

Du blé au pain, impact de la biodiversité des levains paysans et artisans en panification biologique

Effet des variétés de blé anciennes et modernes
et des pratiques boulangères
sur la biodiversité et l'activité des levains

Résumé de l'article

Cette étude est issue du projet de recherche ANR Bakery (2014-2018) pour lequel l'association Triptolème était partenaire. Au sein d'un panel de boulangers de 40 sites différents, une sélection de 4 types de levain se différenciant par la diversité microbienne des populations levures et bactéries, a été retenue. Les 4 boulangers choisis sur la spécificité de leur levain ont initié 6 levains chefs (L1 à L6), dans leur cadre de travail et avec leurs pratiques, à partir de 6 farines issues d'un mélange de variétés modernes et d'un mélange de variétés de population de blés anciens, cultivés chacun dans 3 terroirs différents. Le but était d'observer l'effet de ces facteurs (boulangier, farine, terroir) sur les caractéristiques des levains élaborés. A partir de ces levains chefs, des levains tout-point ont été préparés pour la mise œuvre d'essais de panification avec un diagramme de référence utilisant les farines de l'étude. L'impact de ces levains au cours de la panification et sur les pains, a été caractérisé par l'observation des propriétés de la pâte et par les mesures d'acidité, de production gazeuse et le dosage de composants chimiques sur les pains.

Rédacteurs :

Bernard Onno Enseignant chercheur en microbiologie et fermentation (Oniris Nantes, membre de Triptolème),

Philippe Roussel Enseignant en Technologie Céréalières (membre de Triptolème),

Elisa Michel, Thèse : Diversité des espèces microbiennes des levains de panification

Delphine Sicard Directrice de Recherche, département Ecologie et diversité microbienne (INRAE Montpellier)

Remerciements : *Cette étude n'aurait pas été possible sans l'engagement des boulangers.es, Michel Perrin, Xavier Dellarmi (Pain Virgule), Hélène Chaudy et Lili Moyses.*

Plan

Préambule	4
Introduction	6
1. Caractérisation de la diversité microbienne des levains des paysans et artisans boulangers du panel boulangers.....	8
1.1. Protocole de caractérisation de la diversité microbienne des levains du panel boulangers	8
1.2. Diversité et densité microbienne des levains du panel boulangers.....	9
1.3. Caractéristiques des levains et pains du panel boulangers.....	12
1.4. Sélection des boulangers expérimentateurs pour l'étude de l'impact des levains en panification	12
2. Protocoles de préparation et de caractérisation des matières premières pour les essais de panification	
2.1. Protocole de mise en culture des blés	13
2.2. Protocole de mise en mouture des blés.....	14
3. Caractérisation des blés et farines.....	15
3.1. Caractérisation du niveau de dureté des blés	15
3.2. Caractérisation de la farine issue de la mouture Astrié	18
3.3. Caractérisation du gluten	20
4. Préparation et caractérisation des levains chefs expérimentaux pour les essais de panification	24
4.1. Suivi des flores microbiennes aux différents stades d'élaboration des levains expérimentaux	26
4.2. Caractérisation des levains expérimentaux.....	28
4.2.1. Dénombrement des flores microbiennes des levains expérimentaux.....	28
4.2.2. Nature des microorganismes présents dans les levains expérimentaux.....	30
4.2.3. Acidité et pH des levains chefs expérimentaux	34
5. Influence de la diversité Blés/farines/levains en cours de panification.....	37
5.1 Protocole des essais de panification	37
5.1.1. Diagramme de fabrication	37
5.1.2. Formule de base de fabrication	38
5.1.3. Grille de notation	39
5.2. Comportement des pâtes en cours de panification.....	40

5.2.1. Observations sur la conduite de la panification.....	40
5.2.2. Caractéristiques physiques des pâtes en cours de panification	41
5.2.3. Approche méthodologique de caractérisation des protéines en cours de panification	45
5.2.4. Suivi de la pousse des pâtes en cours de panification.....	47
5.2.5. Suivi de la production gazeuse en cours de panification.....	48
6. Analyse des pains obtenus à partir des levains expérimentaux.....	50
6.1. Structure alvéolaire des pains.....	50
6.2. Volume des pains	52
6.3. Acidité et pH des pains	54
6.4. Teneur en maltose des pains	56
6.5. Teneur des pains en acides lactique et acétique et Quotient Fermentaire (QF).....	57
6.6. Comparaison des caractéristiques biochimiques des pains par boulanger	61
Conclusion.....	63

Préambule

Cette étude fait partie des différentes expérimentations menées dans le cadre du contrat Bakery financé par l'Agence Nationale de la Recherche (n°ANR-13-ALID-005), piloté par Delphine Sicard et intitulé : « Diversité et fonctionnement d'un écosystème agro-alimentaire «Blé / Homme / Microbiome» à faibles intrants : vers une meilleure compréhension de la durabilité de la filière boulangerie».

La finalité de ce projet Bakery était de mieux comprendre les facteurs de durabilité des pratiques boulangères de cette filière et de vulgariser les connaissances nouvelles pour une meilleure maîtrise de cette durabilité. La mise en place de démarches participatives boulangers/chercheurs a été un point fort du projet pour une meilleure intégration des connaissances.

Résultats majeurs du contrat Bakery (extrait du rapport final)

Les levains naturels des boulangers français hébergent une diversité qui n'avait jamais été décrite auparavant. L'espèce *Lactobacillus sanfranciscensis* domine plus de 90% des levains. L'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, connue comme étant la levure de boulangerie ne domine pas la majorité des levains. De nombreuses autres espèces de levure sont présentes, dont plusieurs du clade des *Kazachstania*. Une nouvelle espèce de levure, *Kazachstania saulgeensis*, a même été découverte. Le genre *Kazachstania* apparaît comme un nouveau groupe d'espèce modèle pour étudier la domestication. La co-occurrence des espèces bactériennes et de levures ne prédit pas la nature des interactions bactéries-levures. Les bactéries et levures des levains peuvent selon les souches coopérer, rentrer en compétition ou être neutre pour l'autre.

Deux groupes de pratiques boulangères se distinguent : les pratiques paysannes et les pratiques artisanales. Ces pratiques influencent la diversité des espèces de levure dans les levains. Maintenir ces deux types de pratiques boulangères permettrait donc de mieux conserver la biodiversité. L'efficacité de systèmes alternatifs de formation et de transfert des savoirs contribuent à augmenter la diversité des pratiques boulangères et des écosystèmes associés.

L'environnement du fournil et le savoir-faire boulanger contribuent majoritairement à la diversité de la flore microbienne des levains. Il existe donc un effet du fournil et du boulanger qu'on pourrait appeler un effet « terroir » du levain. Les profils aromatiques des pains changent avec le terroir des blés et le terroir du levain. Le développement de filière locale pourrait donc promouvoir une diversité des goûts. Au-delà des préoccupations « santé », les consommateurs recherchent le lien social en choisissant de manger du pain au levain naturel. Ceci renforce l'intérêt des filières de productions locales pour maintenir une boulangerie artisanale ou paysanne durable.

La présente synthèse est consacrée à l'**Etude d'impact des levains sur la qualité des pains**. Elle se veut à la fois informative avec des rappels théoriques (extraits du Glossaire des Savoirs / La panification au levain naturel, placés dans des encarts séparés du texte), des éléments des protocoles mis en œuvre et aussi descriptive des résultats obtenus, des observations faites et de leur analyse. Pour présenter ce travail, il a été fait le choix de suivre les étapes de la démarche, en associant à chaque étape, les bases des protocoles d'études mis en œuvre avec les résultats obtenus et leur analyse.

Remarques préliminaires :

- Evolution de la Taxonomie des bactéries lactiques : La dénomination des bactéries lactiques mentionnées dans cet article, a évolué suite à une récente étude dans laquelle une nouvelle classification a été proposée (Zheng J., Wittouck S., Salvetti E. *et al.*, (2020)), Pour des raisons de simplification, le choix a été fait de conserver ici les noms des bactéries lactiques avant cette nouvelle organisation taxonomique.
- Les blés sont issus d'une agriculture à faible intrants et celle-ci relève plus directement des pratiques de Agriculture Biologique même si le label Bio n'a pas été exigé. La panification biologique est associée aux pratiques courantes chez les paysans boulangers et artisans boulangers qui travaillent des blés d'une agriculture biologique. Elle représente également des pratiques boulangères qui reposent sur une fermentation issue de la diversité biologique naturelle des blés et farines et de l'environnement du boulanger sans intrants extérieurs (additifs et auxiliaires technologiques divers ou microorganismes sélectionnés).
- La partie travaux antérieurs et bibliographie n'a pas été détaillée dans cette synthèse, mais peut être consultée dans le travail cité en référence (Michel E. 2018).

Introduction

Le pain est le résultat d'un équilibre entre fermentation et stabilité de la pâte. Les propriétés de la matière première farine dépendent de différents facteurs (pratique culturelle, choix des variétés de blés, mouture, etc.) et peuvent donc être variables. Elles vont influencer les caractéristiques et la stabilité de la pâte. Le boulanger, qui travaille au levain, doit gérer l'activité fermentaire dépendant de la biodiversité microbienne du levain, mais aussi tenir compte d'une diversité biologique liée aux activités enzymatiques issues de la farine et des micro-organismes. Cette étude a pour objectif d'observer et de décrire l'impact de la diversité des blés et des levains sur les caractéristiques des pains.

La démarche mise en œuvre est schématisée Figure 1. La présentation de l'étude associe ensuite les éléments des protocoles et l'analyse des résultats issus des principales étapes :

- Synthèse sur l'étude de diversité microbienne du panel levain et choix des boulangers expérimentateurs ;
- Présentation des protocoles de préparation des blés et farines et leur caractérisation ;
- Démarche d'élaborations des levains expérimentaux par les boulangers sélectionnés et caractérisation des levains ;
- Protocole de panification à partir des levains expérimentaux et caractérisation des pâtes et pains obtenus.

Levain chef

Portion de pâte prélevée issue du levain ou de la pétrissée du jour qui sert de base de départ à la préparation du levain tout point utilisé comme agent fermentaire. La partie restante du levain est conservée, son activité est maintenue de façon régulière par rafraîchis (apport de farine et d'eau).

Levain tout-point

Levain préparé pour assurer la fermentation d'une pétrissée. Par une succession de rafraîchis, on augmente progressivement la quantité de levain à partir d'un levain chef tout en maintenant son activité microbienne en phase optimale.

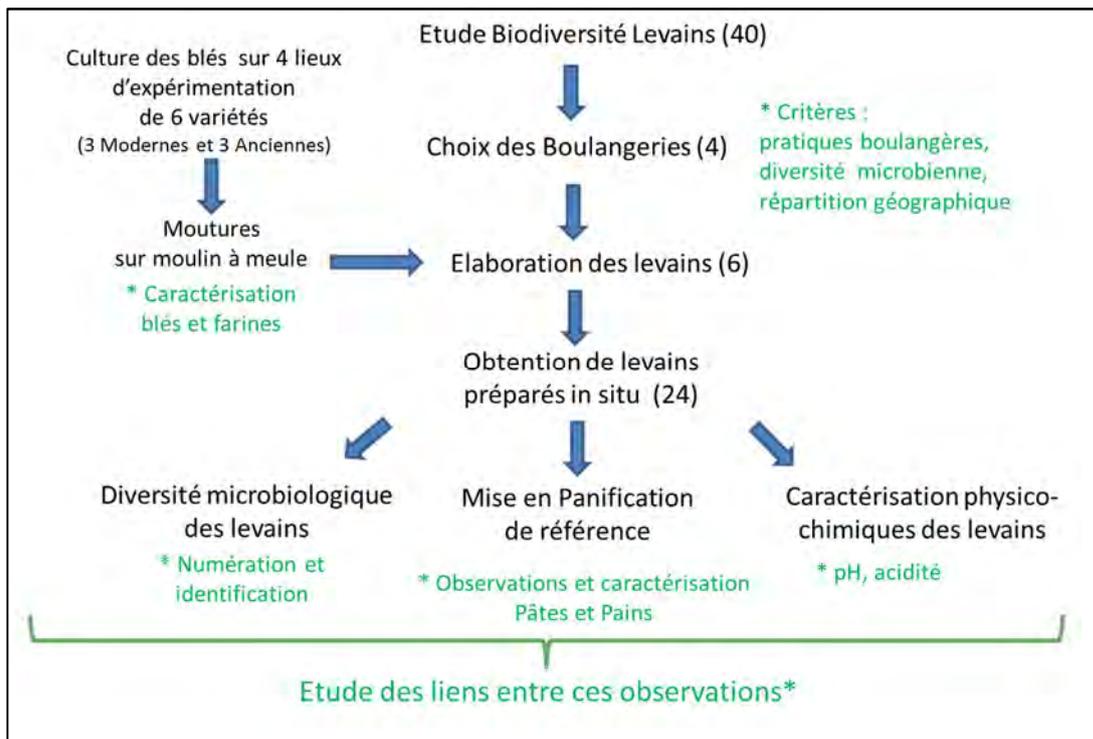


Figure 1 : Dispositif d'expérimentation Bakery - Levains, Blés et Terroirs

Dans un premier temps, une caractérisation de la biodiversité microbienne des levains, sur le territoire français a été menée sur 40 sites différents chez des paysans (16) et artisans boulangers (24) pratiquant de manière exclusive la panification au levain avec des blés issus d'Agriculture Biologique. Il s'agissait de mieux appréhender l'influence des pratiques boulangères et agricoles dans la mise en œuvre et le suivi des levains en panification.

Dans un deuxième temps et au sein de ce panel de boulangers, une sélection de 4 types de levain se différenciant par la diversité microbienne des populations levures et bactéries, a été retenue. Les 4 boulangers choisis sur la spécificité de leur levain se sont portés volontaires pour initier 6 levains chefs (L1 à L6), dans leur cadre de travail et avec leurs pratiques, à partir de 6 farines issues d'un mélange de variétés modernes et d'un mélange de variétés de population de blés anciens, cultivés chacun dans 3 terroirs différents. Le but était d'observer l'effet de ces facteurs (boulangier, farine, terroir) sur les caractéristiques des levains élaborés.

Dans un troisième temps, à partir de ces levains chefs, des levains tout-point (cf. Encarts) ont été préparés pour la mise œuvre d'essais de panification avec un diagramme de référence utilisant les farines de l'étude. L'objectif était de caractériser l'impact de ces levains en cours de panification et sur les pains, par l'observation des propriétés de la pâte et par les mesures d'acidité, de production gazeuse et le dosage de composants chimiques sur les pains.

1. Caractérisation de la diversité microbienne des levains des paysans et artisans boulangers du panel boulangers

1.1. Protocole de caractérisation de la diversité microbienne des levains du panel boulangers

Un **levain** est un écosystème microbien constitué de bactéries lactiques et levures en interactions entre elles et avec le milieu céréalier. Ce milieu est lui-même le siège d'activités enzymatiques endogènes (protéases, amylases...) influencées par les activités microbiennes. Cet écosystème est dit complexe du fait de la diversité des flores microbiennes présentes et des interactions avec le milieu farine qui peut présenter des variations en termes de composition (Figure 2). Il est généralement admis qu'un levain peut contenir 1 milliard de bactéries lactiques et 10 millions de levures par gramme. Un levain est donc à considérer comme un apport d'activité fermentaire dans la pâte mais aussi comme un stade de pré-fermentation d'une fraction de la pâte, avec modification des constituants et de leurs propriétés (apport d'acidité, hydrolyse ou solubilisation des protéines, libération de précurseurs d'arômes...).

