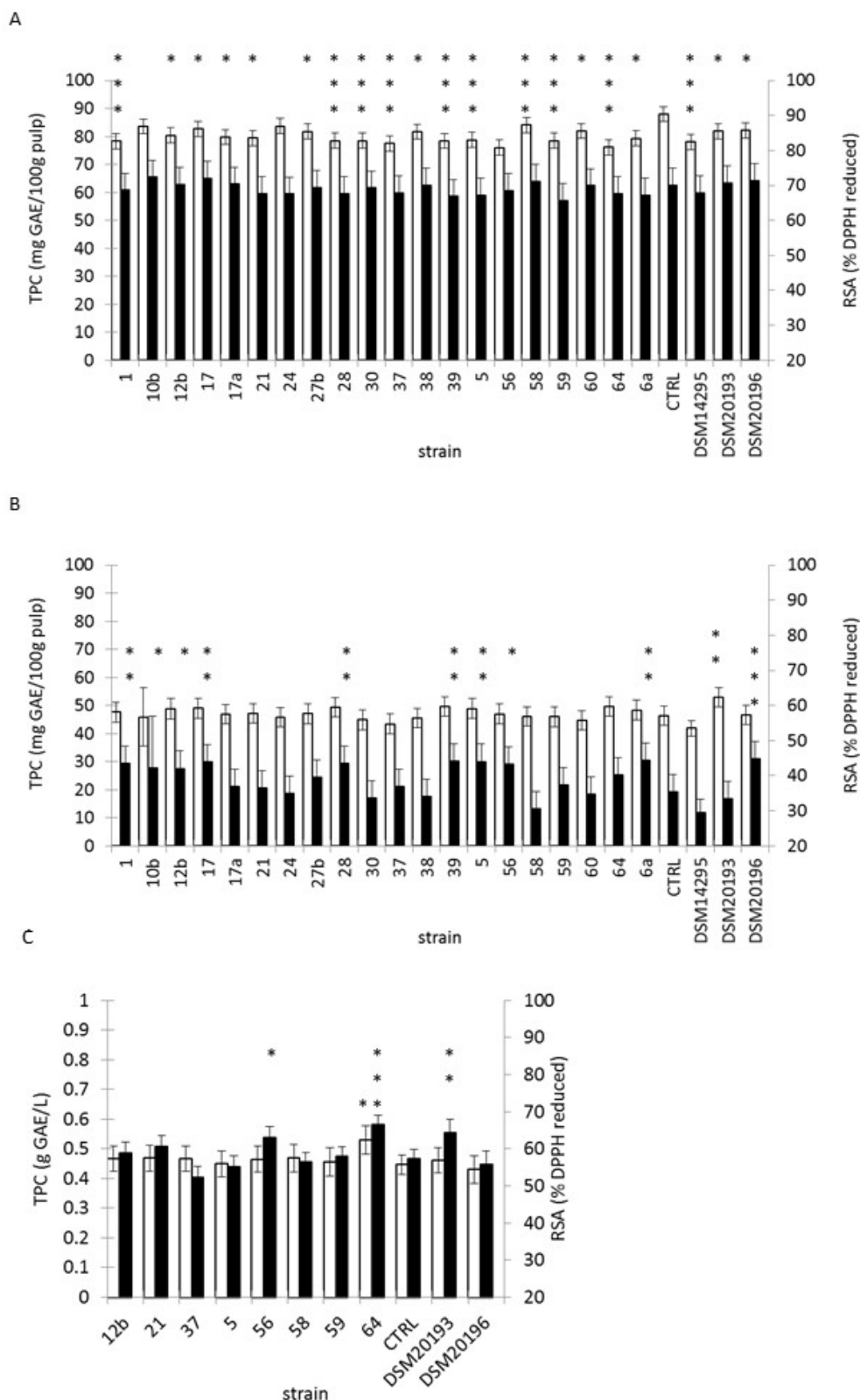


Figure 3. Total phenolic content and radical scavenging activity of fruits: (A) mango pulp; (B) papaya pulp; (C) pineapple juice. White bar: Total polyphenol content (TPC) of material fermented for 48 h with the indicated starter strain. Black bar: Radical scavenging activity (RSA) of material fermented for 48 h with the indicated starter strain. Control, labelled CTRL, corresponds to incubated juice. *** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ from Dunnett’s test versus control.

A subset of pair's food material—strain was assayed for red blood cell protection from free-radical induced haemolysis and for LDL protection from copper-induced oxidation activity. Papaya pulp and pineapple juice were used as they were the only substrates in which increases of TPC or RSA were observed during fermentation. Moreover, these two substrates exhibited the lowest RSA values, which might facilitate the detection of RSA increase. Fermentation was started with strain 64, DSM20193, 56 or 12b for both substrates and with strains 17, 28, 1, 56 or 10b for papaya pulp only. Haemolysis half-time values increased from 269 ± 20 min for control cells to 302 ± 24 min for 50-fold-diluted papaya pulp and to 282 ± 24 for 100-fold-diluted pineapple juice (Table 4). The haemolysis half-time of pulp started with strain 1 was significantly higher than for control cell (p -value 0.032). Besides this observation, the half-time was reduced for pulp started with 10b versus incubated pulp (p -value 0.028) and for juice started with 12b versus incubated juice. For LDL oxidation assay, half-time with control cells was significantly lower than with 500-fold-diluted incubated pineapple juice and juice started with 56, 12b or 64 (Table 4). LDL oxidation half-time data was higher for 500-fold-diluted pineapple juice than for 50-fold-diluted papaya pulp. No significant difference between fermented and unfermented pulp was observed. The effects observed with DPPH assay were not reflected by haemolysis inhibition neither by LDL oxidation inhibition. This discrepancy can be explained by the differences in methods that do not trigger the same types of molecular mechanisms and/or involve different radicals or pro-oxidants and/or are conditional on the experimental time [43]. A further analysis of polyphenols, but also EPS and peptide composition changes during fermentation, would be necessary to understand these observations.

Table 4. Haemolysis inhibition and LDL oxidation inhibition by fermented papaya pulp or pineapple juice started with different strains (mean \pm SD). * Correspond to a p -value < 0.05 . Different letters correspond to significant differences.

Condition	Half-Time for Haemolysis (Min)		Half-Time for Ldl Oxidation (Min)	
CONTROL CELLS	269 ± 20		28.1 ± 4.2	B
PAPAYA PULP	302 ± 24		45.1 ± 5.1	AB
PAPAYA/STRAIN 1	340 ± 27	* vs control cells		
PAPAYA/STRAIN 10B	257 ± 94	* vs pulp		
PAPAYA/STRAIN 12B	264 ± 70		52.3 ± 23.0	AB
PAPAYA/STRAIN 28	280 ± 40			
PAPAYA/STRAIN DSM20193	319 ± 20			
PAPAYA/STRAIN 56	259 ± 46		52.0 ± 15.0	AB
PAPAYA/STRAIN 64	279 ± 12		54.2 ± 28.2	AB
PAPAYA/STRAIN 17	278 ± 7			
PINEAPPLE JUICE	282 ± 24		71.7 ± 9.4	A
PINEAPPLE/STRAIN 12B	208 ± 72	* vs juice	75.9 ± 12.7	A
PINEAPPLE/STRAIN DSM20193	273 ± 73			
PINEAPPLE/STRAIN 56	234 ± 79		75.7 ± 12.4	A
PINEAPPLE/STRAIN 64	289 ± 47		54.2 ± 28.2	A

3.6. Changes in Microbial Counts, pH, Sugar and RSA Over-Fermentation and Refrigerated Storage

The pH during fermentation showed an increase from 3.4 to 4.0 for 64-started juice and to 3.5 for 12b-started juice. The pH became constant after 16 days of storage. This pH increase could result from decarboxylation of malic or citric acids, the main organic acids in pineapple, which have two and three carboxyl groups, respectively [44,45]. Reducing the sugar level decreased over-fermentation, starting from $79 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and reaching 60.5 and $61.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, for juice started with 64 and with 12b. HPLC sugar analyses showed different patterns. For juice started with 64, glucose was the main sugar consumed with concentration decreasing from $39.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $28.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ over-fermentation. Sucrose content decreased from $36.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $32.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and fructose content decreased from $44.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ to $40.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The resulting product is 20% poorer in sugars compared to the non-fermented juice, which

is another interesting nutritional property. For juice started with 12b, only glucose was consumed, resulting in a content of $33.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Surprisingly, after 16 days of storage at $4 \text{ }^\circ\text{C}$, the reducing sugar level was 79.2 and $71.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, for juice started with 64 and with 12b. The concentration of glucose, fructose and sucrose was 38.1 , 46.4 and $48.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, for juice started with 64. For juice started with 12b, the concentration of glucose, fructose and sucrose was 36.6 , 40.7 and $40.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Altogether, an increase of reducing sugar content and of glucose, fructose and sucrose was observed for 64-started juice over shelf-life. This observation stems probably from the hydrolysis of polysaccharides or ester bounds releasing sugars or, in a lesser extent, from the synthesis of aldehydes or ketones which contain reducing extremities. The synthesis of different aldehydes and ketones was previously observed for *W. cibaria* and numerous *Leuconostoc* species in sourdough and cheeses [46,47]. This observation further warrants the requirement for analysis of composition changes during fermentation and storage. During storage, the RSA of started juice increased by 34% and by 29%, with strains 64 and 12b, respectively.