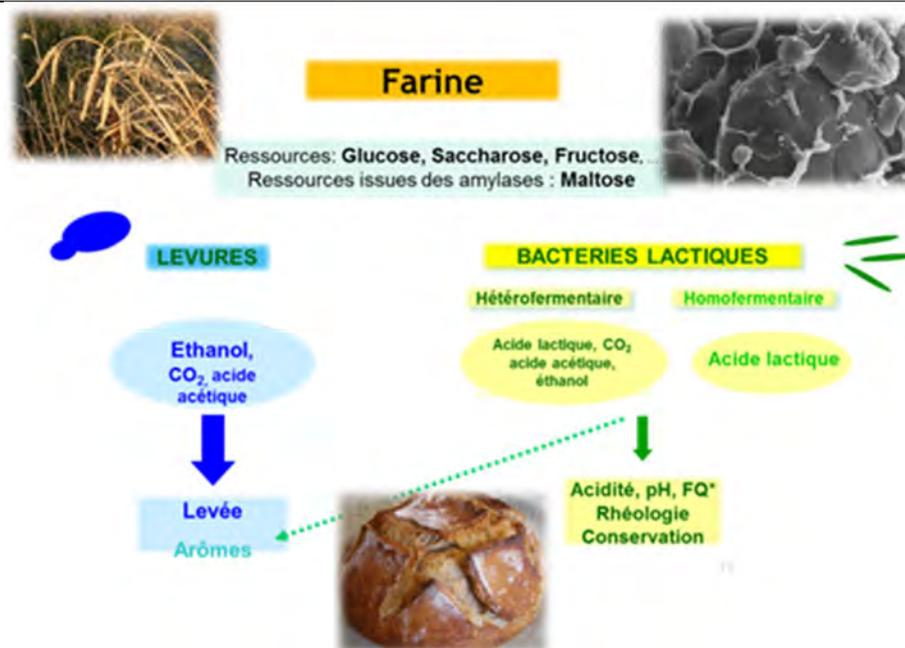


Figure 2 : Les levains, des écosystèmes céréaliers complexes

Le Recueil des Usages des Pains en France, (CNERNA, 1977), indique pour levain : « Pâte en fermentation à réaction acide, provenant au départ d'un mélange de farine et eau, sans apport volontaire de levures et perpétuée à partir de ce mélange, une fois qu'il a subi une fermentation spontanée, par des additions conduites de façon méthodique ». Des travaux et des écrits plus récents (Gobbetti et Gänzle, 2013) ont conduit à la notion d'écosystème microbien complexe pour décrire les levains (cf.Encart et Figure 2).

La caractérisation de la diversité microbienne des levains issue de fermentation naturelle et des métabolites formés en cours de fermentation, se base sur un protocole, résumé Figure 3, d'identification génétique de la microflore des levains à partir de méthode culturale et non culturale et d'analyses physico-chimiques des levains et de pains.

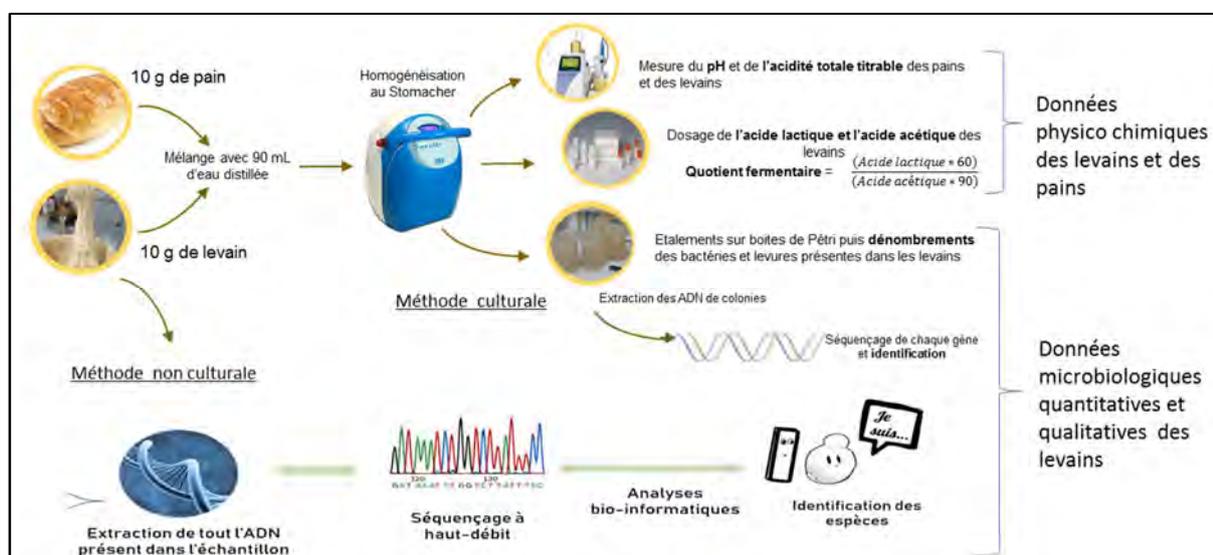


Figure 3 : Processus méthodologique d'analyses physico-chimiques et microbiologiques des levains et des analyses physico chimiques des pains

1.2. Diversité et densité microbienne des levains du panel boulangers

Les résultats concernant la densité des populations microbiennes dans les différents levains du panel boulangers sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I : Dénombrement des bactéries et des levures du panel boulangers (40 levains)
(UFC : Unité Formant Colonies)

Microorganismes	Densité microbienne moyenne	Ecart observés
Levures	$2,16 \cdot 10^7$ UFC/g	$3,58 \cdot 10^5$ à $9,23 \cdot 10^7$ UFC/g
Bactéries Lactiques	$1,23 \cdot 10^9$ UFC/g	$3,60 \cdot 10^5$ à $4,17 \cdot 10^9$ UFC/g

Ces résultats quantitatifs sont en accord avec les données de nombreux auteurs sur les densités moyennes de levures et bactéries lactiques (Onno et Roussel, 1994 ; Gobbetti et Gänzle, 2013). Ils montrent aussi les variations de densité microbienne d'un levain à l'autre : facteur de variation de 1 à 300 pour les levures et de 1 à 10 000 pour les bactéries lactiques (Tableau 1). Le ratio N levures / N bactéries lactiques est compris entre 1 /100 et 66 / 100. L'origine de ces variations quantitatives est liée à la conduite des levains (T°C, fréquence des rafraîchis...) et aussi à la physiologie des microorganismes présents dont certains sont non cultivables en milieu de dénombrement.

Genre

Les espèces sont regroupées en genre. Les espèces qui appartiennent au même genre sont plus proches génétiquement que celles qui appartiennent à des genres différents. Le genre est donné par le premier nom d'une espèce. Par exemple l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* est du genre *Saccharomyces*. L'espèce de blé tendre, *Triticum aestivum*, est du genre *Triticum*.

Espèce

Chez les micro-organismes, une espèce est un ensemble d'individus liés par des liens de parenté proches : ils ont donc un génome (ADN) et des caractéristiques morphologiques et physiologiques très similaires. Chez les bactéries il n'y a pas de reproduction sexuée. Chez les levures, cela dépend des espèces. Quand il y a de la reproduction sexuée, les individus d'une même espèce sont capables de se reproduire entre eux et donner des descendants eux même fertiles.

Souche

Chez les micro-organismes, une souche est en quelque sorte l'équivalent d'une "variété homogène" pour les plantes cultivées.

La diversité des espèces de bactéries lactiques de ces levains a été étudiée (Lhomme et al, 2016, Michel et al, 2016). Parmi les 19 espèces de bactéries lactiques identifiées dans l'ensemble des levains, *Lactobacillus sanfranciscensis* est confirmée comme espèce

prédominante. Pour les levains issus des paysans boulangers 5 espèces ont été retrouvées dont 2 espèces spécifiques à ces levains (*L. brevis*, *L. paralimentarius*). En ce qui concerne les artisans-boulangers, 17 espèces ont été retrouvées dont 14 espèces spécifiques à ces levains. Par levain, de 1 à 5 espèces de bactéries lactiques sont identifiées. Il n'apparaît pas de lien entre diversité et répartition géographique des levains

Ces principaux résultats sont en accord avec les données de la littérature. Les différences observées ici, entre levains des paysans boulangers et des artisans boulangers, méritent cependant d'être mentionnées.

Pour les levures, 766 souches (cf. encart ci-dessus) ont été identifiées et 40 levains tout point analysés par métabarcoding (cf. encart ci-dessous). Pour les paysans boulangers, le nombre d'espèces est de 8 et de 10 chez les artisans boulangers bio au levain. Par levain, 1 à 3 espèces dominantes sont identifiées. Trois espèces majoritaires sont présentes : *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania humilis*, *Kazachstania bulderi*.

Il est observé un effet des pratiques boulangères. En effet, *K. bulderi* est fréquente chez les paysans boulangers et *K. humilis* fréquente chez les artisans-boulangers. Le genre *Kazachstania* constitue un nouveau modèle pour étudier l'évolution des levures et réfléchir à la conservation de la biodiversité. Il est à noter l'identification d'une nouvelle espèce *Kazachstania saulgeensis*, et la présence de deux espèces récemment découvertes dans d'autres environnements

Métagénétique

La méta-génétique est une méthode culture indépendante pour caractériser la diversité des **espèces** microbiennes d'un **écosystème**. On dit qu'elle est culture indépendante car elle ne nécessite pas d'isoler des souches de **bactéries** ou de **levures** une à une du levain. L'ADN est extrait directement du levain et donc de toutes les espèces microbiennes du levain en même temps. Un gène ou une région d'un gène est ensuite amplifié et séquencé à partir de cet ADN. On obtient ainsi un grand nombre de séquences qui proviennent des différentes espèces microbiennes du **levain**. Ces séquences sont assignées à des espèces sur des bases de données, ce qui permet de connaître la composition en espèce du levain.

1.3. Caractéristiques des levains et pains du panel boulangers

Les résultats obtenus sur les caractéristiques d'acidité des pains du panel font apparaître de fortes variations des valeurs de pH et de teneur en acide acétique (Tableau II).

Tableau II : pH des levains, pH et teneur en acide acétique des pains du panel boulangers

	pH des levains	pH des pains	Acide acétique des pains (ppm ou mg/kg)
Valeur moyenne	3,80	4,48	740
Ecart observés	3,54 et 4,03	3,91 et 4,85	420 et 1200

Les valeurs obtenues ne respectent pas toujours les préconisations du décret pain 1993. En effet, celui-ci dans sa version modifiée pour les pains au levain, précise que le pain au levain de tradition française doit avoir un pH < 4,3 et une quantité d'acide acétique > 900 ppm (mg/kg). Ces résultats pointent ici encore les limites de ce texte réglementaire.

1.4. Sélection des boulangers expérimentateurs pour l'étude de l'impact des levains en panification

L'analyse de la diversité microbienne et des pratiques boulangères a permis de faire une sélection de 4 boulangers (B1, B2, B3, B4) bio au levain bien distincts par la flore dominante des microorganismes présents dans leurs propres levains (Tableau III), et également par leur genre, leur activité et leur terroir : un paysan (B1, département 86), un artisan (B2, département 44), une paysanne (B3, département 28), une artisane (B4, département 68). Aucun de ces boulangers-ères n'utilise de levure de boulangerie.

Tableau III : Caractéristiques microbiologiques des levains maison ou d'usage des boulangers expérimentateurs (B1, B2, B3, B4) obtenues par microbiologie classique à partir des souches cultivées et isolées du levain (Urien et al. 2019 ; Michel et al. 2016 ; Michel et al. 2018)

Boulangers	Principales espèces de microorganismes des levains	
	Principales espèces de levures (<i>K.:</i> <i>Kazachstania</i> , <i>S.:</i> <i>Saccharomyces</i>)	Principales espèces de bactéries lactiques (<i>L.:</i> <i>Lactobacillus</i>) En gras : espèces hétérofermentaires obligatoires En non gras : hétérofermentaires facultatives
B1	<i>K. saulgeensis</i> (97,5%), <i>S. cerevisiae</i> (2,5%)	<i>L. sanfranciscensis</i> (100%)
B2	<i>K. bulderi</i> (100%)	<i>L. sakei</i> (46%), <i>L. sanfranciscensis</i> (54%)
B3	<i>S. cerevisiae</i> (96%), <i>K. unispora</i> (4%)	<i>L. curvatus</i> (90%), <i>L. plantarum</i> (10%)
B4	<i>S. cerevisiae</i> (91%), <i>Kazachstania sp.</i> (9%)	<i>L. brevis</i> (69%), <i>L. plantarum</i> (15%), <i>L. sanfranciscensis</i> (8%), <i>L. paralimentarius</i> (8%)

2. Protocoles de préparation et de caractérisation des matières premières pour les essais de panification

2.1. Protocole de mise en culture des blés

Les blés ont été semés en automne 2014, récoltés en juillet 2015 chez 4 agriculteurs (lieux d'expérimentation). On distingue les 3 populations de blés - population de Redon, population de Saint Priest et population Bladette cultivées sur 3 terroirs - et les 3 variétés modernes (Chevalier, Renan, Pirénéo,) cultivées sur 3 terroirs. Les populations de blés anciens issues d'un même terroir sont mélangées à part égales, pour constituer un Mélange Ancien associé à un terroir, l'opération est répétée pour les deux autres terroirs. La même démarche est effectuée pour les variétés modernes dans la constitution des Mélanges Modernes.

La description et la codification des matières premières sont détaillées dans le Tableau IV.

Tableau IV : Identification des blés et farines destinés aux essais de panification (MA Mélange Ancien, MM Mélange Moderne)

Mise en culture		identification		
Lieux d'expérimentation	Classification	Mélanges variétaux	Farine (mouture Astrié)	Levain Chef
GS (35)	Mélange Ancien	GSMA	F1	L1
LA (35)	Mélange Moderne	LAMM	F2	L2
FM (49)	Mélange Ancien	FMMA	F3	L3
GS (35)	Mélange Moderne	GSMM	F4	L4
LA (35)	Mélange Ancien	LAMA	F5	L5
LM (53)	Mélange Moderne	LMMM	F6	L6

2.2. Protocole de mise en mouture des blés

Le triage des blés après récolte a été réalisé soit chez l'agriculteur au nettoyeur-séparateur ou soit à l'INRA (colonne à air) complété par un triage optique chez un agriculteur.

La conservation des blés avant mouture s'est faite, soit chez l'agriculteur, sous hangar, soit à l'INRA, en chambre sèche à 20-25 °C jusqu'à fin octobre puis à 10 °C.

Pour la mouture des blés, les Mélanges Anciens (MA) et les Mélanges Modernes (MM) ont été livrés sur un même site, chez un des boulangers sélectionnés. Les moutures, en un seul passage, sur meule de type Astrié de diamètre de 50 cm (Figure 4), se succèdent en alternant les Mélanges Anciens et Modernes ; les blés n'ont pas été humidifiés avant mouture. Le tamisage a été réalisé dans une bluterie d'ouverture de maille du tamis de 300 µm ; après chaque mouture, la bluterie a été nettoyée par aspiration. Les lots de farine sont ensuite ensachés (Figure 5).

		
Figure 4 : Moulin Astrié	Figure 5 : Echantillonnage des farines	Figure 6 : Mise en palette des échantillons

La préparation des échantillons a été organisée de façon à assurer la régularité et la traçabilité des échantillonnages tout au long du processus par chaque boulanger. Chaque palette (Figure 6), destiné aux 4 boulangers, contient :

- 12,5 kg pour chacune des 6 farines, en sac de 5 et 2.5 kg, numérotés de 1 à 6;
- 6 seaux avec couvercles pour initier et entretenir les 6 levains pendant 3 semaines ;
- 6 petits seaux avec couvercles et étiquettes pour mettre 1 kg de chef ;
- des flacons stériles pour tous les prélèvements.

3. Caractérisation des blés et farines

3.1. Caractérisation du niveau de dureté des blés

Dureté des blés

Tous les blés utilisés sont des blés tendres, de l'espèce *Triticum aestivum*. Parmi les variétés de blé tendre, on peut séparer les blés selon la dureté de leur grain. Cette caractérisation qualitative avait comme objectif de bien identifier les caractères « Soft » et « Hard » des Mélanges Anciens et Modernes qui sont apparus avec l'évolution génétique des blés. La dureté dans l'échelle de valeurs de la méthode officielle est basée sur un taux d'extraction en farine après une mouture sur un broyeur sélectionné (broyeur KT). Par le profil granulométrique et la dimension moyenne des grains de farine, on obtient une image plus qualitative de la répartition dimensionnelle des particules.

Du point de vue technologique, l'analyse du niveau de dureté permet de répondre à la question de préparation des blés à la mouture. Le caractère « hard » des blés justifie une humidification du blé de façon à permettre une bonne séparation des enveloppes du grain de l'albumen amylicé et limiter la friabilité des enveloppes pour éviter une variation qualitative des farines. En effet une friabilité des enveloppes conduit à obtenir dans la farine des fragments de cette partie histologique du grain en quantité plus importante. Les enveloppes sont mieux dissociées de l'albumen et donnent des sons plus gros. La présence de ces enveloppes dans la farine, est appréhendée par la teneur en cendres.

La méthode de mesure de la dureté retenue, s'est basée sur l'étude de Triptolème, (Triptolème, 2017-1) qui a permis de valider un protocole simple de mouture pour obtenir des profils granulométriques de farine semblables à ceux obtenus sur mouture meule Astrié et sur mouture cylindres de laboratoire « Chopin ». Dans notre étude (Tableau V) la caractérisation granulométrique s'est faite en granulométrie laser « mastersizer 2000 ». Le broyage du blé a été réalisé sur moulin à café manuel de 25 g ± 0,1 g. Le taux d'extraction de la farine extraite sur tamis de 180 µm est, en moyenne, de 19,5 % pour les Mélanges Modernes et 23,5 % pour les Mélanges Anciens.

Tableau V : Caractéristiques granulométriques des farines de blé issues du test de dureté des grains (granulométrie laser) (MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien en grisé)

Codes mélanges variétaux	Teneur en eau (%)	Diamètre moyen des particules de farine (µm)	d (0.1) *	d (0.5) *	d (0.9) *
F1 (GSMA)	12,92	56,1	7,9	35,2	134,3
F2 (LAMM)	13,57	68,0	11,7	53,3	146,9
F3 (FMMA)	14,84	54,6	8,0	34,2	130,7
F4 (GSMM)	13,24	60,6	10,2	42,6	137,6
F5 (LAMA)	12,93	58,0	8,2	37,1	138,0
F6 (LMMM)	15,15	66,5	12,0	49,9	145,9
Moyenne MA	13,6 ±0,9	56,2 ±1,4	8,03 ±0,1	35,5 ±1,2	134,3 ±3,0
Moyenne MM	14,0 ±0,8	65,0 ±3,2	11,30 ±0,8	48,6 ±4,5	143,5 ±4,2

* diamètre (d) en dessous duquel se situe 10%, 50 % et 90 % des particules caractérisées par leur volume

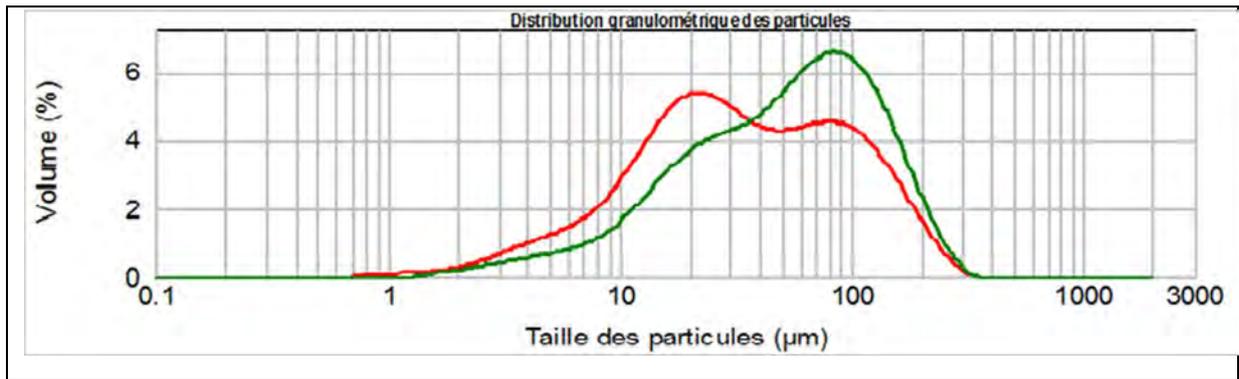


Figure 7 : Profil granulométrique d'un mélange de variétés anciennes (LMM en rouge) et d'un mélange de variétés modernes (LMA en vert)

La grosseur moyenne supérieure des particules (Tableau V et Figure 7) et le profil à tendance monomodal des courbes de granulométrie pour les Mélanges Modernes (courbe verte) par rapport aux Mélanges Anciens, de grosseur moyenne plus fine et au profil à tendance bimodal des courbes (courbe rouge), permettent de confirmer le caractère hard plus marqué, des mélanges modernes. On peut qualifier respectivement de médium soft, la courbe rouge et de médium hard, la courbe verte, en considérant une échelle de dureté entre le « très soft » et « très hard » (Triptolème, 2017-1).

En technologie meunière, lorsque le niveau de dureté augmente, l'aptitude du grain à se fragmenter sous forme de farine est moins bonne, la granulométrie est plus élevée. Cette caractéristique du grain est corrigée partiellement en l'humidifiant pour en faciliter sa réduction. Pour cette étude, les écarts modérés du niveau de dureté entre les Mélanges Modernes et Anciens et la teneur en eau en moyenne plus élevée des Mélanges Modernes (Tableau V), nous ont conduit à ne pas humidifier les grains pour la mouture des blés destinés à la panification.

3.2. Caractérisation de la farine issue de la mouture Astrié

Tableau VI : Caractéristiques des farines destinées aux essais de panification (MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien en grisé)

Codes des Farines des mélanges variétaux	Taux d'extraction (%)	Teneur en eau (*) (%)	Teneur en cendres (%) (**)	Taux d'amidons endommagés (***) (UCD)****
F1 (GSMA)	83- 85	12,8	0,69	20,2
F2 (LAMM)	83- 85	12,7	0,69	24,85
F3 (FMMA)	83- 85	12,8	0,8	21,8
F4 (GSMM)	83- 85	13,0	0,8	22,25
F5 (LAMA)	83- 85	13,0	1,0	21,33
F6 (LMMM)	83- 85	13,1	0,7	25,4
MA (F1, F3, F5)	-	12,9 ±0,1	0,83 ±0,13	21,1 ±0,7
MM (F2, F4, F6)	-	12,9 ±0,2	0,73 ±0,05	24,2 ±1,4

(*) Norme NF V03 707, (**) Norme NF V03 720, (***) Norme NF V03 731, (****) Unité Chopin Dubois

Les rendements ou taux d'extraction obtenus pour un type 80 sont dans la même fourchette que ceux obtenus par Triptolème (2017-2) dans le contrat de recherche PaysBlé avec ce type de moulin.

Les teneurs en cendres se situent entre les types 65 et 110 (Tableau VI) et de manière aléatoire entre les Mélanges Anciens et Modernes. Les moyennes et les écarts types ne permettent donc pas de distinguer ces mélanges; chaque valeur est le résultat d'une moyenne sur deux prélèvements de 2 g et montre une bonne répétabilité. Compte tenu de la fiabilité de la mouture Astrié et de l'influence de la dureté sur ce facteur qui donne des teneurs en cendres souvent supérieures pour les variétés modernes par rapport aux variétés de population anciennes, il reste une incertitude dans le prélèvement

d'échantillon. En effet cette mesure est très impactée par des effets de classement des particules dans un lot. Les particules issues de la périphérie du grain moins denses se séparent assez facilement des particules de l'albumen et se positionnent plutôt en partie supérieure du conditionnement qui aurait justifié la mise en œuvre d'un protocole ré-homogénéisation du lot avant analyse. Le taux d'amidons endommagés est plus élevé avec les Mélanges Modernes par rapport aux Mélanges Anciens (Tableau VI). Ces résultats sont conformes aux relations établies entre cette mesure et la dureté de l'albumen des blés. En effet, plus le grain est dur et plus il offre une résistance à son passage entre les deux meules et moins il se fragmente facilement ; les zones de cassures se produisant de manière plus aléatoire y compris dans les grains d'amidon.

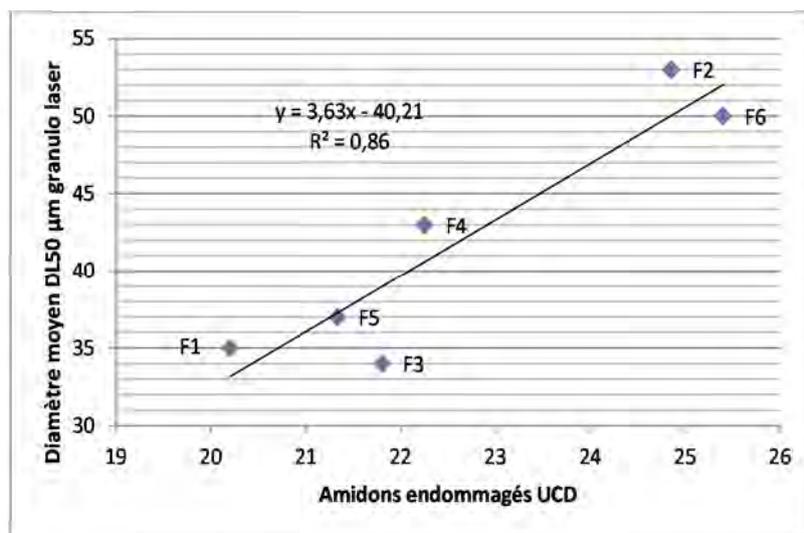


Figure 8 : Relations entre granulométrie des farines (analyse sur blé) et taux d'amidons endommagés des farines (mouture Astrié)

Il existe par voie de conséquence une relation (Figure 8) entre granulométrie amidons endommagés et catégories des variétés (Mélanges Modernes et Mélanges Anciens), expliquée en chapitre 3.1. Ces résultats sont conformes aux résultats antérieurs, issus du contrat PaysBlé (Triptolème 2017-2).

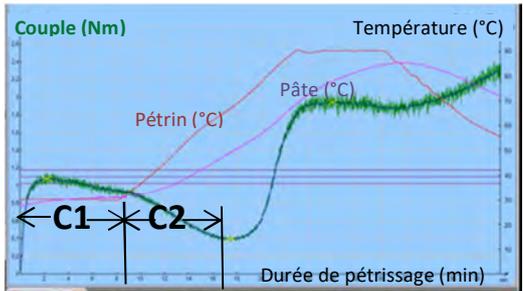
3.3. Caractérisation du gluten

Le terme « **gluten** » tient son origine du latin « glutinum » qui signifie lien, ou colle et, seules les protéines du blé (gliadines et gluténines) ont cette propriété de s'associer ou de se coller ensemble fortement en présence d'eau. Le gluten n'existe pas en tant que tel dans la farine, il se forme en présence d'eau dans la pâte. Le gluten du blé assure ainsi la formation d'une structure continue protéique qui est capable de retenir des gaz de fermentation permettant la levée de la pâte dans la fabrication du pain. Cette propriété donne au blé le qualificatif de panifiable.

Le gluten de blé est une association complexe, élastique et variable de protéines de hauts poids moléculaires en milieu hydraté, formée par :

- des liaisons polaires ou hydrophiles (avec l'eau) ;
- des interactions hydrophobes (avec les matières grasses) ;
- des liaisons ioniques, certains atomes étant chargés électriquement + et - (liaisons avec les éléments chargés comme le sel ou les acides...) ;
- des liaisons d'oxydation entre molécules de cystéine (liaisons à forte énergie).

La diversité des types de protéines et des liaisons entre ces protéines contribuent à donner des caractéristiques qualitatives différentes aux pâtes boulangères. Le gluten voit sa résistance élastique et son extensibilité diminuer par des composés réducteurs et par son hydrolyse liés aux activités des protéases de la farine, phénomènes qui se produisent de manière très significative dans les levains de panification. Il perd définitivement son aptitude à la déformation au moment de la coagulation thermique en cours de cuisson.

		
<p>Figure 9 : Lixiviation manuelle pour extraction du Gluten Humide (GH)</p>	<p>Figure 10 : Centrifugeuse (Glutomatic) avec tamis pour la détermination du Gluten Index (GI)</p>	<p>Figure 11 : Courbe (vert) de résistance (Nm) d'une pâte au Mixolab, en fonction de la température (C2 = moyenne de résistance entre 30°C et 60°C)</p>

L'extraction du Gluten Humide (GH) de la pâte s'est faite manuellement (Figure 9) sur la base de la méthode ITCF (1972), mieux adaptée pour les farines riches

en fibres, que l'appareil Glutomatic (Figure 10). Pour une proportion d'eau de 50 % par rapport à la farine, les pâtes formées à la main, avec les Mélanges Modernes ont demandé plus d'énergie et plus de travail pour l'agglomération compte tenu de leur capacité de fixation d'eau plus forte. Les résultats font apparaître une teneur (proportion exprimée par rapport à la farine) en gluten humide supérieure avec les Mélanges Anciens par rapport aux Mélanges Modernes (Tableau VII). Dans les conditions expérimentales appliquées, les Mélanges Anciens conduisent à une agrégation rapide et donc l'obtention d'un gluten homogène, bien lié ; avec les blés modernes, on observe une masse de gluten hétérogène et peu extensible.

La mesure du Gluten Index (GI) au Glucomatic (Figure 10) intègre les capacités du gluten humide de passage forcé, par centrifugation à travers un tamis. Lorsque le taux de passage est important, l'index tend vers la valeur 0. Inversement pour un passage impossible, l'index prend la valeur 100, il est lié à un fort niveau d'agrégation, signe d'une résistance élastique élevée. Les qualificatifs « mou », « moins agrégatif » sont souvent associés à des glutens index faibles. Les valeurs de Gluten Index (GI) sont inférieures pour les Mélanges Anciens (Tableau VII). Il a été noté aussi lors de la centrifugation une perte en eau plus importante avec les Mélanges Anciens par rapport aux Mélanges Modernes.