LAB count at inoculation was $1.0 \times 10^5 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$. It increased to $7.5 \times 10^5 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ over-fermentation with strain 64 and decreased during refrigerated storage to $1.5 \times 10^5 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$. For 12b, a marked increase was evident during fermentation and the counts reached $7.5 \times 10^7 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$. An additional increase up to $1.6 \times 10^8 \text{ cfu}\cdot\text{mL}\cdot\text{mL}^{-1}$ was observed during storage. Neither enterobacteria nor yeasts and moulds were detected in started juices and total bacterial counts corresponded exactly to LAB counts.

On the whole, 16 days of refrigerated storage did not significantly alter the microbial quality of fermented juices and preserved antioxidant properties.

3.7. Sensory Profile and Fermented Juice Quality Evaluation

Pineapple juice started with *W. cibaria* 64 or with *Lc. pseudomesenteroides* 12b was chosen for sensory analysis. Pineapple juice was characterised by a high acidity and a sweet flavour, but also by fluidity, smoothness and freshness. Yogurt odour and taste were significantly more marked in started juice compared to control juice (strain 64 $p < 0.001$; strain 12b $p < 0.05$). Other sensory attributes did not significantly differ between the control and the 64-started juice. Hot and sparkling tastes were more present in pineapple juice started with strain 12b compared to the control and to 64-started juice ($p < 0.001$). Moreover, 12b-started juice was characterised by a more pronounced sweet and sour taste compared to the control juice ($p < 0.05$). Lastly, the pineapple character was significantly lower in 12b started juice compared to control juice ($p < 0.01$). These characteristics result in a significantly reduced overall quality for 12b started juice compared to non-fermented juice ($p < 0.05$). Interestingly, PCA analysis showed a very clear grouping of assays according to a limited number of sensory attributes (Figure 4). Yogurt character and sweet taste reflect *W. cibaria* 64-started juice properties, whereas *Lc. pseudomesenteroides* 12b-started juices were characterised by hot and sparkling tastes and non-fermented juice by its marked pineapple taste.

Altogether, started juice was liked with global quality scores of 5.5 and 5.1, respectively, for juices started with 64 and 12b. The non-started juice was more appreciated, with a score of overall quality of 6.9.

Hedonic test scores showed that fermented pineapple juice started with strain 12b was more appreciated than that started with strain 64, but the difference was not significant (Figure 5). Colour, taste, pineapple flavour and texture evaluation did not show differences according to the starter strain. The only difference was for odour, slightly more appreciated in 12b-started juices.

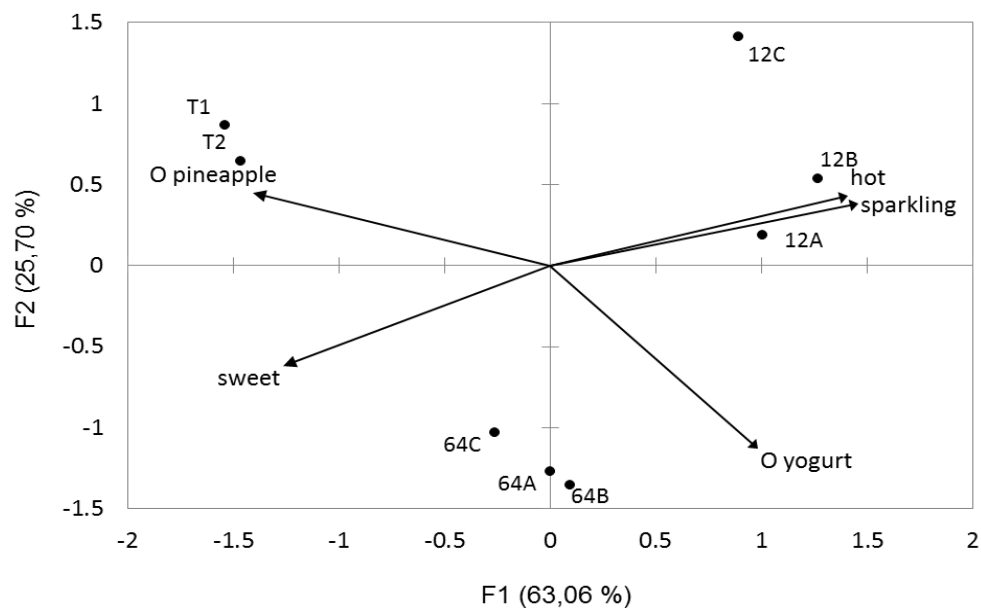
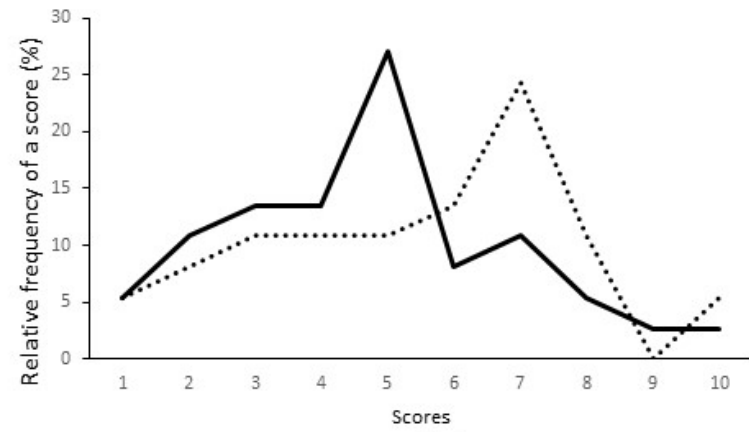


Figure 4. Principal component analysis of sensory profiles of pineapple juice non-fermented or started with 64 and 12b strains. T1 and T2, pineapple juice; 64A, 64B, 64C, juice started with strain 64; 12A, 12B, 12C, juice started with strain 12b. Arrows correspond to eigenvectors for indicated descriptors.

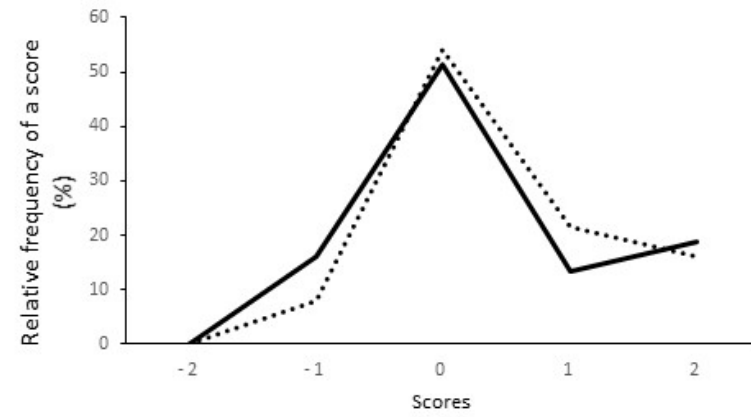
4. Conclusions

A set of 34 strains from 13 species with highly diverse characteristics was screened for the ability to start lactic fermentation of juice, pulps and tea infusions and to lead to pleasant beverages with preserved antioxidant properties. Two strains were particularly investigated, 64 and 12b. The fermented juices were globally appreciated and exhibited peculiar sensory characteristics.

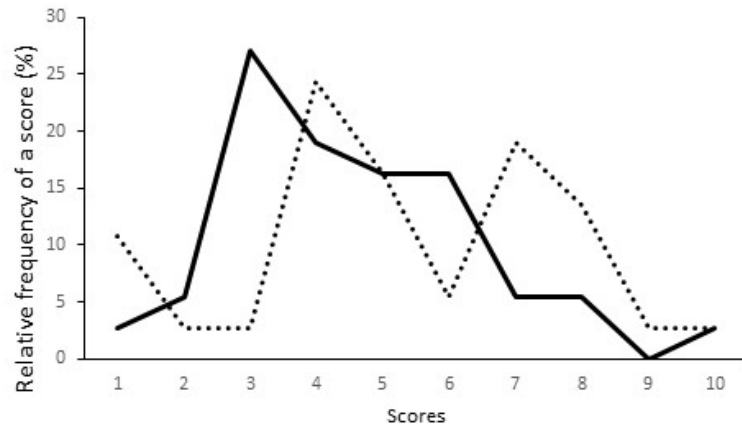
W. cibaria 64 produced EPS, had moderate acidification ability and grew poorly in apple or pineapple juice. Pineapple juice fermented with this strain exhibited a significant increase in TPC and RSA, which was maintained during refrigerated storage. However, other antioxidant activity determination assays did not succeed in detecting changes. *Lc. pseudomesenteroides* 12b also produced EPS but exhibited a slow acidification profile. Its growth in apple juice was poor but good in pineapple juice. With this strain as starter, an increase in antioxidant activity was noted in fermented papaya pulp but remained unchanged in fermented pineapple juice. In a green tea infusion or mango pulp, fermentation with this strain resulted in decreased TPC. These differences probably reflect different enzymatic activities that modulate the composition of fruit juice over-fermentation. The investigation of metabolite changes in fruit juice during lactic fermentation with these strains and the determination of enzymatic activities involved in polyphenolic compounds' hydrolysis would lead to a better understanding of the observed properties of fermented juices. Lastly, fruit lactic fermentation with strains from those species is an unusual event, though these species are often detected in fermented foods of plant origin [48–50] and would thus require safety studies. In particular, this might entail that biogenic amine formation and infectious potential would have to be carefully investigated [51,52].