Le Mixolab a été choisi pour obtenir des informations supplémentaires sur la résistance de la pâte et donc indirectement sur le gluten, au cours d'un pétrissage à différentes températures. La formation de la pâte est réalisée à une température de 30 °C et pour un couple résistant C1 constant par ajustement de l'hydratation. La valeur du couple C2 (Figure 11) a été retenue

car elle traduit un affaiblissement du réseau de gluten après sa formation au pétrissage sous l'effet de la température (entre 30 et 60 °C) et avant le phénomène d'épaississement de la pâte par gélatinisation à partir de 60 °C. Le couple C2 est plus faible avec les Mélanges Anciens (Tableau VII), ce qui traduit une plus faible résistance du gluten dans la zone de température de 30 à 60 °C. Le fractionnement des protéines et leur séparation en méthode chromatographique (HPLC) permet de faire apparaître pour les gluténines (fractions à très hauts poids moléculaires) une proportion supérieure aux gliadines avec les Mélanges Modernes : cela se traduit par un rapport gluténines/gliadines plus élevé. Ces résultats permettent de conforter le constat des professionnels d'une plus grande résistance élastique des pâtes avec les blés modernes par rapport aux variétés anciennes.

L'ensemble des données physico-chimiques sur les mélanges de variétés de population anciennes et modernes permettent de bien les distinguer par les méthodes analytiques retenues. Les résultats obtenus donnent pour les Mélanges Anciens, par rapport aux Mélanges Modernes :

- une dureté de l'albumen du grain plus faible ;
- un taux d'amidons endommagés, par conséquence, moins élevé ;
- une granulométrie de farine plus fine ;
- un taux de protéines en moyenne supérieur et un taux de gluten plus élevé ;
- un niveau de résistance du gluten et de la pâte de farine inférieur.

Ces observations vont dans le sens de celles enregistrées dans le contrat PaysBlé (Tripto, 2017-2).

Tableau VII : Caractéristiques des protéines des blés et farines destinées aux essais de panification. (MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien en grisé)

Mélange Variétal (*)	Protéines sur blé	Hagberg sur blé (**)	Farines (***)	Chromatographie en HPLC			Dosage du gluten		Résistance pâte au pétrissage
	% sur Matière sèche	Temps de chute (s)		% Gliadines	% Gluténines	Rapport Glut/Glia	Gluten Humide (%) ****	Gluten Index (%) *****	couple C2 (N.m) *****
GSMA	11,3	386	F 1	43,2	38,8	0,9	26,0	44	0,32
LAMM	10,2	363	F 2	40,3	41,3	1,02	20,0	89	0,48
FMMA	12	402	F 3				29,3	39	0,36
GSMM	10,7	385	F 4	40,1	41	1,02	18,7	87	0,38
LAMA	12	412	F 5	43,6	38,9	0,89	28,4	62	0,31
LMMM	12	405	F 6				25,5	64	0,51
Moyenne MA	11,77 ±0,3	400,00 ±10,7		43,40 ±0,2	38,85 ±0,05	0,90 ±0,01	27,90 ±1,4	48,33 ±9,9	0,33 ±0,02
Moyenne MM	10,97 ±0,75	384,33 ±17,15		40,20 ±0,1	41,15 ±0,15	1,02 ±0,0	21,40 ±2,95	80,00 ±11,3	0,46 ±0,06

(*) GS, LA, LM : identification terroir ; MA, MM : mélange variétés anciennes et modernes

(**) Norme NF V03 703 indice de viscosité en lien avec l'activité amylasique des blés (plus la valeur en secondes est élevée et plus l'activité est faible, les valeurs de référence se situent entre 250 et 300 s)

(***) Farine extraites des mélanges variétaux en mouture Astrié

(****) Extraction manuelle, protocole ITCF, 1972, (Figure 9)

(*****) Norme ISO 7495, Glutomatic Perten, (Figure 10)

(******) Norme NF V03 765, Mixolab Chopin, (Figure 11)

4. Préparation et caractérisation des levains chefs expérimentaux pour les essais de panification

La mission des boulangers sélectionnés (B1, B2, B3, B4) était d'initier et d'entretenir des levains selon les pratiques propres à chaque boulanger en respectant des recommandations, mentionnées dans la fiche de suivi, pour éviter une contamination entre les levains (bacs et mains propres), mais identiques pour les 6 farines (F1 à F6). Chaque boulanger a trouvé sur sa palette (Figure 6), 12,5 kg de chaque farine, des seaux pour initier et maintenir et rafraîchir les levains, des « pots à levain » pour le rapatriement, une feuille de suivi des levains (dates, recette...) et des tubes de prélèvements pour le suivi analytique (Figure 3).

Le démarrage des levains sur une période de 3 semaines, a été effectué avec des paramètres différents selon les boulangers. Parallèlement, une série témoin de levains (B5) a été élaborée en condition de laboratoire. Les principaux facteurs ont résumés dans le Tableau VIII. Le nombre de rafraichis a varié de 5 à 13. Le délai entre chaque rafraichi a été, selon les cas, de moins de deux par semaine à au moins quatre par semaine. Les températures moyennes de stockage pendant la période d'élaboration des levains ont également été variables d'un boulanger à l'autre. La quantité moyenne de farine mise en œuvre a différencié selon les boulangers, ainsi que l'hydratation des levains entre 81 et 100 % sur base farine. Enfin, la quantité de levains reprise à chaque rafraichi est soit constante au cours du temps (ex : 50% pour B1 et B2) ou évolutive (B2 et B3). Ce paramètre a une incidence en particulier sur le niveau d'acidité moyen du levain au cours du temps, un fort taux de levain conduit a priori à des conditions plus acides. Il est rappelé qu'il n'y avait pas utilisation de levure de boulangerie dans ces 4 fours.

Tableau VIII : Elaboration des levains, synthèse des pratiques de rafraichis par boulanger

	B1	B2	B3	B4	B5*
Nombre total de rafraichis	5	7	9	10	13
Nombre moyen de rafraîchis / semaine	<2	<3	~3	>3	>4
Hydratation de démarrage (% sur base farine)**	100	86	100	88	100
Moyenne farine (g) par rafraîchi	433	200	646	566	200
Moyenne Hydratation (% base farine)	100	81	81	85	100
Température moyenne de fermentation (°C)	14°C	23°C	12h 24°C puis 48h 8°C	21°C	20°C
Quantité de levain lors du rafraichi (% /total pâte)***	50%	50 à 35%	20 % puis 10%	50%	30%

*B5 : Série Témoin levains élaborés en laboratoire

**% sur base farine : quantité d'eau mise en œuvre rapportée à la farine sur une base 100

*** Soit quantité constante, soit évolution au cours des rafraichis

Le protocole de prélèvements d'échantillons pour les analyses s'est organisé sur les 3 semaines définies pour l'élaboration des levains chefs (J_0 , S_1 , S_2 , S_3). Le jour d'initiation des levains (J_0) et chaque fin de semaine (S_1 , S_2 , S_3), deux échantillons par levain étaient prélevés et tous congelés sauf pour S_3 . De plus, 2 prélèvements du levain maison (LM) ont été pratiqués au début et à la fin de l'élaboration des levains pour évaluer leurs variations potentielles, pendant l'expérimentation. L'acheminement, vers les laboratoires d'analyses, des échantillons congelés ou frais, a été effectué en conditions isotherme, le même

jour, en fin de S₃, pour les 4 boulangers. Un échantillon des levains S₃ a été directement analysé pour son contenu en levures et bactéries. Un échantillon des prélèvements de chaque levain a été conservé à -80 °C pour les analyses microbiologiques et biochimiques ultérieures. Les levains S₃ ont été utilisés pour les panifications expérimentales.

4.1. Suivi des flores microbiennes aux différents stades d'élaboration des levains expérimentaux

L'analyse par métagénomique (cf Encart §1.2) porte sur l'implantation des différents genres et espèces de bactéries et de levures au cours de l'élaboration des levains, du grain au levain. Cette analyse est effectuée par méthode non culturale à partir de l'ADN extrait des échantillons et séquençage haut débit de gènes spécifiques aux bactéries d'une part et aux champignons dont font partie les levures, d'autre part. Les résultats d'abondance relative des genres identifiés sont présentés Figure 12.

Au stade grains, il semble y avoir peu de différences entre les 36 échantillons analysés, ni entre les variétés de blé, ni selon les terroirs (données non montrées). Au stade Farines, 24 lots ont été préparés à partir de mélange de blés et là encore, les mêmes genres au niveau bactéries et champignons se retrouvent dans ces échantillons, sans effet variétés, ni terroirs.

Au stade levains, le suivi s'est déroulé de l'élaboration J0 et pendant trois semaines (S1, S2, S3). Progressivement des flores majoritaires apparaissent.

Pour les bactéries, il s'agit du genre *Lactobacillus* (couleur bleu foncé). Ce genre devient progressivement dominant dans l'ensemble des levains en S3. Les genres (*Pseudomonas*, *Bacillus*, notamment, couleur rouge et rose) présents dans les grains et la farine disparaissent au cours du temps. Le genre *Lactobacillus* est présent mais en très faible proportion dans les farines.

A noter que les 6 échantillons de B1 (à gauche à chaque stade) présentent une flore bactérienne différente des autres échantillons (aux stades S2 et S3 notamment), avec plus de genres bactériens présents à 3 semaines, en raison probablement du faible nombre de rafraichis (5) pour ce boulanger.

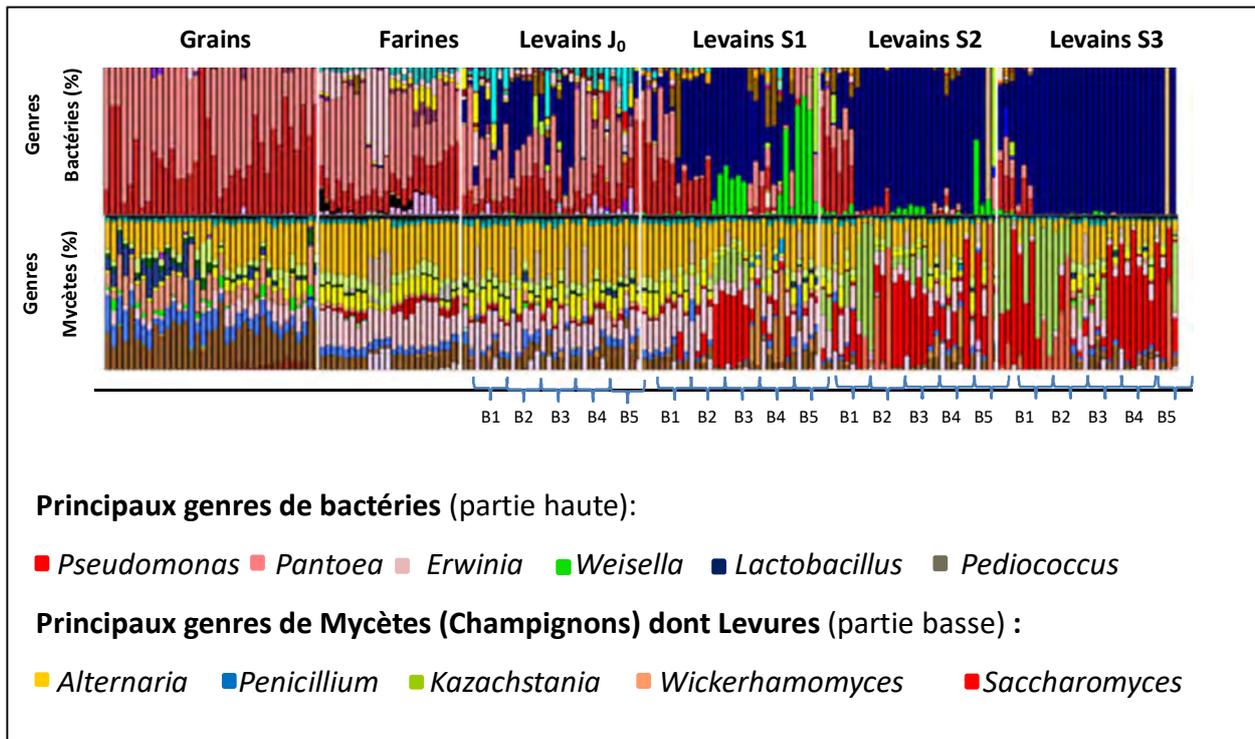


Figure 12 : Abondance relative (%) par méthode non culturale, des différents genres de Bactéries et de Mycètes dont les Levures au cours des différents stades d'élaboration des levains. (Chaque barre/colonne représente un échantillon des blés, des farines et des levains : Grains N=36, Farines N=24, Levains de J₀ à Semaine S3 élaborés à partir de 6 farines, dans l'ordre des boulangers B1, B2, B3, B4, et B5 pour les essais en Laboratoire).

Pour les levures, l'évolution semble plus lente, avec apparition progressive en S1 des genres *Kazachstania* (couleur vert clair) et *Saccharomyces* (couleur rouge), *Wickerhamomyces* (couleur saumon). Comparativement aux bactéries, une diversité plus importante demeure en S3.

L'ADN de flores fongiques correspondant à des champignons filamenteux (*Alternaria* par exemple couleur ocre) présents dans les grains semble être détectés à ce stade.

Cette approche, par analyse directe de l'ADN microbien du levain, donne une image globale de la dynamique d'implantation et de sélection des flores microbiennes majoritaires. Elle est complétée au paragraphe 4.22, par une approche culturale permettant à la fois de quantifier les deux populations, levures et bactéries, et d'identifier les espèces présentes au sein de chaque groupe.

4.2. Caractérisation des levains expérimentaux

Après le dernier rafraîchi, S_3 chez les boulangers, et après stockage 24 h à 4 °C, le dénombrement et l'identification des flores levuriennes et bactériennes des différents levains ont été effectués. Le dosage de l'acidité titrable totale et la mesure du pH ont également été réalisés à ce stade.

4.2.1. Dénombrement des flores microbiennes des levains expérimentaux

Les résultats des dénombrements des bactéries lactiques et des levures des différents levains sont présentés Figure 13.

La fourchette de variation pour le nombre de bactéries Lactiques des levains expérimentaux est comprise entre $2,2 \cdot 10^8$ à $2,9 \cdot 10^9$ UFC /g, soit un facteur 10. La densité en bactéries lactiques dépend des pratiques du boulanger. A noter, que les valeurs obtenues en laboratoire avec 13 rafraichis atteignent en moyenne $6,8 \cdot 10^9$ UFC/g. Les levains B3 présentent des valeurs 4 fois plus faibles en moyenne que les autres levains B1, B2, B4, le stockage au froid des levains pour B3 entre deux rafraichis pouvant expliquer cette observation. Excepté pour B1, les valeurs moyennes en nombre de bactéries lactiques des levains expérimentaux sont proches de celle du levain maison du même boulanger.

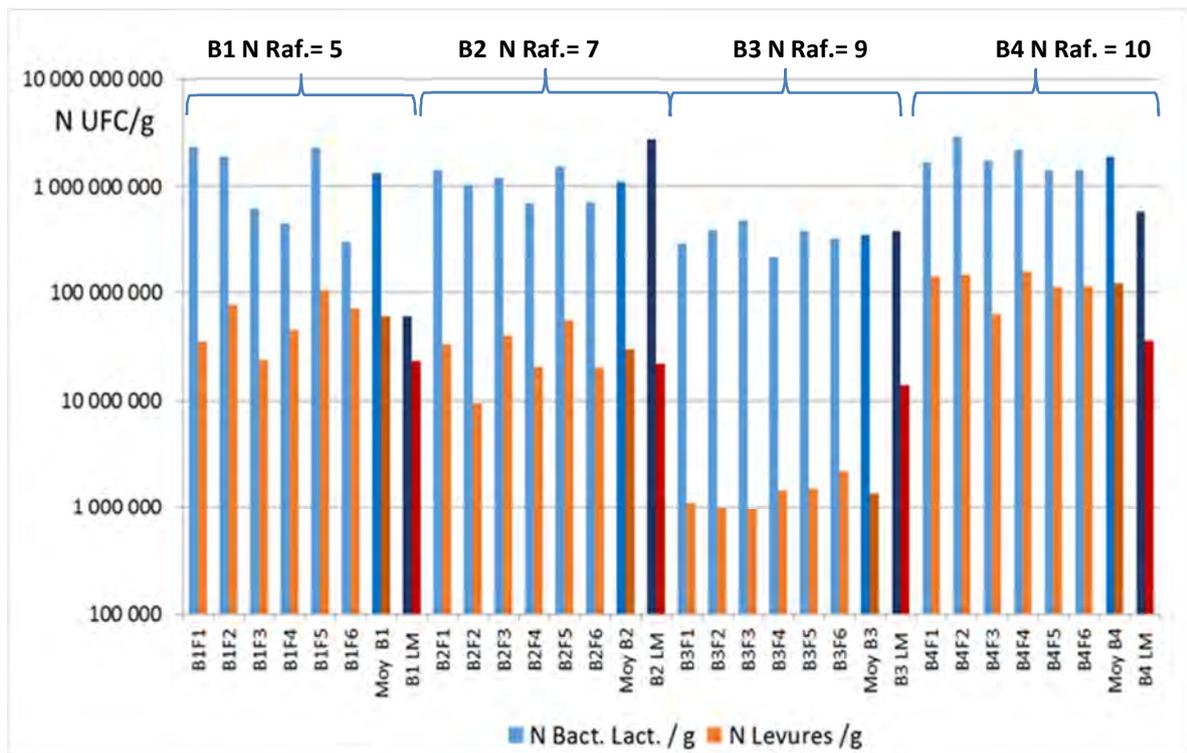


Figure 13 : Densité des populations de levures et bactéries lactiques dans les différents levains (B1 à B4) avec les différentes farines (F1 à F6) et le levain maison (LM) ou d'usage de chaque boulanger. (N UFC / g : Nombre exprimé en Unité Formant Colonie / g) (N Raf. : Nombre de rafraichis / boulanger en haut du graphe)

- Moyenne N Bactéries lactiques / Boulanger
- Moyenne N Levures par boulanger
- N Bactéries lactiques Levain maison
- N Levures Levain maison

Pour les **levures**, la densité microbienne varie de $1,10^6$ à $1,6.10^8$ UFC /g, soit un facteur 100. La variabilité est donc plus forte que pour les bactéries lactiques. Si l'on rapproche ces résultats de ceux de la figure 13, il est possible d'émettre l'hypothèse que la microflore levurienne n'est pas encore stabilisée qualitativement et quantitativement à ce stade (S₃). Comme pour les bactéries lactiques, les levures sont significativement en nombre plus faible pour le B3, (lien possible avec le stockage au froid). Par rapport au levain maison, les levains B3 présentent une valeur moyenne 10 fois plus faible. Les niveaux de

densité microbienne les plus élevés sont atteints pour B4 (1.10^8 UFC/g), avec un nombre de 10 rafraichis. Les valeurs obtenues pour les levains élaborés en laboratoire, avec 13 rafraichis, sont proches en moyenne de celle du B4 ($8,6.10^7$ UFC/g). Cependant le nombre de rafraichis ne semble pas expliquer à lui seul les variations de densité. En effet, avec peu de rafraichis les levains B1 présentent des valeurs plus élevées (6.10^7 UFC /g) que B2 et B3.

Si l'on considère les deux populations microbiennes, les levains B3 présentant les populations bactériennes et levuriennes significativement plus faibles que les levains des autres fournils, et pour les levains B4 une tendance à des valeurs plus élevées.

Un effet fournil ou boulanger est donc bien observé sur la densité microbienne des levains. La plus forte densité microbienne pour les levains B4, et également B5, peut-être le résultat d'une composition en espèce particulière ou d'un nombre de rafraichis plus importants qui conduisent à avoir un pH de levain, un apport de nutriments et un degré d'oxygénation plus favorables à la multiplication microbienne. Les densités microbiennes faibles des levains B3 peuvent être imputées au stockage à 4 °C entre chaque rafraichi. La température et le nombre de rafraichis plus faibles pour B1, ne semblent pas avoir pénalisé le développement microbien.

4.2.2. Nature des microorganismes présents dans les levains expérimentaux

Les flores majoritaires de l'ensemble des levains sont présentées Tableau IX, sans distinction des farines mises en œuvre, et en figure 14 en prenant en compte les 6 farines support. La microflore des levains maison est précisée à fin de comparaison avec les levains de l'expérimentation.

Pour les levains maison, il est à noter certaines différences par rapport à l'analyse initiale des levains lors de la phase de sélection des boulangers (Tableau III), montrant ainsi que la flore des levains peut évoluer au cours du temps (Tableau IX).

Pour les levains expérimentaux, les flores des levains chefs initiés par les boulangers sont assez proches des levains maison (LM) ou d'usage de ces boulangers. On parle alors d'une influence du « House microbiota », littéralement « Microbiote ménager », pour décrire cette flore présente dans le fournil et liée aux pratiques du boulanger, qui pourrait donc s'être implantée dans les nouveaux levains préparés sur place. Il semble que plus il y ait de rafraichis (de 5 à 10), plus la flore des levains préparés pour l'expérimentation se rapprochent de celle des levains maison (Figure 14). Cependant, la microflore des levains Labo (B5), initié en laboratoire dans une ambiance aseptisée, reste elle assez diversifiée malgré le nombre important de rafraîchis (13).

En ce qui concerne les espèces de levures présentes, l'espèce *S. cerevisiae* est majoritaire pour B1 et B4, ainsi que pour les levains B5 préparés en Laboratoire, alors que comme mentionné précédemment, il n'y a pas d'utilisation de levure de boulangerie dans les 4 fournils. Cependant, B1 et B4 étant opposés en termes de nombre de rafraichis (5 à 10), la prédominance de *S. cerevisiae* dans les levains semble donc plus liée au « Microbiote ménager » qu'à la conduite du levain. Ces résultats confirment les observations faites par méthode non culturale (Figure 12).

Les levains B2 et B3 sont plutôt dominés par le genre *Kazachstania bulderi* (B2) et *Kazachstania servazzii* (B3), espèces présentes dans les levains maison. Quel que soit le nombre de rafraichis, une espèce levurienne dominante, $\geq 50\%$ des isolats, semble être présente pour tous les levains.

Pour les bactéries lactiques, la prédominance du genre *Lactobacillus*, observée en Figure 12, est confirmée par l'identification au niveau espèce par méthode culturale (Tableau IX et Figure 14). Cette flore lactique apparaît comme assez diversifiée pour B1 et B2 (nombre d'espèces important > à 6 et pas d'espèce > à 50 % des isolats), alors que B3 et B4, avec plus de rafraichis, montrent une flore dominante à plus de 70% (*L. sakei* pour B3 et *L. plantarum* pour B4). A contrario, la flore lactique du levain B5 (Labo) reste diversifiée malgré le nombre important de rafraichis (13).

Un lien entre la présence de *Lactobacillus sakei* et la pratique de la mise au froid entre les rafraichis (Levains B3) et des températures plus basses (Levains B1) pourraient être fait (Tableau IX). Les levains B1 et B5 ont, en dominance cumulée, une flore hétérofermentaire obligatoire, alors qu'ils sont les plus différents des 5 lots de levains en nombre de rafraichis.

Tableau IX: Levures et bactéries lactiques de l'ensemble des levains expérimentaux et des levains maison des différents boulangers expérimentateurs (B1, B2, B3, B4 et Levain Labo) identifiées par méthode culturale

(Levain Exp. : Levains expérimentaux élaborés en fournil avec différentes farines)

(Levain maison : Levain utilisé par le boulanger pour sa propre production)

(Abréviations / Levures : *K.* : *Kazachstania*, *Wi.* : *Wickerhamomyces*, *S.* : *Saccharomyces*, *T.* : *Torulasporea*)

(Abréviations / Bactéries Lactiques : *L.* : *Lactobacillus*, *Ln.* : *Leuconostoc*, *P.* : *Pediococcus*, *W.* : *Weissella*)

(En caractères gras ou non, souligné ou non : type fermentaire des bactéries lactiques)

Boulangers (N Rafraichis)	Levains	Espèces de levures	Espèces de bactéries lactiques
			Espèces hétérofermentaires obligatoires
			Espèces hétérofermentaires facultatives
			<u>Espèces homofermentaires</u>
B1 (N Raf. 5)	Levain Exp.	<i>S. cerevisiae</i> (64%), <i>K. servazzii</i> (19%), <i>Wi. anomalus</i> (17%)	<i>L. curvatus</i> (35%), <i>Ln. mesenteroides</i> (19%), <i>L. sakei</i> (19%), <i>L. heilongjiangensis</i> (15%), <i>Ln. citreum</i> (6%), <u><i>P. pentosaceus</i></u> (6%)
	Levain maison	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>L. sanfranciscensis</i> (80%), <i>L. sakei</i> (20%)
B2 (N Raf. 7)	Levain Exp.	<i>K. bulderi</i> (50%), <i>Wi. anomalus</i> (50%)	<i>L. plantarum</i> (44%), <i>L. paralimentarius</i> (28%), <i>L. koreensis</i> (15%), <u><i>P. parvulus</i></u> 4%, <i>L. brevis</i> 3%, <i>L. heilongjiangensis</i> (2%), <i>L.</i> <i>hammesii</i> (2%), <i>Ln. mesenteroides</i> (2%)
	Levain maison	<i>K. bulderi</i> (100%)	<i>L. plantarum</i> (83%), <i>L. sanfranciscensis</i> (17%)
B3 (N Raf. 9)	Levain Exp.	<i>K. servazzii</i> (65%), <i>S. cerevisiae</i> (35%)	<i>L. sakei</i> (76%), <i>L. heilongjiangensis</i> (16%), <i>Ln. citreum</i> (7%), <i>Weissella sp.</i> (1%)
	Levain maison	<i>S. cerevisiae</i> (56%), <i>K. servazzii</i> (44%)	<i>L. sakei</i> (50%), <i>L. heilongjiangensis</i> (40%), <i>Weissella sp.</i> (10%)
B4 (N Raf. 10)	Levain Exp.	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>L. plantarum</i> (87%), <i>L. brevis</i> (11%), <i>L.</i> <i>paralimentarius</i> (2%)
	Levain maison	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>L. paralimentarius</i> (67%), <i>L. plantarum</i> (33%)
Levain B5 Labo (N Raf. 13)	Levain Labo	<i>S. cerevisiae</i> (80%), <i>Wi. anomalus</i> (10%), <i>K. servazzii</i> (6%), <i>T. delbrueckii</i> (4%)	<i>Ln. mesenteroides</i> (26%), <i>L.</i> <i>sanfranciscensis</i> (24%), <i>L. spicheri</i> (20 %), <u><i>P. pentosaceus</i></u> (14%), <i>Ln. citreum</i> (13%), <i>L. rossiae</i> (3%)

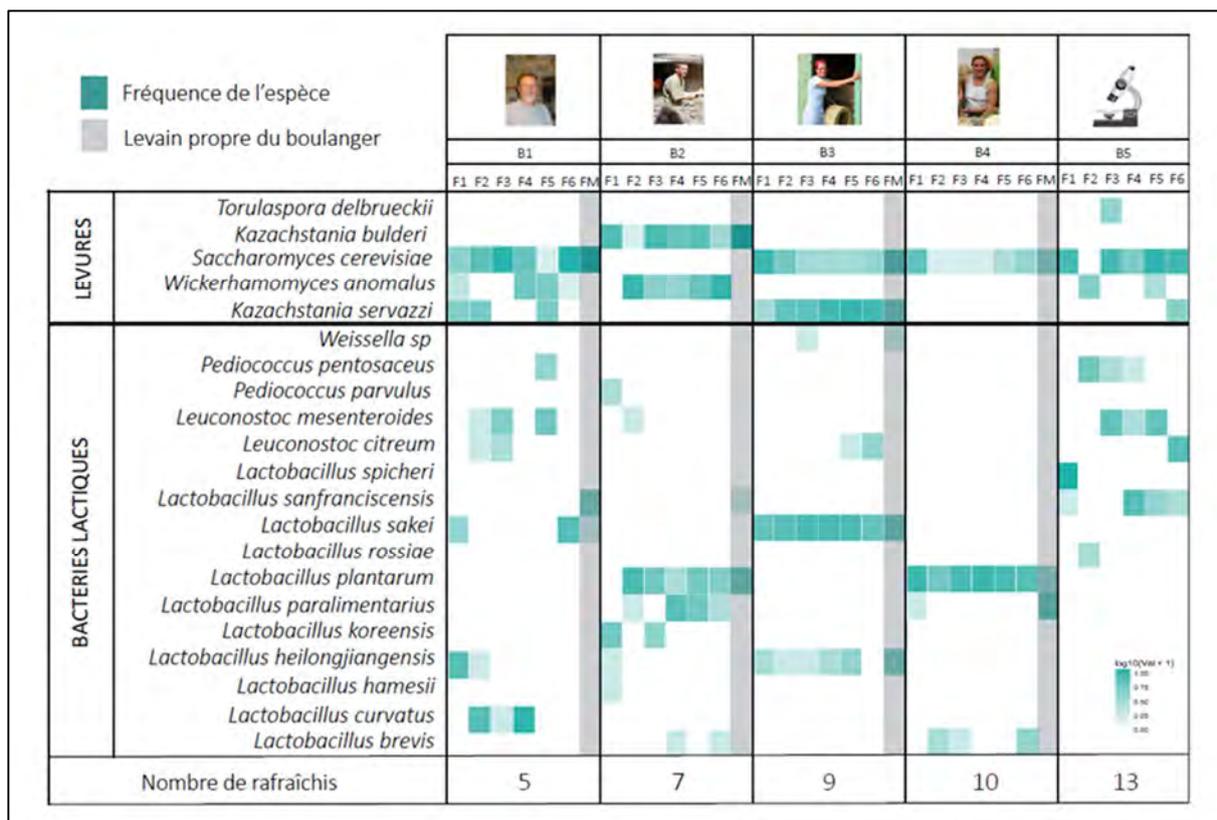


Figure 14 : Espèces de levures et de bactéries dominantes de l'ensemble des levains expérimentaux, élaborés sur les différentes farines (F1 à F6) et des levains maison des différents boulangers expérimentateurs (B1, B2, B3, B4 et B5-Levain Labo). Identification par méthode culturale.

Il n'est pas observé d'effet des farines sur les microflores des levains préparés par les boulangers (Figure 14). En conditions de laboratoire (B5), il semble que les flores microbiennes restent plus variables selon les farines et ce alors que le nombre de rafraîchis a été élevé. Un nombre faible de rafraîchi d'une part (B1) et des conditions « aseptiques » d'autre part (B5), pourraient conduire à une expression plus marquée de la diversité microbienne des levains. Ces deux observations confirment l'impact de l'environnement et les pratiques boulangères sur la flore microbienne.