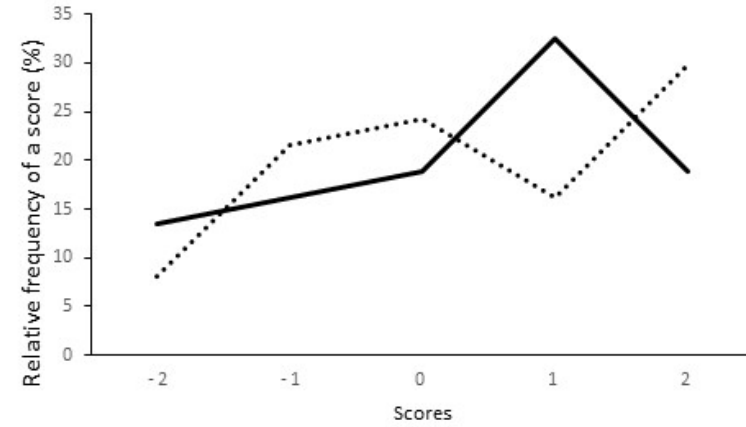
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 5. Cont.

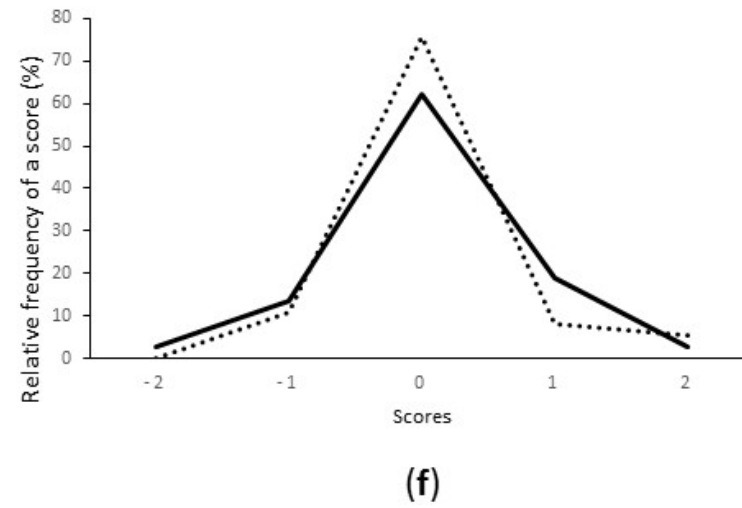
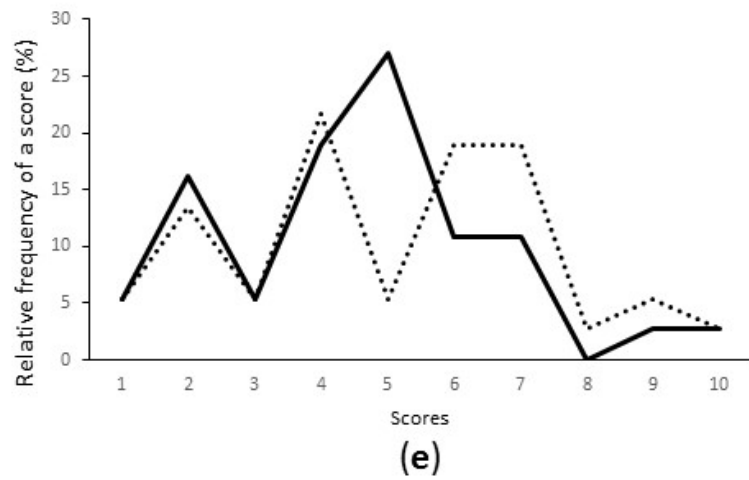


Figure 5. Hedonic sensory analysis: (a) overall acceptability; (b) colour; (c) odour; (d) pineapple taste; (e) taste; (f) texture. Light dotted line: juice started with 12b; black line: juice started with 64.

Acknowledgments: We acknowledge Marina Chopinet from the Regional Centre for Innovation and technology transfer of Réunion Island for her grateful help for hedonic sensory analysis. We thank Jerome Minier for technical assistance with sugar analysis. Amandine Fessard's PhD is supported by a fellowship from the "Conseil Régional de La Réunion et l'Europe". Ashish Kapoor's fellowship was provided by Qual'innov.

Author Contributions: Emmanuel Bourdon and Fabienne Remize supervised the work, in their fields, health related effects and microbiology respectively. Theeshan Bahorun supported the work for antioxidant activities of fermented foods. Sophie Assemat supervised sensory analyses. Experimental work was performed by Amandine Fessard, with support of Ashish Kapoor, Bachelor student, Jessica Patche and Mathilde Hoarau, technicians.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Arts, I.C.W.; Hollman, P.C.H. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies 1–4. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 3175–3255.
2. McKay, D.L.; Blumberg, J.B. The role of tea in human health: An update. *J. Am. Coll. Nutr.* **2002**, *21*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Di Cagno, R.; Coda, R.; de Angelis, M.; Gobbetti, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Nicoli, M.; Anese, M.; Parpinel, M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 94–100. [[CrossRef](#)]
5. Ioannou, I.; Hafsa, I.; Hamdi, S.; Charbonnel, C.; Ghoul, M. Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *J. Food Eng.* **2012**, *111*, 208–217. [[CrossRef](#)]
6. Oboh, G. Effect of blanching on the antioxidant properties of some tropical green leafy vegetables. *LWT Food Sci. Technol.* **2005**, *38*, 513–517. [[CrossRef](#)]
7. Beena Divya, J.; Kulangara Varsha, K.; Madhavan Nampoothiri, K.; Ismail, B.; Pandey, A. Probiotic fermented foods for health benefits. *Eng. Life Sci.* **2012**, *12*, 377–390. [[CrossRef](#)]
8. Dufresne, C.; Farnworth, E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 409–421. [[CrossRef](#)]
9. Park, K.Y.; Jeong, J.K.; Lee, Y.E.; Daily, J.W. Health benefits of Kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J. Med. Food* **2014**, *17*, 6–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Di Cagno, R.; Minervini, G.; Rizzello, C.G.; de Angelis, M.; Gobbetti, M. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 1062–1071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Filannino, P.; Azzi, L.; Cavoski, I.; Vincentini, O.; Rizzello, C.G.; Gobbetti, M.; di Cagno, R. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *163*, 184–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hur, S.J.; Lee, S.Y.; Kim, Y.C.; Choi, I.; Kim, G.B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* **2014**, *160*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ng, C.C.; Wang, C.Y.; Wang, Y.P.; Tzeng, W.S.; Shyu, Y.T. Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J. Biosci. Bioeng.* **2011**, *111*, 289–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Di Cagno, R.; Surico, R.F.; Paradiso, A.; de Angelis, M.; Salmon, J.C.; Buchin, S.; de Gara, L.; Gobbetti, M. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *128*, 473–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Di Cagno, R.; Surico, R.F.; Siragusa, S.; de Angelis, M.; Paradiso, A.; Minervini, F.; de Gara, L.; Gobbetti, M. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *127*, 220–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dueñas, M.; Fernández, D.; Hernández, T.; Estrella, I.; Muñoz, R. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J. Sci. Food Agric.* **2005**, *85*, 297–304.
17. Marazza, J.A.; Nazareno, M.A.; Savoy de Giori, G.; Garro, M.S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Funct. Foods* **2012**, *4*, 594–601. [[CrossRef](#)]
18. Pyo, Y.H.; Lee, T.C.; Lee, Y.C. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **2005**, *38*, 551–559. [[CrossRef](#)]

19. Zhao, D.; Shah, N.P. Lactic acid bacterial fermentation modified phenolic composition in tea extracts and enhanced their antioxidant activity and cellular uptake of phenolic compounds following *in vitro* digestion. *J. Funct. Foods* **2016**, *20*, 182–194. [[CrossRef](#)]
20. Fessard, A.; Bourdon, E.; Payet, B.; Remize, F. Identification, stress tolerance, and antioxidant activity of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and leaves. *Can. J. Microbiol.* **2016**, *62*, 550–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Naser, S.M.; Thompson, F.L.; Hoste, B.; Gevers, D.; Dawyndt, P.; Vancanneyt, M.; Swings, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* **2005**, *151*, 2141–2150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rubio, R.; Jofré, A.; Martín, B.; Aymerich, T.; Garriga, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiol.* **2014**, *38*, 303–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Torriani, S.; Felis, G.E.; Dellaglio, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3450–3454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miller, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426–428. [[CrossRef](#)]
25. Septembre-Malaterre, A.; Stanislas, G.; Douraguia, E.; Gonthier, M.P.P. Evaluation of nutritional and antioxidant properties of the tropical fruits banana, litchi, mango, papaya, passion fruit and pineapple cultivated in Reunion French Island. *Food Chem.* **2016**, *212*, 225–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Vos, P.; Garrity, G.; Jones, D.; Krieg, N.R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A.; Schleifer, K.H.; Whitman, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; Springer: New York, NY, USA, 2009.
27. Espirito-Santo, A.P.; Carlin, F.; Renard, C.M.G.C. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth?—A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. *Food Res. Int.* **2015**, *78*, 352–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Almajano, M.P.; Carbó, R.; Jiménez, J.A.L.; Gordon, M.H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.* **2007**, *108*, 55–63. [[CrossRef](#)]
29. Atoui, A. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem.* **2005**, *89*, 27–36. [[CrossRef](#)]
30. Karori, S.M.; Wachira, F.N.; Wanyoko, J.K.; Ngure, R.M. Antioxidant capacity of different types of tea products. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, *6*, 2287–2296. [[CrossRef](#)]
31. Malbaša, R.V.; Lončar, E.S.; Vitas, J.S.; Čanadanović-Brunet, J.M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1727–1731. [[CrossRef](#)]
32. Peterson, J.; Dwyer, J.; Bhagwat, S.; Haytowitz, D.; Holden, J.; Eldridge, A.L.; Beecher, G.; Aladesanmi, J. Major flavonoids in dry tea. *J. Food Compos. Anal.* **2005**, *18*, 487–501. [[CrossRef](#)]
33. Mukhtar, H.; Ahmad, N. Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1698–1702.
34. Sang, S.; Lambert, J.D.; Ho, C.T.; Yang, C.S. The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacol. Res.* **2011**, *64*, 87–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Chen, G.L.; Chen, S.G.; Zhao, Y.Y.; Luo, C.X.; Li, J.; Gao, Y.Q. Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *57*, 150–157. [[CrossRef](#)]
36. Palafox-Carlos, H.; Yahia, E.M.; González-Aguilar, G.A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS–ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chem.* **2012**, *135*, 105–111. [[CrossRef](#)]
37. Nguyen, T.T.T.; Shaw, P.N.; Parat, M.O.; Hewavitharana, A.K. Anticancer activity of *Carica papaya*: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 153–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rivera-Pastrana, D.M.; Yahia, E.M.; González-Aguilar, G.A. Phenolic and carotenoid profiles of papaya fruit (*Carica papaya* L.) and their contents under low temperature storage. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *90*, 2358–2365. [[PubMed](#)]
39. Rodriguez, H.; Curiel, J.A.; Landete, J.M.; de las Rivas, B.; Lopez de Felipe, F.; Gomez-Cordoves, C.; Mancheno, J.M.; Munoz, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *132*, 79–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Rodríguez, H.; Landete, J.M.; de las Rivas, B.; Muñoz, R. Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1393–1398. [[CrossRef](#)]
41. Kostinek, M.; Specht, I.; Edward, V.A.; Pinto, C.; Egounlety, M.; Sossa, C.; Mbugua, S.; Dortu, C.; Thonart, P.; Taljaard, L.; et al. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *114*, 342–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ramos-de-la-Peña, A.M.; Contreras-Esquivel, J.C. Methods and substrates for feruloyl esterase activity detection, a review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2016**, *130*, 74–87. [[CrossRef](#)]
43. Niki, E.; Noguchi, N. Evaluation of Antioxidant Capacity. What Capacity is Being Measured by Which Method? *IUBMB Life* **2001**, *50*, 323–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Bartolomé, A.P.; Rupérez, P.; Fúster, C. Pineapple fruit: Morphological characteristics, chemical composition and sensory analysis of red Spanish and Smooth Cayenne cultivars. *Food Chem.* **1995**, *53*, 75–79. [[CrossRef](#)]
45. Cárnara, M.; Díez, C.; Torija, E. Chemical characterization of pineapple juices and nectars. Principal components analysis. *Food Chem.* **1995**, *54*, 93–100. [[CrossRef](#)]
46. Corona, O.; Alfonzo, A.; Ventimiglia, G.; Nasca, A.; Francesca, N.; Martorana, A.; Moschetti, G.; Settanni, L. Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 43–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Pogačić, T.; Maillard, M.B.; Leclerc, A.; Hervé, C.; Chuat, V.; Valence, F.; Thierry, A. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* volatilomes in cheese conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 2335–2346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Altay, F.; Karbancioglu-Güler, F.; Daskaya-Dikmen, C. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 44–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Jung, J.Y.; Lee, S.H.; Lee, H.J.; Seo, H.Y.; Park, W.S.; Jeon, C.O. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 378–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Park, E.J.; Chun, J.; Cha, C.J.; Park, W.S.; Jeon, C.O.; Bae, J.W. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiol.* **2012**, *30*, 197–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Abriouel, H.; Lerma, L.L.; Casado Muñoz, M.d.C.; Montoro, B.P.; Kabisch, J.; Pichner, R.; Cho, G.S.; Neve, H.; Fusco, V.; Franz, C.M.A.P.; et al. The controversial nature of the *Weissella* genus: Technological and functional aspects versus whole genome analysis-based pathogenic potential for their application in food and health. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Jeong, D.W.; Lee, J.H. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1078–1084. [[CrossRef](#)]



Résultats complémentaires

Introduction

Les résultats présentés dans la publication précédente ont été obtenus avec du jus d'ananas commercial (Carrefour ou Albius - Royal Bourbon Industries). Le jus commercial a d'abord été préféré au jus frais, afin de s'affranchir de la flore naturellement présente dans les jus fraîchement pressés. D'autre part, les premiers essais à partir de jus fraîchement pressés avaient montré une dominance de levures et l'incapacité des starters utilisés à s'implanter. Avec le succès de la fermentation menée par les deux isolats 64 ou 12b, nous avons décidé d'essayer à nouveau la fermentation de jus d'ananas frais en utilisant ces deux souches. L'étude sur du jus frais permettrait dans un premier temps de confirmer les résultats obtenus sur du jus commercial, et dans un deuxième temps de tester ces deux souches sur une boisson de qualité organoleptique bien supérieure.

Notre protocole de fermentation à partir de fruits fraîchement pressés ou mixés nécessitait une première étape de pasteurisation de la matière première avant l'inoculation du starter (afin de limiter la population en levures, résultat non montré). Or, la pasteurisation peut entraîner des pertes en composés antioxydants, diminuant ainsi l'activité antioxydante. Ainsi, il paraissait important de quantifier dans quelle mesure cette étape de pasteurisation des jus et des pulpes de fruit (ananas, papaye, mangue) pouvait diminuer l'activité antioxydante.

Dans la publication ci-dessus, la teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante augmentaient au cours de la fermentation de jus d'ananas avec les isolats 64, 56 et DSM 20193 et de pulpe de papaye avec les isolats DSM 20193, DSM 20196, 6a, 39, 5 17, 28, 1, 56, 10b et 12b. Ces résultats ont été déterminés par les tests Folin-Ciocalteu et DPPH. Afin de confirmer ces résultats, nous avons déterminé l'activité anti-radicalaire par un troisième test : le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Matériels et méthodes

Effet de la pasteurisation sur les propriétés antioxydantes des jus et des pulpes de fruit

La pasteurisation a été réalisée avec un traitement de 5 min à 75°C. La teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité anti-radicalaire ont été mesurées pour de la pulpe pasteurisée et non pasteurisée, et pour du jus frais et du jus frais pasteurisé en utilisant le test de Folin-Ciocalteu et le test DPPH, respectivement. Les méthodes sont décrites dans l'article précédent. Les jus frais ont été également comparés aux jus commerciaux.

Test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Le test ORAC permet de mesurer l'activité antioxydante d'un échantillon vis-à-vis d'un générateur de radicaux : l'AAPH (2,2'-Azobis [2-méthyl- propionamidin]dihydrochloride). Les échantillons ont été dilués 400 fois dans du tampon phosphate 75 mM (pH 7,4) pour l'expérience. Dans une plaque de 96 puits (noire), 25 µL d'échantillon sont mélangés avec 150 µL de fluorescéine puis incubé pendant 15 min à 37°C. 25 µL d'AAPH sont ensuite ajoutés et la décroissance de la fluorescence est suivie pendant 1h40, à une longueur d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 485 nm et 530 nm. L'AAPH, en générant des radicaux libres va entraîner la dégradation de la fluorescéine et donc une diminution de la fluorescence. L'ajout de molécules antioxydantes permet de retarder cette dégradation. La réaction est standardisée en utilisant une gamme de Trolox (6,25-75 µM). Les résultats sont exprimés en Trolox équivalent (µM). Ils représentent la moyenne de trois expériences réalisées indépendamment et analysées en triplicat.

Fermentation lactique de jus d'ananas frais

Les ananas ont été lavés, épluchés puis coupés avant de les presser. Les jus ont été obtenus grâce à un extracteur de jus (Philips, Masticating juicer). L'extracteur de jus broie les fruits en les pressant avec une vis sans fin contre les grilles d'un tamis, ce qui permet de séparer les fibres du jus. Avant fermentation, les jus ont été pasteurisés à 80°C, 5 min puis inoculés avec les isolats 64 et 12b. Après deux jours de fermentation, les jus ont été conservés pendant trois jours à 4°C et comparés à du jus fraîchement préparé (J0) et du jus frais conservé à 4°C pendant cinq jours (J5). La teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité anti-radicalaire (par le test DPPH) ont été mesurées. Les profils sensoriels de chaque produit ont été comparés en utilisant les mêmes descripteurs que ceux décrits dans l'article précédent.

Résultats et Discussion

Effet de la pasteurisation sur les propriétés antioxydantes des jus et des pulpes de fruit

La pasteurisation peut modifier les propriétés nutritionnelles et antioxydantes des fruits en agissant sur les molécules hydrosolubles comme la vitamine C ou les composés phénoliques. Ainsi, nous avons désiré vérifier si notre étape de pasteurisation ne diminuait pas la teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante. En comparant au jus frais, le jus commercial possède une teneur en composés phénoliques significativement plus basse que le

jus frais ($p < 0,05$) (**Figure 20A**). En effet, la teneur du jus frais est de $0,68 \pm 0,21$ g AGE.L⁻¹ et celle du jus commercial est de $0,52 \pm 0,05$ g AGE.L⁻¹. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre le jus frais et le jus frais pasteurisé : notre étape de pasteurisation n'a donc eu aucun effet sur la teneur en composés phénoliques. Pour l'activité anti-radicalaire, aucune différence n'a été observée entre le jus frais et le jus commercial. En revanche, le jus pasteurisé a montré une activité anti-radicalaire significativement plus élevée que le jus frais non pasteurisé ($p < 0,0001$).