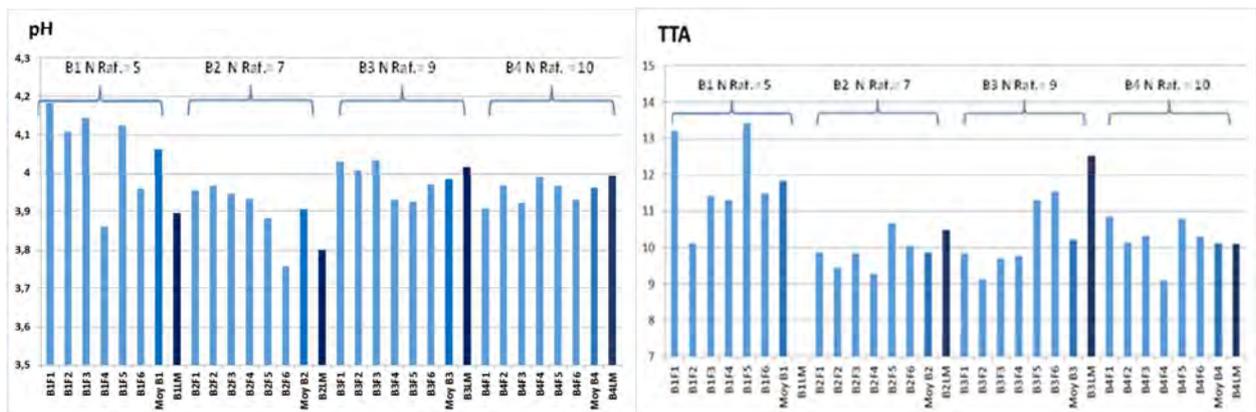
4.2.3. Acidité et pH des levains chefs expérimentaux

Les mesures du pH et de l'acidité titrable totale des levains sont présentées Figures 15 a) et b).

Acidité et pH

L'acidité titrable totale (ATT ou TTA en anglais) consiste à neutraliser l'acidité totale d'une quantité de produit (10g de levain ou de pain, en solution dans de l'eau) par un volume de soude (N/10 dans le cas du levain et du pain au levain). La mesure de l'acidité titrable va donc refléter la concentration réelle en acides du produit, indépendamment des caractéristiques des acides et du milieu.

Le potentiel Hydrogène (pH) est un indice associant la concentration et l'activité chimique de l'ion hydrogène H⁺ dans une solution ou un milieu hydraté, libéré, par exemple dans la pâte, par les acides organiques. Si l'activité chimique est forte, cela correspond à une dissociation importante des ions H⁺ et la valeur de pH sur une échelle de 1 à 14, se situera entre 1 et 7, la valeur 7 étant le point neutre entre le caractère acide et basique (pH supérieur à 7). C'est une mesure simple, effectuée avec un pH mètre muni d'une électrode électrochimique.



Figures 15 a et 15 b : Variation du pH (Fig. 13a) et de l'acidité titrable (Fig. 13 b) des levains chefs expérimentaux

(TTA : Acidité Titrable Totale : mL NaOH N/10 pour 10 g de levain)

(B1, B2, B3, B4 : Boulangers ; F1, F2, F3, F4, F5, F6 : Levains des boulangers préparés avec les 6 farines ; LM : levain maison des boulangers). Les valeurs moyennes des 6 levains pour chaque boulanger ainsi que les valeurs du levain maison sont figurées, en couleur plus foncée, à la suite de celles des levains sur les 6 farines.

L'amplitude de variation du pH des levains est relativement faible de 3,86 à 4,15 (Figure 15 a). Le pH est en lien avec les pratiques du boulanger. En particulier, les valeurs de pH des différents levains semblent s'homogénéiser avec le nombre de rafraichis. Le différentiel (Δ pH) entre le pH max et le pH min,

observés pour un boulanger entre ses différents levains, diminue avec le nombre N de rafraichis (B1 : N Raf.=5, $\Delta\text{pH} = 0,23$; B2 : N Raf.=7, $\Delta\text{pH} = 0,14$; B3 : N Raf.=9, $\Delta\text{pH} = 0,09$; B4 : N Raf.=10, $\Delta\text{pH} = 0,06$).

Il n'apparaît pas d'effet farine sur le pH des levains. (Mélanges Modernes pH moyen= $3,95 \pm 0,08$; Mélanges Anciens pH moyen= $4 \pm 0,03$). Les différences de teneur en protéines (Tableau VII) et donc potentiellement de pouvoir tampon et de ressources nutritionnelles, ne semblent donc pas avoir d'effet sur ce marqueur d'activité.

L'acidité titrable totale (TTA) des levains (Figure 15 b) est comprise entre 9 et 13,4 mL NaOH 0,1N / 10 g. Cette amplitude de variations est liée aux valeurs élevées pour le boulanger 1, sans doute en lien avec le faible nombre de rafraichis (5) qui entraînerait une accumulation d'acidité. A contrario, les levains labos (données non montrées ici), avec un grand nombre de rafraichis (13), ont une TTA moyenne élevée de 13,5 mL NaOH 0,1N/10 g. Il n'existe pas de lien apparent entre les espèces microbiennes, lactiques notamment, des différents levains (Tableau IX) et ces valeurs d'acidité, si ce n'est que les levains les moins acides (B2, B3, B4) ont une flore lactique hétérofermentaire facultative prépondérante. A noter que les levains B1 malgré une acidité plus élevée présentent un pH relativement moins acide ; cette observation peut être en lien avec une teneur en acide acétique (acide faible) plus importante pour ces levains, tel qu'observé sur les pains (Figure 24).

Il n'apparaît pas ou peu d'effet significatif de la variété farine. La TTA est un peu plus faible en moyenne pour les Mélanges Modernes ($10,14 \pm 0,84$) comparativement aux Mélanges Anciens ($10,94 \pm 0,56$)

5. Influence de la diversité Blés/farines/levains en cours de panification

5.1 Protocole des essais de panification

A réception des levains S_3 provenant des boulangers, tous les levains sont conduits de la même façon. Les levains chef sont préparés avec un premier rafraîchi réalisé à 85 % d'hydratation (base farine) et avec 4 h de fermentation à 27 °C, suivi d'un stockage à 4 °C pour tous les levains. Les essais de panification se sont ensuite déroulés par variété de farine sur 3 jours (J_1 : F1 et F2, J_2 : F3 et F4, J_3 : F5 et F6).

La veille du jour de panification, chaque levain chef est repris pour préparer le levain tout point, avec une hydratation de 62 %, 4 h de fermentation à 27 °C et stockage à 4 °C. Le levain tout point est remis en fermentation 2 h avant le début de la panification. La farine mise en œuvre est la même que celle utilisée pour la préparation des différents levains.

5.1.1. Diagramme de fabrication

Le protocole a été choisi (Tableau X) en fonction de l'expérience du contrat PaysBlé, acquise dans les essais de panification à base de levain et avec des variétés de population anciennes et des variétés modernes (Triptolème, 2017-3).

Tableau X : Protocole de référence des essais de panification

Température moyenne des ingrédients	Levain tout point	6 °C
	Farine	20 °C
	Fournil	20 °C
	Eau	19 °C
	Température de base	75 °C
Pétrissage sur pétrin spirale	Frasage : vitesse 100 tr/min	4min
	Hydratation	Fonction de la consistance
	Pétrissage : vitesse 200 tr/min	2 à 4 min en Fonction lissage
Pointage en cuve	Chambre à 27 °C	120 min rabat à 60 min
Division	Manuelle / pâtons	10 min Masse 500 g
Boulage	Manuel	5 min
Détente		20 min
Façonnage	Manuel / Longueur	15 min / 30 cm
Apprêt	Chambre à 27 °C	120 min
Cuisson	Four à sole à 245 °C	30 min

5.1.2. Formule de base de fabrication

Les recettes mises en œuvre sont détaillées dans le Tableau XI. L'élaboration d'une pâte boulangère se fait par hydratation.

Hydratation

En boulangerie, comme en pâtisserie, la variation de l'ordre d'incorporation des ingrédients ou un groupe d'ingrédients (solide et liquide) dans un mélange est une réalité à la fois technologique et de pratiques.

L'élaboration d'une pâte boulangère se fait par hydratation de la farine, soit :

1. en recherchant une consistance constante, de référence pour le boulanger, au cours de l'opération de pétrissage, lorsque l'on ne connaît pas la qualité de la farine :

- en apportant de l'eau à la farine pour en faire une pâte de consistance donnée (méthode pour les essais de panification), on en déduit la quantité d'eau associée à la matière solide (hydratation de la farine). Elle s'exprime en masse ou volume de liquide/ solide (L/kg) ou en proportion de liquide par rapport à la farine (% d'eau/farine) ;
- en délayant de la farine dans l'eau pour en faire une pâte de consistance donnée (« farine de délayage », expression peu usitée). Elle s'exprime en masse ou volume de solide/liquide (kg/L) ou en proportion de farine par rapport au liquide (% farine/eau).

2. à hydratation constante (proportion d'eau par rapport à la farine constante), lorsque les caractéristiques qualitatives de la farine, liées à l'absorption de l'eau sont maîtrisées (teneur en protéines, amidons endommagés, et fibres non cellulosiques et teneur en eau et mesures rhéologiques de détermination de la consistance). Il existe néanmoins des risques de variation de la consistance qui devront être corrigés.

Dans les différentes approches, l'objectif a pour résultat de s'approcher d'une consistance constante de la pâte, qui reste très liée à l'observation du boulanger ; celle-ci pouvant être variable suivant les boulangers et les procédés. Elle peut-être faiblement ou fortement hydratée (faible ou forte hydratation) si la consistance est forte ou faible (dure, ferme, molle...).

La détermination du rendement en pain et la recherche d'une qualité constante amène les boulangers, notamment industriels, à suivre en parallèle la teneur en eau et son évolution au cours de la panification. Celle-ci s'exprime soit en proportion d'eau par rapport à la Matière Telle Quelle (%/MTQ) ou par rapport à la Matière Sèche (%/MS).

	% sur farine mise en œuvre	masses (g)	% sur pétrissée	% sur farine totale
Formule du levain chef				
farine	100	261	6	9
eau	85	222	5	
Total levain chef	185	483	10	
Formule du levain tout point				
farine	100	568	12	20
eau	62	349	8	
Levain chef	85	483	10	
Total levain	247	1400	30	
Formule de la pétrissée ou pétrie				
farine	100	2000	43	71
eau	60	1200	26	
eau ajoutée	0	0	0	
sel	2	40	1	
levain tout point	70	1400	30	
Total pétrissée		4640	100	
Formule ingrédients de la pétrissée				
total farine	100	2829	61	100
total eau	73,92	1771	38	
sel	1,67	40	1	
Total ingrédients		4640	100	

	formule de départ
	proportion d'eau par rapport à la farine qui permet d'orienter la consistance du levain
	proportion de farine fermentée par rapport à la farine totale qui donne une indication des risques qualitatifs sur le gluten
	proportion de farine apte à former du gluten pour assurer la rétention gazeuse
	proportion de levain dans la pâte qui donne une indication sur l'activité microbienne de la pâte
	Proportion de farine totale utilisée pour une masse de pâte qui permet d'envisager le besoin journalier, hebdomadaire et annuel
	Quantité de pâte à pétrir en fonction du nombre et du poids des pains fabriqués

Le levain représente une proportion de 70 % par rapport à la farine soit 30 % par rapport au total pâte, proche de la moyenne des pratiques des boulangers. L'élaboration des levains s'est faite au départ chez les boulangers (Tableau VIII) avec une hydratation (proportion d'eau) entre 70 et 100 % par rapport à la farine, une moyenne de 85 % a été retenue dans la mise en œuvre des levains (Tableau XI).

5.1.3. Grille de notation

Les observations faites en cours d'essai de panification repose sur une méthodologie sensorielle dont les termes et la manière de caractériser et de noter ont été définis dans les documents Triptolème (feuille d'expérimentation

boulangerie, 2014 et glossaire expérimentation boulangerie, 2014) et repose aussi sur les bases de l'essai de panification dans la méthodologie AFNOR (NF VO3-716)

Caractéristiques de la pâte					Caractéristiques du pain										
Interprétations, observations et notes	insuffisance			10	excès			Interprétations, observations et notes	insuffisance			10	excès		
	1	4	7		1	4	7		1	1	4		7	1	4
Rapidité lissage			X	•••••				Section		X		•••••			
Collant de la pâte				•••••	X			Couleur				•••••	X		
Consistance				•••••	X			Epaisseur				•••••	X		
Extensibilité		X		•••••				Croustillant		X		•••••			
Elasticité	X			•••••				Coup : Développement	X	X		•••••			
Relachement				•••••		X		de : Régularité				•••••	X		
PETRISSAGE								lame : Déchirement				•••••		X	
Pousse en cuve		X		•••••				ASPECT DU PAIN							
Détente relachement				•••••		X		Couleur				•••••	X		
POINTAGE								Texture : Souplesse			X	•••••			
Allongement				•••••			X	Elasticité				•••••	X		
Déchirement				•••••			X	Collant				•••••	X		
Elasticité	X			•••••				Alvéolage : Régularité				•••••	X		
Collant de la pâte				•••••		X		Epaisseur				•••••	X	X	
FACONNAGE								Odeur : Saveur				•••••	X		
Activité fermentaire				•••••				ASPECT MIE							
Déchirement				•••••		X		Volumes des pains (cm ³)							
APPRET															
Collant de la pâte				•••••	X										
Tenue		X		•••••											
MISE AU FOUR															

Figure 16 : Grille de notation de type AFNOR utilisée pour la notation des essais de panification (exemple de la notation du levain B1 et de la farine F3)

5.2. Comportement des pâtes en cours de panification

5.2.1. Observations sur la conduite de la panification

Compte tenu de l'absence d'essais préliminaires, le pétrissage a été conduit avec une correction de l'hydratation en fonction de la consistance au stade frasage et de l'apparition du lissage au cours du pétrissage. Le temps de pétrissage a été plus élevé pour les farines F4 et F6, pour obtenir le début de lissage de la pâte. Les températures de pâte obtenues entre 24 °C et 25,5 °C

sont en moyenne plus élevées pour les Mélanges Modernes (environ 1 °C) ; cela peut s'expliquer par 3 facteurs, un temps moyen de pétrissage supérieur, pâtes plus élastiques et températures de cuve supérieures car les Mélanges Modernes ont été panifiés systématiquement après la série des Mélanges Anciens. Cet écart se situe néanmoins dans la fourchette mentionnée dans l'essai de panification AFNOR qui est de 25 °C ± 1 °C. Malgré des temps de pétrissage différents et la variation sur les températures de pâtes, on ne note pas d'écarts significatifs sur les consistances en fin de pétrissage

5.2.2. Caractéristiques physiques des pâtes en cours de panification

Lors des essais de panification, plusieurs observations sont faites, notamment : l'hydratation, l'élasticité, la tenue ; elles sont de bons indicateurs des propriétés visco-élastiques des pâtes et de leur évolution en cours de panification.

Tableau XII : Hydratations des pâtes au pétrissage (valeurs en % par rapport à la farine)

Farines (MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien en grisé)	Boulangers				Moyenne / Farine ± Ecart Type
	B1	B2	B3	B4	
F 1	58	59	60	60	59,3 ±0,8
F 2	60	64	64	63	62,8 ±1,6
F 3	58	59	61	59	59,3 ±1,1
F 4	62	64	66	64	64,0 ±1,4
F 5	58	60	63	60	60,3 ±1,8
F 6	65	68	70	67	67,5 ±1,8
Moyenne / Boulangers	60,2	62,3	64,0	62,2	MA: 59,6 ±0,5
± Ecart Type	±2,6	±3,3	±3,3	±2,8	MM : 64,8 ±2,0

Les hydratations (Tableau XII), obtenues par une observation manuelle de la consistance en début de pétrissage, liées aux propriétés visqueuses, sont plus

faibles avec les Mélanges Anciens. Elles s’expliquent principalement par des taux d’amidons endommagés inférieurs aux Mélanges Modernes (Tableau VI) et ce malgré des taux de protéines et de gluten supérieurs. La connaissance des teneurs en fibres des farines permettrait d’affiner cette analyse.