Pour les pulpes de fruit, aucune différence n'a été observée entre la papaye pasteurisée et non pasteurisée, que ce soit pour la teneur en composés phénoliques ou l'activité anti-radicalaire (**Figure 20B**). En revanche, la mangue pasteurisée a montré une teneur en composés phénoliques significativement plus élevée que la mangue non pasteurisée ($p < 0,05$), mais aucune différence n'a été observée pour l'activité anti-radicalaire. La mangue possède une teneur en composés phénoliques plus élevée que la papaye ($p < 0,0001$) mais leurs activités antioxydantes sont les mêmes.

Notre étape de pasteurisation n'a donc eu aucun effet négatif sur les propriétés antioxydantes des jus et des pulpes. Au contraire, une augmentation des propriétés antioxydantes a été observée pour le jus d'ananas et la pulpe de mangue pasteurisés. En général, la pasteurisation entraîne une baisse des activités nutritionnelles, car elle dégrade les composés hydrosolubles, comme la vitamine C et certains composés phénoliques. Cependant, il a déjà été démontré que dans certains cas, la pasteurisation pouvait augmenter les activités antioxydantes [145]. Les auteurs ont déduit que la chaleur pouvait hydrolyser les liaisons présentes dans les composés phénoliques polymériques. L'augmentation de la teneur en composés phénoliques suite à un traitement thermique modéré peut s'expliquer également par la formation de produits de Maillard [146]. De plus, certains composés phénoliques sous leur forme oxydée intermédiaire peuvent avoir une activité anti-radicalaire plus efficace que s'ils étaient sous leur forme non oxydée [147]. Nous pensons cependant, que ces variations dépendent de la matrice, de la composition en composés phénoliques et autres molécules, de la durée et de la température d'incubation.

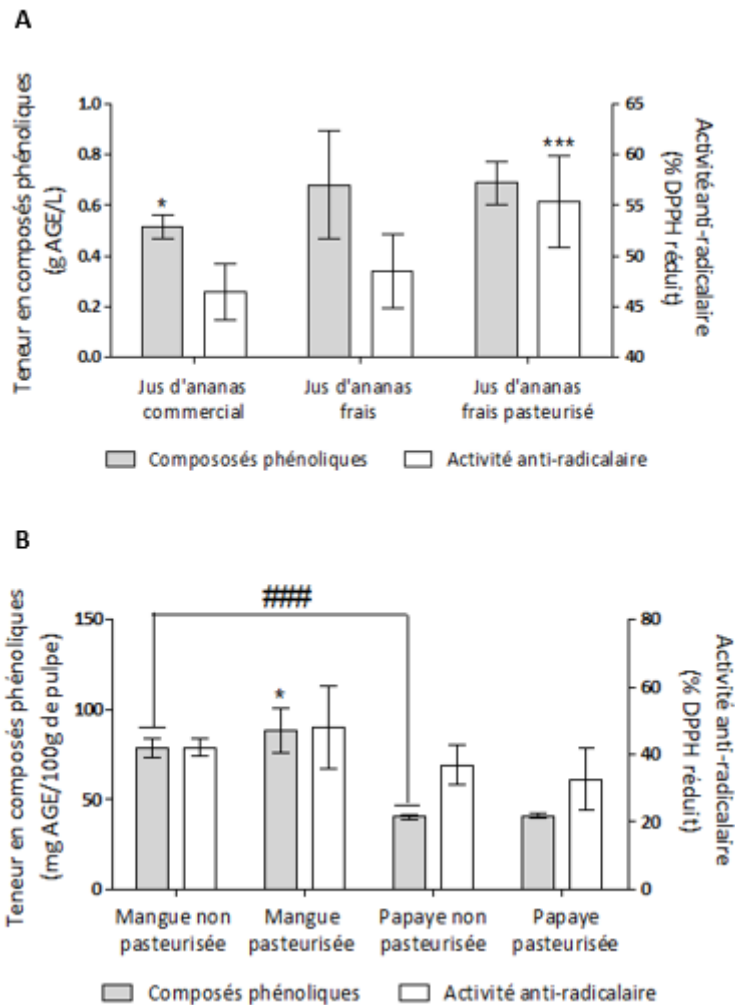


Figure 20 : Effet de la pasteurisation sur la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante des jus d'ananas (A) et des pulpes de fruit (B).

Test comparatif de Dunnett : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ en comparaison au témoin non pasteurisé ; Test de comparaison multiple REGWQ ($p < 0,05$): ### $p < 0,001$

Modification de l'activité antioxydante au cours de la fermentation : test ORAC

Les résultats obtenus pour le test ORAC sont présentés sur la **Figure 21**. Les jus d'ananas commerciaux fermentés par les isolats 21, 64, 12b, 56, 5 et DSM 20193 ont montré une capacité antioxydante significativement plus élevée que le jus témoin non fermenté ($p < 0,0001$), révélée par le test de Dunnett (**Figure 21A**). Les jus fermentés par les isolats 21 (*W. cibaria*), 12b et 56 (*Lc. pseudomesenteroides*) ont montré les valeurs les plus élevées, soit 12 fois supérieure à celle du témoin. Ces résultats confirment les résultats précédents obtenus par le test DPPH pour les isolats 64, 56 et DSM20193. En revanche, le test DPPH n'avait révélé aucune différence pour les isolats 21, 12b et 5. Le test de Folin-Ciocalteu avait montré

une augmentation significative de la teneur en composés phénoliques uniquement avec l'isolat 64.

Pour la pulpe de papaye, les pulpes fermentées par les isolats 12b, 21, 6a et DSM20193 ont montré une capacité antioxydante significativement plus élevée, de 144 à 247 %, que la pulpe témoin non fermentée (**Figure 21B**). En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour les autres isolats. Ces résultats confirment ceux obtenus par le test DPPH pour les isolats 12b et 6a. En revanche, pour l'isolat 21 et la souche DSM 20193, aucune différence significative n'avait été observée pour le test DPPH. En revanche, une augmentation significative de la teneur en composés phénoliques avait été observée avec la souche DSM 20193.

Ces différences peuvent s'expliquer par les différences entre les deux tests. En effet, les tests ORAC et DPPH impliquent des mécanismes moléculaires différents et des radicaux différents, l'AAPH et le DPPH, respectivement. L'utilisation du test ORAC a permis néanmoins de confirmer les résultats obtenus pour les souches 64 et 12b. La souche 64 avait été capable d'augmenter la teneur en composés phénoliques du jus d'ananas ainsi que d'augmenter les capacités antioxydantes, prouvées par les tests DPPH et ORAC. La souche 12b est également très intéressante, elle avait montré une augmentation de l'activité antioxydante de la pulpe de papaye par le test DPPH mais pas pour le jus d'ananas. En revanche, le test ORAC a montré que la souche 12b augmentait les capacités antioxydantes du jus d'ananas.

Le test ORAC a également mis en évidence l'activité antioxydante des souches 21, 56 et DSM 20193. Pour rappel, les souches 64 et 21 sont des *W. cibaria* et les souches 12b, 56 et DSM 20193 sont des *Lc. pseudomesenteroides*. Les espèces *W. cibaria* et *Lc. pseudomesenteroides* présentent ainsi un fort potentiel pour la conception de produits aux capacités nutritionnelles améliorées. De plus, ces isolats avaient également montré des caractéristiques intéressantes lors de la première étude.

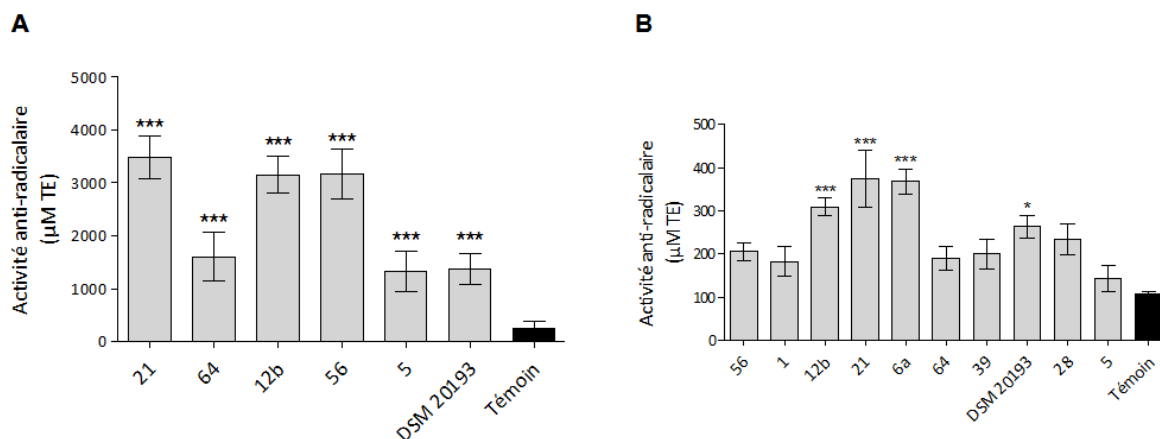


Figure 21 : Activité anti-radicalaire ($\mu\text{M TE}$) mesurée par le test ORAC pour les jus d'ananas fermentés (A) et les pulpes de papaye fermentées (B)
 Test comparatif de Dunnett : * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ en comparaison à la condition Témoin non fermentée

Fermentation lactique de jus d'ananas frais

1) Détermination de la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante

Après deux jours de fermentation, les jus d'ananas Victoria frais fermentés par les souches 12b et 64 ont été conservés à 4°C pendant trois jours. La teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire ont été déterminées en utilisant les tests Folin-Ciocalteu et DPPH, respectivement, à du jus frais conservé 5 jours à 4°C (J5) (**Figure 22**). Il est nécessaire de bien différencier ici le témoin et le témoin traité dans la publication précédente. Dans la publication, le témoin est maintenu à 30°C, car c'est la température de fermentation. Dans cette étude, le témoin est maintenu à 4°C pour imiter la conservation habituelle d'un jus frais. En comparant au témoin non fermenté J5, aucune différence significative n'a été observée pour les jus fermentés, que ce soit pour la teneur en composés phénoliques ou l'activité antioxydante.

Dans l'ensemble, ces résultats réalisés sur jus frais ne coïncident pas aux résultats observés pour les jus commerciaux. Les isolats 12b et 64 avaient été capables d'augmenter significativement la teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante de jus commerciaux. Dans le cas du jus frais, aucune différence n'a été observée.

L'augmentation de l'activité antioxydante au cours de la fermentation lactique est principalement due à la métabolisation des composés phénoliques. Il est possible que la composition du jus frais soit différente de celle du jus commercial. En effet, plusieurs

paramètres peuvent affecter la teneur en composés phénoliques des fruits, tels que la zone géographique de culture, les conditions de croissance du fruit, les conditions de récolte et le stade de maturité. De plus, les processus de fabrication des jus sont différents, et ceci peut avoir des effets sur la teneur en composés phénoliques. Il serait intéressant de comparer les composés phénoliques présents dans les jus frais et des jus pasteurisés avec des niveaux commerciaux de traitements thermiques (assurant une stabilité des jus à température ambiante).

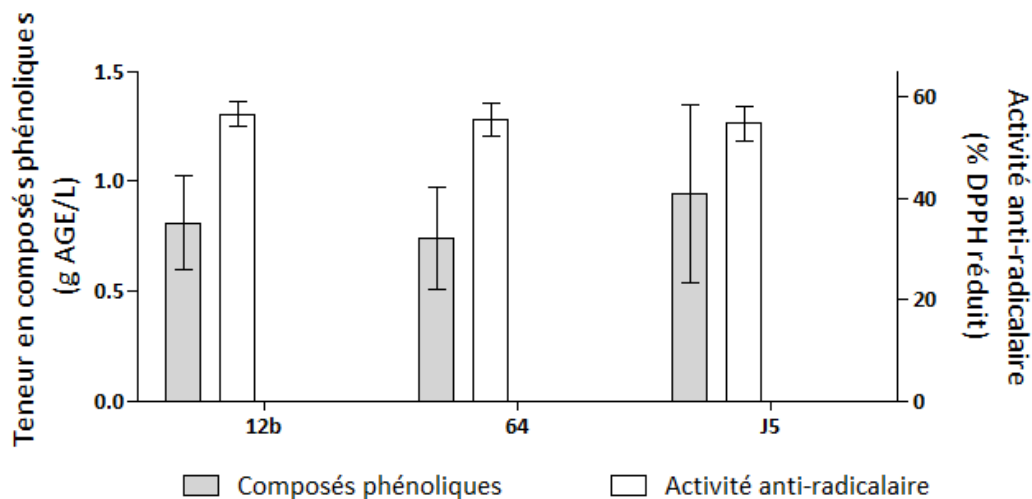


Figure 22 : Evolution de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante au cours de la fermentation lactique de jus d'ananas Victoria

2) Analyse sensorielle des jus d'ananas Victoria fermentés

La comparaison (REGWQ) des deux témoins J0 et J5 a montré des différences significatives au niveau de la couleur, de l'odeur et de la texture. Le témoin J0 a montré une odeur plus fruitée que le témoin J5 ($p < 0,01$). Une couleur plus orangée ($p < 0,05$) ainsi qu'une texture plus lisse ($p < 0,0001$) et plus fluide ($p < 0,01$) ont été observées pour le témoin J5.

D'un point de vue organoleptique, les jus d'ananas frais fermentés diffèrent significativement des jus frais témoins. En utilisant le test REGWQ ($p < 0,05$), des différences significatives ont été observées pour les descripteurs : couleur (C) jaune, C vert, C orange, odeur (O) ananas, O fermentés, O yaourt, O fruitée, texture (T) lisse, T fluide, saveur (S) acide, S sucrée, goût (G) frais, G yaourt, G piquant, G fermenté, G pétillant et au niveau de la qualité générale. Les profils sensoriels pour les quatre types de jus sont présentés dans la **Figure 23**. Les jus fermentés par les deux souches ont montré une couleur plus orangée, un caractère fermenté ainsi que des odeurs et des goûts de yaourt beaucoup plus prononcés comparés aux deux témoins ($p < 0,0001$). Le jus fermenté par la souche 12b, en plus des autres critères, a montré

des goûts piquant ($p < 0,01$), aigre-doux et pétillant ($p < 0,0001$) plus prononcés que les deux témoins. Dans l'ensemble, les jus fermentés ont été légèrement moins appréciés que les jus frais ($p < 0,05$).

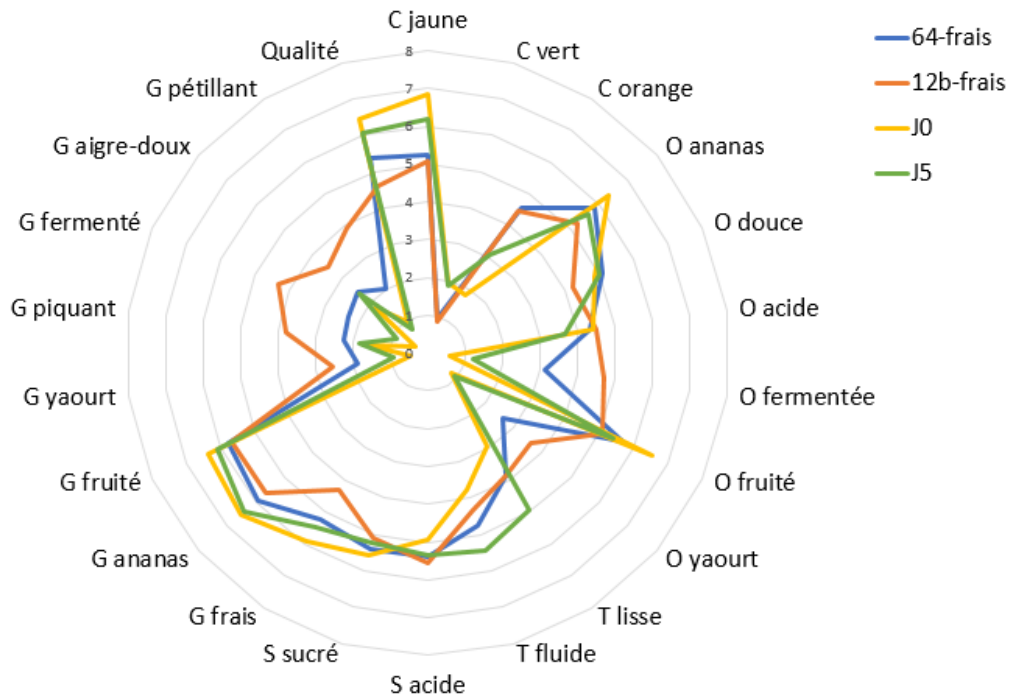


Figure 23 : Profil descriptif sensoriel des jus frais non fermentés et des jus frais fermentés par *W. cibaria* 64 et *Lc. pseudomesenteroides* 12b
 Descripteurs : C : Couleur ; O : Odeur ; T : Texture ; S : Saveur ; G : Goût

Ces résultats confirment bien ceux obtenus dans la publication précédente. Les caractères fermenté, yaourt, piquant et pétillant sont retrouvés tant chez les jus fermentés commerciaux que chez les jus frais fermentés. Le goût piquant et pétillant, produit par l'isolat 12b a sans doute pour origine la production de dioxyde de carbone, donc d'un métabolisme hétéro-fermentaire. Le goût et l'odeur de yaourt, observés pour les jus fermentés par l'isolat 64 proviennent probablement de la synthèse de composés aromatiques pendant la fermentation. Les caractères yaourt, piquant et pétillant peuvent être surprenants pour du jus d'ananas, c'est pourquoi dans l'ensemble les jus fermentés ont été moins appréciés que les jus non fermentés. Cela vient probablement du fait que les membres du jury s'attendaient déjà à du jus d'ananas. En comparant ces produits fermentés à du jus d'ananas, tel qu'ils ont l'habitude de boire, il est évident qu'ils soient moins appréciés. Proposer aux consommateurs ces produits, non sous la forme de jus d'ananas, mais sous la forme de nouvelles boissons à base d'ananas, peut modifier la vision d'ensemble des consommateurs. La dénomination de la boisson est également importante, en la présentant sous forme de jus, on s'attend forcément à du jus. Si

on la présente sous une autre forme, comme « boisson rafraichissante » ou « cocktail sans alcool », on aura ainsi plus de difficultés à imaginer le produit. La formulation du produit est également importante, si on veut le proposer sous forme de smoothie, ou ajouter du lactosérum (pratiquer pour les kéfir de fruits). L'utilisation d'une combinaison de souches au lieu d'une seule souche peut aussi apporter des propriétés intéressantes en maximisant les effets de chacune des souches.

Discussion et perspectives

Des 77 bactéries lactiques isolées, 28 bactéries et 6 souches de référence ont été sélectionnées pour réaliser des boissons fermentées. Des fruits tropicaux et emblématiques de la Réunion (ananas, papaye, mangue) ainsi que des infusions (thé vert et thé noir) ont été choisis comme substrats pour la fermentation lactique. Notre protocole de fermentation impliquait pour les fruits des étapes de lavage, de découpage, de pressage, de pasteurisation. La pasteurisation est indispensable sur ananas pour limiter la croissance de levures au cours de la fermentation et probablement pour limiter l'oxydation des composés phénoliques ou le brunissement enzymatique. Dans notre cas, la pasteurisation n'a entraîné aucun effet négatif sur les propriétés antioxydantes des fruits.