Du point de vue rhéologique, les résultats (Figure 17) sur les différences d’hydratations relatives obtenus au Mixolab apportent une prédiction ($R^2 = 0,70$) des hydratations en panification. Et ce même si, du fait du principe de la méthode, les données Mixolab intègrent à la fois les propriétés visqueuses et élastiques en cours de pétrissage et non pas, comme dans les pratiques boulangères, l’évaluation pendant l’arrêt du pétrin.

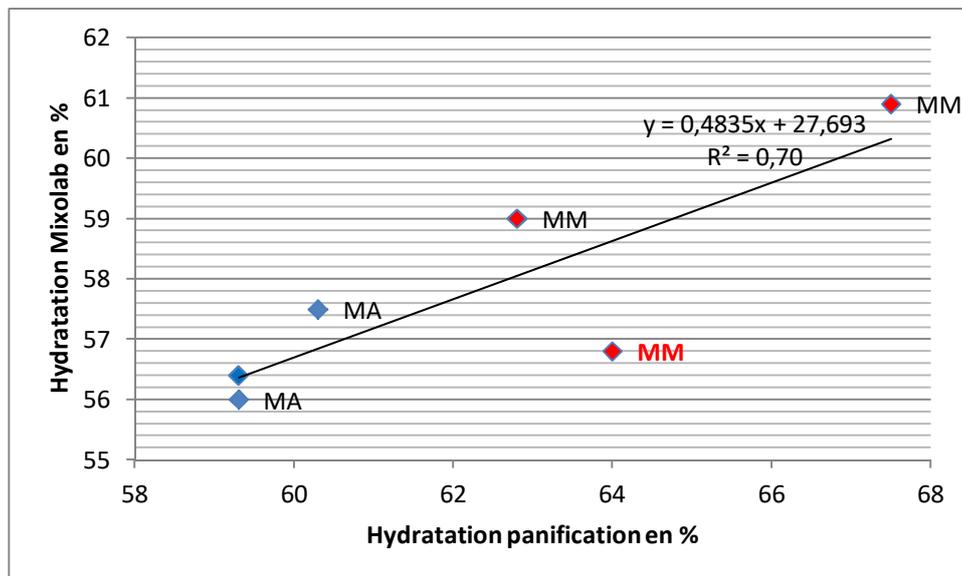


Figure 17 : Relation entre le niveau d’hydratation pour obtenir un couple résistant constant au Mixolab et l’hydratation par l’observation en panification (MA Mélange Ancien ; MM Mélange Moderne)

Sur la figure 17, le point MM coloré en rouge, correspondant à la farine F4, a une particularité ; il se situe dans le bloc moderne par son taux d’amidons endommagés (Tableau VI) et proche des Mélanges Anciens par le couple résistant C2, moins élevé, au Mixolab (Tableau VII). Cette plus faible résistance peut expliquer, pour un couple C1 constant, une hydratation réduite pour F4,

par rapport aux autres Mélanges Modernes F2 et F6. Elle peut expliquer, en partie, son positionnement décalé par rapport à la droite de régression.

L'évolution des caractéristiques élastiques au cours de la panification est un critère important pour prédire les capacités de développement en fermentation et en cuisson ; elle est à la fois liée aux caractéristiques intrinsèques de la farine et à la conduite de la panification par le boulanger.

Par l'observation manuelle de l'élasticité de la pâte en fin de pétrissage, les valeurs d'élasticité des Mélanges Anciens sont, en moyenne plus basses, que les Mélanges Modernes (Figure 18). Ces résultats sont en lien avec l'état du gluten apprécié par des méthodes physico-chimiques (Tableau VII). Les valeurs d'élasticité, y compris pour la farine F4, reflètent les résultats du Gluten Index, plus élevés pour les Mélanges Modernes.

Les pâtes préparées avec les levains B4 jugées plus élastiques en fin de pétrissage (Figure 18) prennent plus de force que les autres au pointage, leur allongement est plus difficile au façonnage, le déchirement et la tenue de la pâte à l'apprêt (Figure 19) sont supérieurs aux autres levains des boulangers.

Certaines hypothèses expliquant le niveau d'élasticité et de prise de force plus marqués pour les levains B4 peuvent être avancées :

- un état du gluten moins dégradé à l'origine dans le levain chef compte tenu du nombre de rafraîchis plus important ;
- moins d'effet de l'acidité sur l'état de cohésion du gluten ; l'acidité est plus faible pour les levains B4 par rapport, aux levains des boulangers B1, B2, B3, (Figures 15 b) ;
- un potentiel oxydant du levain qui serait supérieur compte tenu du nombre de rafraîchis plus important.

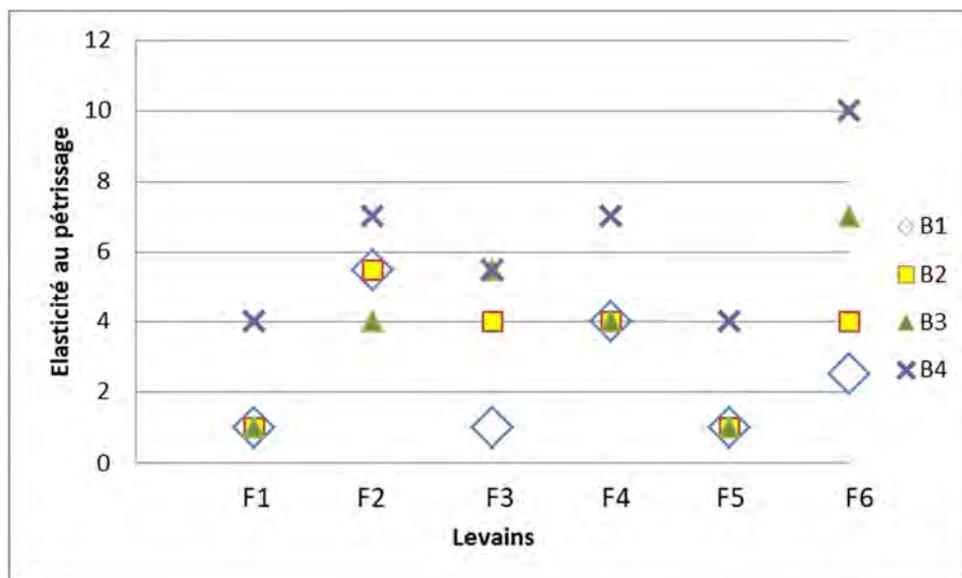


Figure 18 : Influence des levains et des farines sur l'élasticité des pâtes au pétrissage.

(Mélanges Anciens F1, F3, F5 ; Mélanges modernes F2, F4, F6)

La tenue à la mise au four ne reflète pas, systématiquement, le caractère élastique de la pâte, celle-ci est aussi, associée aux propriétés de rétention et de production gazeuse de la pâte et à son degré d'oxydation, lié à la prise de force.

Néanmoins, si l'on compare les boulangers B4 et B1, il y a une correspondance entre la diminution de l'élasticité et la tenue de la pâte (Figures 18 et 19), et une différence d'impact très nette de l'effet des levains de ces deux boulangers sur ces deux descripteurs de pâte. Pour les boulangers B2 et B3, il est difficile de montrer un lien fort entre élasticité et tenue de la pâte et de faire apparaître un impact spécifique des levains de ces deux boulangers sur ces caractéristiques.

On constate, figure 18, une persistance des caractéristiques élastiques, identifiées sur les farines, plus marquée avec les Mélanges Modernes par rapport aux Mélanges Anciens ce qui peut signifier que les levains n'impactent pas de manière différente ces deux types de blé.

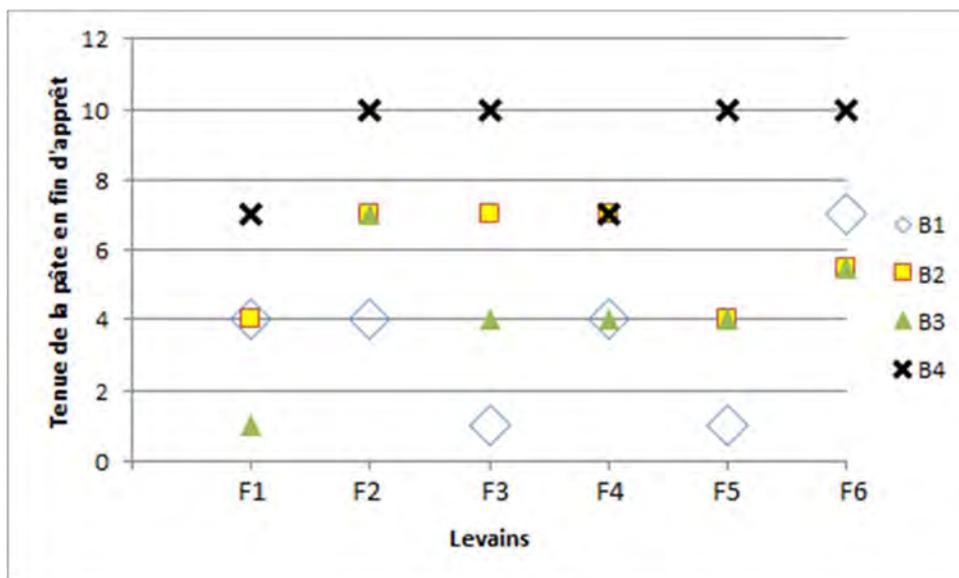


Figure 19 : Influence des levains et des farines sur la tenue des pâtes en fin d'apprêt

5.2.3. Approche méthodologique de caractérisation des protéines en cours de panification

L'objectif de cette démarche, non directement intégrée dans le projet Bakery, était la recherche d'indicateurs qui permettraient de mettre en évidence une évolution des protéines en cours de panification et/ou l'impact de levain sur l'état des protéines. Les mesures traditionnelles utilisées dans le secteur céréalier ne permettent pas de qualifier l'état des protéines en cours de panification. Une première approche méthodologique, sur un échantillonnage partiel des pâtes issues de différents levains et farines, a été réalisée par la mesure des fractions protéiques en chromatographie de type HPLC. Leurs quantifications à différents stades de fabrication (Figure 20) a fait apparaître quelques tendances, à savoir : des fractions F1 et F2 de hauts poids moléculaires (gluténines) supérieures en fin d'apprêt et de pointage par rapport à la fin de pétrissage pour les fractions à plus bas poids moléculaires plus élevées sur les fractions F3 et F4 (gliadines) et F5 (petites protéines). Nous

pouvons émettre l'hypothèse d'effets de re-polymérisation des protéines en cours de panification par rapport au pétrissage qui peuvent s'expliquer par l'oxydation des protéines. Sur les essais réalisés, il apparait aussi des évolutions différentes en fonction de levains étudiés de quelques boulangers et du type de blé. Le phénomène d'hydrolyse, dont les conséquences se traduiraient par l'augmentation des fractions protéines de plus faibles taille, entre la fin du pétrissage et la fin d'apprêt, n'est pas identifié. A l'avenir, pour ce type d'étude, sur l'effet des levains en panification, le suivi de ces indicateurs nous semble intéressant et pertinent pour mieux appréhender leurs effets, dont les réactions d'oxydo-réduction et les liens avec la « prise de force des pâtes » observée par les boulangers.

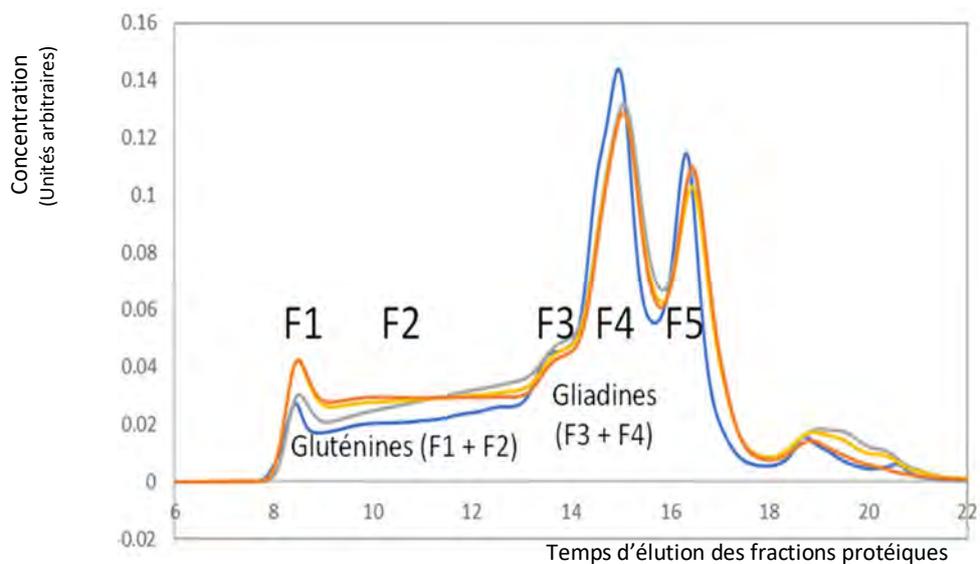


Figure 20 : Profil protéique à différents stades de panification d'une pâte formée de la farine F4 et du levain élaboré par le boulanger B4

Mélange Farine + Levain tout point : — (bleu)
 Pâte Fin de pétrissage : — (gris)
 Pâte en fin de pointage : — (orange)
 Pâte en fin d'apprêt : — (jaune)

5.2.4. Suivi de la pousse des pâtes en cours de panification

La **pousse** est la résultante de plusieurs paramètres qui traduisent le niveau de développement de la pâte en cours et en fin d'apprêt. Elle est corrélée avec la production et à la rétention gazeuse et à l'équilibre élasticité/extensibilité de la pâte. En boulangerie, on peut lui attribuer des qualificatifs complémentaires liés à des caractéristiques de développement, soit à la vitesse de développement (pousse rapidement ou lentement), soit à la forme que prend la pâte en cours de développement (pousse rond ou plat). La pousse varie aussi en fonction de la pression atmosphérique.

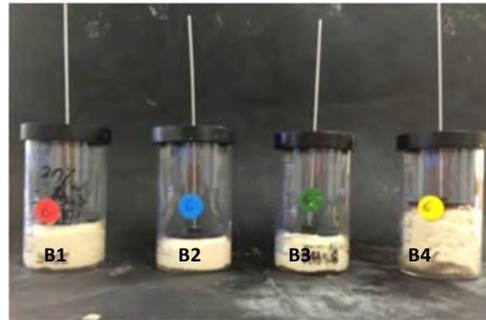
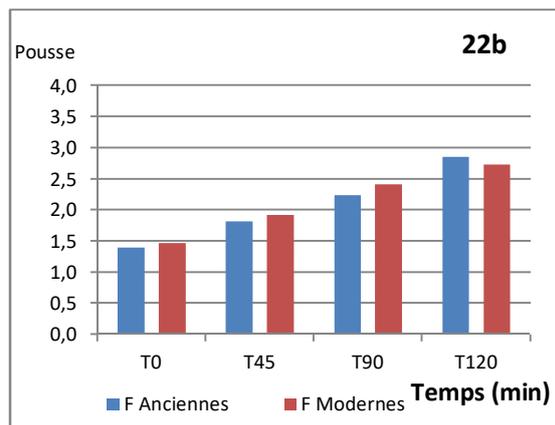
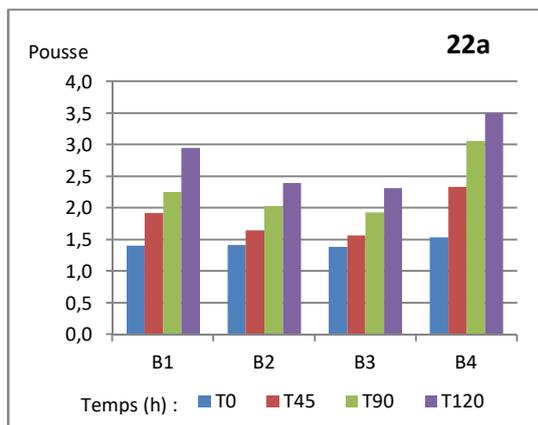


Figure 21 : Visualisation du développement maximal au mesureur de pousse des pâtes panifiées avec la farine F6 à partir des 4 levains (de gauche à droite de B1 à B4)

Un effet levain est observé (Figure 22a) ; les levains issus des boulangers B1 et B4 présentent une pousse plus élevée que B2 et B3. Les hauteurs de développement obtenues avec les levains B4 et B1 par rapport aux B2 et B3 semblent bénéficier d'une production gazeuse supérieure qui peut être mise en relation avec la densité des levures type *Saccharomyces cerevisiae* (Tableau IX). Notons que les pâtes préparées avec les levains B4, présentent une pousse témoignant d'une bonne rétention gazeuse. L'activité microbienne plus forte de ces levains (Figure 13) n'entraîne donc pas pour autant d'actions d'hydrolyse plus importantes.