La fermentation du thé noir par les isolats 10b, 12b, 56, 58 et DSM 20193 a provoqué une diminution de la teneur en composés phénoliques mais n'a eu aucun effet sur l'activité antioxydante. Le thé noir est riche en théaflavine et théarubigine, qui sont les formes oxydées et polymérisées des catéchines. Ces composés sont appelés tanins condensés et peuvent être dépolymérisés par une enzyme, la tanase. La dépolymérisation libère donc des molécules et augmente en général la teneur en composés phénoliques. L'hypothèse de dépolymérisation des composés phénoliques pendant la fermentation de thé noir n'est donc a priori pas une hypothèse valable. Nous pensons que d'autres composés phénoliques du thé noir ont été oxydés pendant la fermentation, ce qui limiterait leur réaction avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Ces hypothèses peuvent être émises également pour la mangue, où la fermentation a entraîné aussi une diminution de la teneur en composés phénoliques. Cependant, une analyse exacte des composés phénoliques présents dans le thé noir et la mangue après fermentation est nécessaire afin de vérifier ou confirmer ces hypothèses.

Contrairement au thé noir et à la mangue, la fermentation lactique a augmenté significativement la teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante des jus d'ananas et de la pulpe de papaye avec plusieurs isolats appartenant aux espèces *W. cibaria*,

Lc. mesenteroides et *Lc. pseudomesenteroides*. Le thé, la mangue, la papaye et l'ananas diffèrent de par leur composition en composés phénoliques. La papaye et l'ananas sont riches en acides hydroxycinnamiques, que l'on ne retrouve pas ou très peu dans le thé et la mangue. Nous pensons que ces types de composés phénoliques sont des substrats préférés par nos isolats.

Parmi les isolats ayant montré une augmentation de l'activité antioxydante, *W. cibaria* 64 et *Lc. pseudomesenteroides* 12b ont montré les propriétés les plus intéressantes. *W. cibaria* 64 a augmenté significativement la teneur en composés phénoliques ainsi que l'activité antioxydante du jus d'ananas. *Lc. pseudomesenteroides* 12b a augmenté significativement l'activité antioxydante du jus d'ananas ainsi que de la pulpe de papaye, confirmé par les tests de Folin-Ciocalteu, DPPH et ORAC. En revanche, les tests sur cellules *in-vitro* n'ont montré aucune augmentation de l'activité antioxydante. Notre étude est la première à décrire les espèces *W. cibaria* et *Lc. pseudomesenteroides* comme étant capables d'augmenter l'activité antioxydante de fruits.

Ainsi, ces deux isolats ont été choisis pour une étude plus poussée de la qualité organoleptique et sanitaire du jus fermenté produit. Les jus fermentés par ces deux souches se conservent à 4°C pendant plus de 16 jours sans altération ni modification des propriétés antioxydantes. Au bout de 16 jours, le pH des jus fermentés par *W. cibaria* 64 et *Lc. pseudomesenteroides* 12b est de $4,04 \pm 0,02$ et $3,55 \pm 0,02$, respectivement. Nous pensons que l'augmentation du pH par l'isolat 64 est dû à la décarboxylation des acides malique et citrique, présents dans le jus d'ananas. Au cours de la fermentation, ces deux isolats produisent des molécules aromatiques, qui restent cependant encore à déterminer. Le jus fermenté par *W. cibaria* 64 est caractérisé par une odeur et un goût de yaourt alors que le jus fermenté par *Lc. pseudomesenteroides* 12b est caractérisé par un goût piquant et pétillant. Ces caractéristiques organoleptiques sont également retrouvées lorsque du jus frais d'ananas Victoria est fermenté par ces isolats. L'augmentation de l'activité antioxydante et la production de molécules aromatiques pendant la fermentation lactique d'une part et l'augmentation du pH et de la teneur en sucres réducteurs au cours de la conservation d'autre part, justifient une analyse exacte des molécules présentes dans le jus d'ananas fermenté.

Discussion et perspectives générales

La surface des fruits et des légumes est riche en microflore et les bactéries lactiques y sont classiquement rencontrées, bien que minoritaires. La modulation des conditions environnementales par la préparation des matières premières permet d'initier les fermentations de fruits et de légumes. La fermentation lactique, grâce aux propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques, améliore les propriétés sanitaires, organoleptiques et nutritionnelles des fruits et des légumes. La caractérisation des bactéries lactiques présentes à la surface des fruits et des légumes est un bon moyen pour rechercher des bactéries possédant de telles propriétés bénéfiques.

Ainsi, ces travaux de thèse ont visé deux principaux objectifs :

- Caractériser la flore bactérienne lactique présente à la surface de fruits et de légumes cultivés à la Réunion, en particulier les espèces du genre *Weissella*, connues pour être présentes à la surface de fruits et de légumes et impliquées dans des fermentations spontanées, mais encore relativement peu étudiées.
- Inventer des produits fermentés à partir de fruits tropicaux, afin d'en augmenter les bénéfices nutritionnels, d'allonger leur durée de conservation, et de proposer de nouveaux goûts aux consommateurs.

Les fruits et les légumes sont soumis à de nombreux stress physiologiques (aléas climatiques, agression, récolte, variations de température, chocs mécaniques). Ainsi, les microorganismes présents à leur surface doivent s'adapter à ces changements. Les bactéries lactiques sont capables de s'adapter à une multitude d'environnements et sont caractérisées par une grande diversité de métabolismes. Ainsi, nous pensons que la surface des fruits et des légumes pourrait constituer un réservoir naturel d'une grande diversité de bactéries lactiques. Ce projet de recherche a permis d'apporter quelques éléments de réponse à cette hypothèse. Ainsi, 77 bactéries lactiques ont été isolées de papayes, de tomates et d'achards de la Réunion. Nous avons obtenu une grande diversité d'isolats : *Lc. pseudomesenteroides* (25), *Lc. mesenteroides* (7), *Lc. citreum* (14), *Lc. lactis* (1), *L. lactis* (13), *W. cibaria* (4), *W. confusa* (4), *W. soli* (1), *W. paramesenteroides* (1), *Lb. plantarum* (3), *Lb. paraplantarum* (2), *Lb. paralimentarius/kimchii* (1) et *Fb. tropaeoli* (1). Pour certaines espèces, un seul isolat a été obtenu, et ces espèces font partie des espèces les plus rarement retrouvées à la surface des fruits et des légumes. L'analyse génétique par la méthode (GTG)₅ a montré une grande variété

de profils génétiques, et ce au sein d'une même espèce. Ceci peut s'expliquer par des mécanismes d'adaptation à cette niche écologique, conséquence de mutations ou de transferts de gènes [148]. Une étude comparative des génomes de nos isolats avec ceux de souches provenant d'autres environnements serait un moyen efficace pour confirmer cette hypothèse. Des isolats aux profils génétiques différents ont été choisis pour caractérisation phénotypique en termes de conditions de culture : rendement et taux de croissance, tolérance à différents stress environnementaux, production d'EPS, tolérance aux sels biliaries. Parmi les bactéries lactiques, les genres *Lactobacillus* et *Lactococcus* sont les plus décrits et les plus étudiés. Cette attraction vient du fait que certaines bactéries de ces genres, en particulier *Lb. plantarum* et *L. lactis* sont consommées depuis des siècles, domestiquées, et exercent des actions bénéfiques sur l'organisme humain en tant que probiotique. Nous avons souhaité avec ces travaux de recherche, focaliser notre attention sur les espèces du genre *Weissella*, qui selon nous peuvent receler un certain nombre de propriétés intéressantes pour l'élaboration d'aliments fermentés. Les espèces *W. cibaria* et *W. confusa* sont retrouvées dans de nombreux fruits et légumes fermentés, où elles participent à la fermentation avec d'autres espèces des genres *Leuconostoc* et *Lactobacillus* [149]. Notre travail a confirmé la production d'exopolysaccharides par les isolats *W. cibaria* et *W. confusa* comme reportée dans la littérature [150–153]. En plus de leur forte tolérance aux stress environnementaux, ces isolats ont montré une vitesse de croissance élevée et une capacité de croissance à 42-45°C, tout comme les isolats de *Lactobacillus*. Plusieurs isolats comme *W. cibaria* 64, 30, *W. confusa* 59, *Lc. pseudomesenteroides* 60 et *Lb. plantarum* 75 se sont avérés être les plus résistants aux stress environnementaux. Ces résultats démontrent le potentiel technologique de souches du genre *Weissella* et ont permis de mieux connaître la diversité au sein de quelques espèces. Ainsi, nos résultats montrent que les espèces *W. cibaria* et *W. confusa* comportent des souches potentielles pour l'élaboration d'aliments fermentés. Il serait intéressant de vérifier la synthèse de bactériocine par ces isolats, car certaines souches de *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. paramesenteroides* et *W. hellenica* sont capables de produire des bactériocines, appelées Weissellicines [154–157]. Certains de nos isolats de *Lc. pseudomesenteroides* ont montré des propriétés particulières : l'isolat 60 a montré un profil d'adaptation et de croissance similaire aux isolats *Weissella* et *Lactobacillus*, et l'isolat 12b s'est révélé être le plus tolérant aux sels biliaries (0,1 %). L'isolat *W. paramesenteroides* 37 a également montré une bonne tolérance aux sels biliaries. La tolérance aux sels biliaries représente l'une des caractéristiques recherchées pour la sélection de probiotiques. Mais de nombreux autres critères sont

essentiels. Ainsi, il serait essentiel de vérifier que nos isolats ne possèdent pas de gènes de résistance aux antibiotiques et vérifier *in vitro* leur adhérence à des cellules intestinales. L'isolat *Fb. tropaeoli* 77 a été le plus tolérant à une condition de stress oxydant. L'espèce *Fb. tropaeoli* est très peu étudiée, elle a été décrite pour la première fois en 2011 [133] et a été isolée à la suite d'une fermentation spontanée de cacao, avec une souche de *W. fabalis* [158]. Il est intéressant de noter que les genres *Weissella*, *Leuconostoc* et *Fructobacillus* appartiennent à la même famille des *Leuconostocaceae*, et qu'avant d'être classés dans ces genres, certaines espèces de *Weissella* et de *Fructobacillus* étaient classées dans le genre *Leuconostoc*. D'après notre étude, certaines souches de ces genres constitueraient des starters potentiels pour la fermentation de fruits et de légumes, possédant des propriétés intéressantes que l'on ne retrouve pas forcément chez d'autres espèces.

L'utilisation de starters est la voie que nous avons envisagée pour la conception d'un produit fermenté riche en fruits et/ou légumes, en antioxydants et apportant des propriétés nutritionnelles et organoleptiques intéressantes. Nous avons testé la fermentation de différents substrats, à savoir ananas, mangue, papaye et thé, par nos isolats. La fermentation du thé et de la mangue a conduit à une diminution de la teneur en composés phénoliques par certains de nos isolats. Les mécanismes conduisant à cette diminution restent encore à être élucidés et nous pensons que certains composés phénoliques ont pu être oxydés pendant la fermentation, car l'activité antioxydante est restée constante. La fermentation lactique de quatre jus de fruits tropicaux (mangue, carambole, goyave, pitaya) par une combinaison de souches (*Lb. casei*, *Sc. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*) a récemment été reportée [159]. Les bactéries ont montré une très bonne croissance dans les jus de mangue et de goyave. Cependant, la teneur en composés phénoliques n'a pas été déterminée mais les jus ont été fortement appréciés. Il serait intéressant de tester nos isolats sur du jus de mangue et non de la pulpe de mangue.

Notre étude nous montre une toute autre tendance pour les jus d'ananas et la pulpe de papaye. Une augmentation de la teneur en composés phénoliques ainsi que de l'activité antioxydante par plusieurs isolats *W. cibaria*, *Lc. mesenteroides* et *Lc. pseudomesenteroides* a ainsi été observée. Parmi ces isolats, deux ont montré les propriétés les plus intéressantes (augmentation de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante) sur du jus d'ananas : *W. cibaria* 64 et *Lc. pseudomesenteroides* 12b. L'augmentation de la teneur en composés phénoliques pendant la fermentation serait principalement due à la dépolymérisation de composés phénoliques, augmentant ainsi la biodisponibilité de certains composés ce qui est responsable de l'augmentation de l'activité antioxydante [8].

L'augmentation de l'activité antioxydante pourrait être amplifiée par un traitement préalable de la matière première. Par exemple, des traitements d'extraction, comme les ultrasons, les hautes pressions ou les champs électriques pulsés, permettent à la fois de libérer des composés phénoliques et des caroténoïdes et de pasteuriser à froid la matière première. La composition en composés phénoliques du jus d'ananas et de la papaye présente des caractéristiques communes, ces substrats sont riches en acides hydroxycinnamiques (acide férulique, acide *p*-coumarique, acide caféique) et en leurs dérivés glycosidiques [135,141]. Cette composition commune suggère que *W. cibaria* 64 et *Lc. pseudomesenteroides* 12b sont capables de métaboliser ces types de composés phénoliques et nous renseigne sur les enzymes potentiellement impliquées. Ainsi, nous pensons que ces isolats possèderaient les enzymes β -glucosidase, féruloylestérase et PAD, qui seraient à l'origine de la libération de nouveaux composés. La β -glucosidase hydrolyserait les liaisons β -glycosidiques présentes dans les dérivés glycosidiques, entraînant ainsi la libération d'unité glucose (ou autres sucres) et les acides hydroxycinnamiques. L'acide férulique peut être également libéré par la féruloylestérase à partir d'esters d'acides féruliques. De plus, les acides hydroxycinnamiques peuvent être décarboxylés par la PAD en leurs dérivés vinyl (**Figure 24**). La comparaison de la composition des jus fermentés et non fermentés par des outils de métabolomique permettrait de mieux comprendre comment l'activité antioxydante est modulée par l'action des bactéries lactiques. Cette étude serait un préalable pour étudier l'expression de gènes et l'activité d'enzymes impliquées dans ces changements.

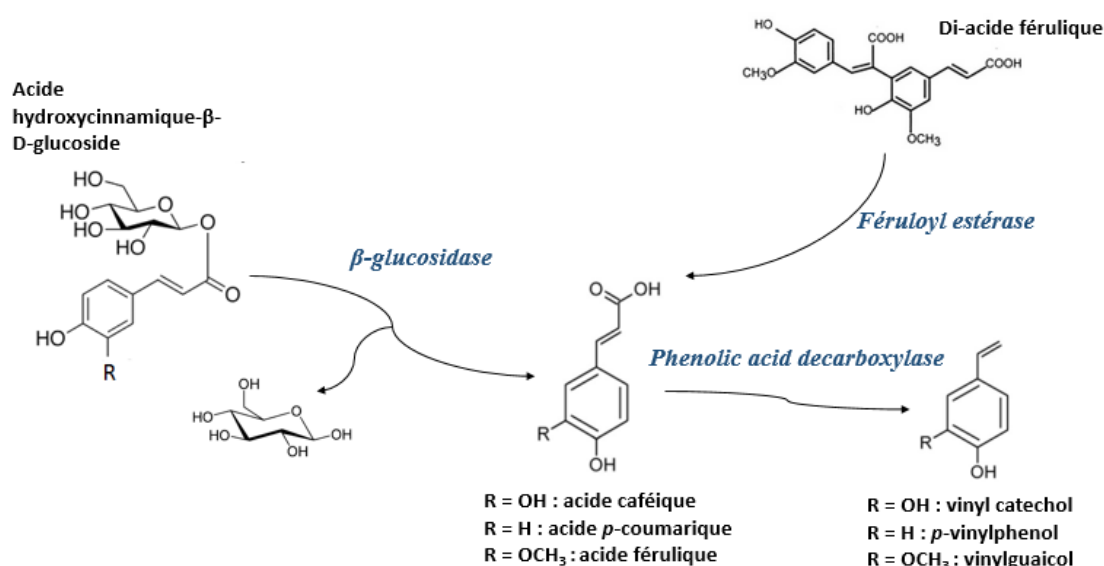


Figure 24: Métabolisme enzymatique potentiellement impliqué dans la libération de composés phénoliques au cours de la fermentation lactique de jus d'ananas

En parallèle des effets sur l'activité antioxydante, la diminution de la teneur en sucres dans le produit constitue un véritable ajout en terme de qualité nutritionnelle notamment pour les personnes diabétiques. Afin de mieux détailler les effets santé de nos jus fermentés, il nous sera nécessaire de les tester sur des modèles de cultures cellulaires soumis à des conditions d'hyperglycémie ou de stress oxydatif. Des études chez l'animal (modèles animaux de diabète) et nutritionnelle chez l'homme lors d'étude de supplémentation, permettrait de préciser le bénéfice de ces boissons dans le cadre de la lutte contre le diabète et l'obésité.

Dans notre étude, nous avons utilisé les starters de façon indépendante. Une autre piste à explorer serait la combinaison de souches dans l'objectif de maximiser leurs effets. Toutefois, le résultat serait difficilement prédictible du fait des interactions possibles entre souches.

Le goût piquant et pétillant détecté dans le jus fermenté par la souche 12b est certainement dû à un métabolisme hétéro-lactique, avec la production de dioxyde de carbone. La synthèse de molécules aromatiques par ces deux isolats indique une autre voie possible de métabolisation, en particulier pour l'odeur et le goût de yaourt détectés avec la souche 64. Plusieurs composés aromatiques présents dans le yaourt ont été décrits : l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acide propanoïque, l'acide acétique, l'acétone, l'acétoïne, l'acide formique, le benzaldéhyde, le diméthyle sulfide et la 2,3-pentanedione [160]. Certaines de ces molécules pourraient être à l'origine de l'odeur et du goût de yaourt détectés dans le jus fermenté par la souche 64.

Selon les acides organiques présents, le goût peut également se retrouver modifié. L'acide lactique, par exemple possède une acidité plus faible que l'acide malique, et la conversion de l'acide malique en acide lactique se traduit par un goût plus sucré en bouche [161].

Les analyses organoleptiques ont montré que les jus fermentés étaient un peu moins appréciés que les jus non fermentés. Des travaux complémentaires de formulation, avec d'autres ingrédients ou par la préparation de smoothies qui conservent les fibres du fruit, sont à présent nécessaires pour aboutir à une boisson très appréciée. Au-delà, l'étude de la perception des consommateurs et des déterminants de l'acte d'achat pour de telles boissons innovantes constituerait un réel plus à nos travaux.

Ainsi ces travaux de thèse ont montré les capacités de certaines espèces de *Weissella*, *Leuconostoc*, *Fructobacillus* et *Lactobacillus* pour des applications sur fruits et légumes. Certaines peuvent être applicables en tant que starters pour la fermentation de fruits et de légumes (64, 30, 60, 75), d'autres en tant que probiotiques (37, 12b, 75), d'autres en tant que cultures en biopréservation (58, 77) et d'autres pour l'obtention d'aliments fonctionnels (64, 12b).