En ce qui concerne les farines (Figure 22b), les écarts types observés ne permettent de conclure à une différence significative de la pousse des pâtes en fonction des Mélanges Anciens et Modernes, même si on observe une tendance de niveau supérieur pour les Modernes par rapport aux Anciens jusqu'à T90 min. Les caractéristiques des protéines et du gluten, leur structuration en panification et les activités de fermentations des Mélanges Anciens et des Mélanges Modernes ne semblent donc pas impacter la pousse.



Boulangier	T0	T45	T90	T120
B1	1,4±0,1	1,9±0,2	2,3±0,3	3,0±0,2
B2	1,4±0,1	1,7±0,1	2,0±0,2	2,4±0,5
B3	1,4±0,1	1,6±0,2	1,9±0,1	2,3±0,5
B4	1,5±0,1	2,3±0,2	3,1±0,8	3,5±0,6

Farines	T0	T45	T90	T120
Moyenne MA	1,4±0,04	1,8±0,01	2,2±0,17	2,9±0,21
Moyenne MM	1,5±0,05	1,9±0,05	2,4±0,32	2,7±0,26

Figures 22 a et 22 b et tableaux associés: Mesures de pousse en cours de panification. Valeurs moyennes par Levains des différents boulangers B1, B2, B3, B4 (22 a) et selon les variétés de farines MA anciennes et MM modernes (22 b)

5.2.5. Suivi de la production gazeuse en cours de panification

La **production gazeuse** peut être mesurée par la variation de pression dans un système fermé, ici dispositif Ankom (Figure 23), de façon à prendre en compte à la fois le gaz retenu dans la pâte et celui libéré dans l'espace de tête. Il correspond théoriquement à la mesure de la totalité du gaz carbonique produit dans la pâte, à condition de négliger la différence de perméabilité et de résistance des pâtes à la pression interne. Cette mesure permet donc d'évaluer, partiellement, le potentiel d'activité d'un ferment, ici des levains, sur une farine donnée, indépendamment de la rétention gazeuse propre à cette farine. Il permet aussi d'évaluer le potentiel de telle ou telle farine à fournir les substrats ou des conditions favorables aux levains.



Figure 23 : Mesure de la production gazeuse apparente des pâtes (Système Ankom)

Le suivi de la production gazeuse apparente a été effectué dès la fin du pétrissage et les résultats obtenus pour les 24 pâtes préparées sur les différentes farines avec les 6 levains chefs de chacun des 4 boulangers ont été traités en moyennant les 6 cinétiques pour les 4 boulangers d'une part (Figure 24) et par catégorie de farines, modernes et anciennes, d'autre part (Figure 25).

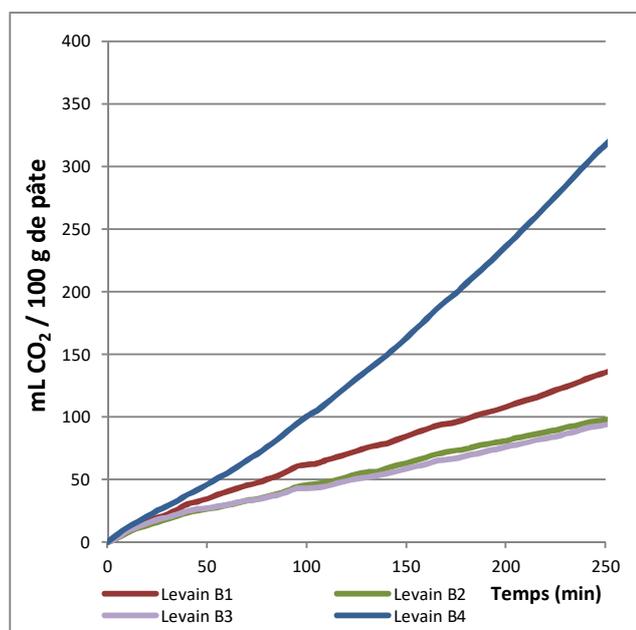


Figure 24 : Cinétique de production gazeuse apparente en cours de panification par boulanger (mesureur Ankom ; moyenne des 6 levains élaborés sur les 6 farines pour chaque boulanger)

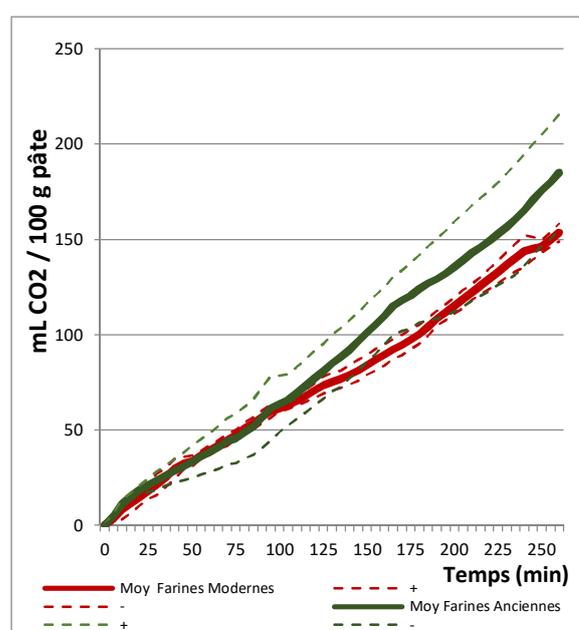


Figure 25 : Cinétique de production gazeuse apparente en cours de panification par catégorie de farines (mesureur Ankom ; Farines modernes F2, F4, F6 et Farines anciennes F1, F3, F5 ; moyenne entre les 4 boulangers, soit 12 pâtes par catégorie de farine)

En ce qui concerne l'effet levain (Figure 24), les levains issus de la boulangerie B4 ont une activité nettement plus importante que les autres levains. Les levains B1 se démarquent également des deux autres groupes de levains issus des boulangeries B2 et B3. Les flores de ces deux groupes de levains, B4 et B1, se caractérisent du point de vue microbiologique, par la présence de souches de *S. cerevisiae* (Tableau IX). De plus, ces deux groupes présentent les densités microbiennes en levures significativement plus

élevées en moyenne (B4 : 1.10^8 et B1 : 6.10^7 UFC /g) que les autres levains (B2 : 3.10^7 et B3 $1,4.10^6$ UFC/g). Il semble donc que, dans les conditions d'expérimentations, la densité des levures, la présence de cette espèce de levure et de la flore lactique associée favorise la production gazeuse.

Si l'on considère l'ensemble des farines (données non présentées), il ne ressort pas d'effet significatif de la farine sur la production gazeuse. En comparant les résultats obtenus sur les farines des Mélanges Modernes et les farines des Mélanges Anciennes (Figure 25), une production gazeuse légèrement supérieure apparaît, avec ces dernières ; cependant au vu des variations observées, cette différence n'est pas statistiquement significative.

L'absence d'effet farine sur la production gazeuse malgré la différence de taux d'amidons endommagés (Tableau VI : 21,1 UCD en moyenne pour les MA contre 24,2 pour les MM) entre les Mélanges Modernes et les Mélanges Anciens demanderait une analyse plus fine.

Les activités amylasiques n'étant pas significativement différentes entre les farines de l'expérimentation (Tableau VII), il est possible d'émettre l'hypothèse que la quantité de substrats glucidiques (sucres) disponibles pour les levures n'est pas limitante et ne fait donc pas ressortir d'impact farine sur ce point.

6. Analyse des pains obtenus à partir des levains expérimentaux

6.1. Structure alvéolaire des pains

L'alvéolage de la mie et de la croûte du pain se définit par :

- le nombre d'alvéoles par unité de surface ou de volume
- la grosseur moyenne des alvéoles
- la régularité dimensionnelle des alvéoles

Ces caractéristiques peuvent être associées à la densité alvéolaire. Une forte densité alvéolaire se caractérise par un nombre d'alvéoles élevé ce qui conduit, pour une surface ou un volume de pain, par de plus petites alvéoles et plus régulières. L'épaisseur des parois alvéolaire diminue en conséquence.

La structure alvéolaire se crée au pétrissage mais elle évolue en cours de panification, les alvéoles se déforment s'il y a suffisamment de gaz produit, elles augmentent en nombre lors des rabats de pâte et du façonnage, elles diminuent en nombre, par le phénomène de coalescence, si la stabilité de la pâte n'est pas suffisante (pâte très hydratées qui manquent de consistance, activités enzymatiques d'hydrolyse trop fortes).

Les images des tranches des 24 pains obtenus à partir des 6 levains de chaque boulanger B1 à B4 sont présentées en Tableau XIII.

Tableau XIII : Tranches de pains des différents essais scannés
(Levains B1, B2, B3, B4 panifiés avec Farines F1 à F6 ; cf. Tableau III et IV)



Le traitement par imagerie de la structure alvéolaire n'ayant pu être réalisé, il est difficile de quantifier le nombre, la régularité et la grosseur des alvéoles et l'épaisseur des parois alvéolaires. L'observation des images (Tableau XIII) permet néanmoins d'affirmer que les mies de pains du boulanger B4 sont plus « mousseuses » à savoir que, le nombre d'alvéoles par unité de surface et la régularité alvéolaires sont supérieurs. La grosseur des alvéoles est également inférieure aux boulangers B1, B2 et ceci est encore plus marqué par rapport au boulanger B3. Un lien peut être fait avec le nombre et l'activité des levures (par exemple : N levures pour B3 le plus faible), mais cette observation n'est pas suffisante en soit. En effet, les caractéristiques de régularité alvéolaire sont associées en technologie boulangère à la production gazeuse, à la rétention gazeuse et à la stabilité du

réseau de gluten. Lorsque ces facteurs sont plus marqués, la stabilité des alvéoles est meilleure, le phénomène de coalescence est moindre et par conséquent l'intégrité des alvéoles est mieux conservée.

Les farines des Mélanges Anciens F1, F3, F5 semblent présenter un alvéolage plus irrégulier par rapport à celui des farines des Mélanges Modernes F2, F4, F6, qui reste plus « serré ». Cet effet est visible notamment pour B1 et B4.

6.2. Volume des pains

Facteurs du volume d'un pain

Pour assurer une aération et son développement, la pâte à pain doit :

- contenir du gaz (rôle de l'aération en cours de pétrissage et de la production gazeuse en cours de fermentation) ;
- retenir le gaz : rôle du gluten, de sa structuration au pétrissage et de sa stabilisation par les actions d'oxydo-réduction en cours de la panification ;
- s'expanser (rôle de l'activité de fermentation, du bon équilibre élasticité/extensibilité du réseau gluténique et de l'expansion des gaz en début de cuisson) ;
- stabiliser cette expansion pendant la cuisson par la gélatinisation de l'amidon et la coagulation du gluten.

Les facteurs principaux pour obtenir ces résultats relèvent à la fois des protéines du blé de la qualité du gluten formé, de l'activité de fermentation, de la stabilité de la pâte qui dépend principalement de la conduite de travail par le boulanger et de l'intensité des actions enzymatiques de la farine et des microorganismes (hydrolyse et oxydo-réduction) au cours de la panification.

Les volumes des pains ont été mesurés (Tableau XIV) par déplacement de graines rondes, de densité faible pas trop élevée (colza, millet, moutarde...) dans un récipient cylindrique spécifique pour cette mesure (volumètre à pains). La même mesure se fait avec une cale témoin, de longueur et de volume proche des mesures du pain, et dont on connaît de manière précise son volume. Par différence, entre les volumes de graines déplacées, on peut en déduire le volume du pain (norme AFNOR V03-716). De plus, les pains font l'objet d'une mesure de section, par le rapport, mesuré en centimètres, entre la hauteur et la base (Tableau XV).

Tableau XIV : Volume des pains en cm³ en fonction des farines et des boulangers (MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien) (Farines anciennes en grisé)

Farine	Boulangier				Moyenne
	B1	B2	B3	B4	
F1	1016	900	774	1106	949
F2	1005	847	818	1145	954
F3	1023	1010	953	1479	1116
F4	955	1026	868	1186	1009
F5	920	888	802	1116	932
F6	1102	914	957	1368	1085
Moyenne	1004 ±57,1	931 ±65,1	862 ±71,4	1233 ±140,5	MA : 999 ±83,0 MM : 1016 ±53,7

La moyenne des volumes des Mélanges Modernes est très sensiblement la même que celle des Mélanges Anciens, 17 cm³ de plus (Tableau XIV) ; cela confirme les observations de mesures de pousse (Figure 20b). Cependant, pour un même volume la section des pains est différente et en moyenne les Mélanges Anciens ont des sections de pains plus plates (Tableau XV) ce qui est en cohérence avec la tenue des pâtes avant la mise au four (Figure 18). Dans les Mélanges Modernes, seul F4 se rapproche des Mélanges Anciens, un même constat a été observé avec le Mixolab (§ 5.2.2).

L'influence de l'origine du levain est quant à elle très marquée, avec un écart maximum de environ 370 cm³ selon les levains. Les volumes des pains sont supérieurs avec les levains B4 et B1, ce qui est en cohérence avec les observations sur la hauteur de pousse plus élevée (Figure 20a) et la production gazeuse plus forte (Figure 22) pour ces levains.

Si l'on considère la section des pains (Tableau XV), celle-ci est différente selon les levains ; les pains issus des levains du boulanger B1 sont plus plats que ceux notamment du boulanger B4. Là encore, il y a cohérence avec les observations, en cours de pétrissage, sur la tenue des pâtes plus faible pour B1 (Figure 19).

Tableau XV : Section des pains selon les levains et les farines

(Valeurs en insuffisance selon grille de suivi de panification en figure 16)

Farines	Boulangers				Moyenne / Farine
	B1	B2	B3	B4	
F1	4	4	4	7	4,8 ±1,5
F2	4	7	7	7	6,3 ±1,5
F3	1	5,5	4	10	5,1 ±3,8
F4	1	7	4	7	4,8 ±2,9
F5	1	4	4	7	4,0 ±2,4
F6	7	7	7	10	7,8 ±1,5
Moyenne / levain	3,0 ±2,4	5,8 ±1,5	5,0 ±1,5	8,0 ±1,5	MA : 4,6 ±0,46 MM : 6,3 ±1,22

6.3. Acidité et pH des pains

Les tableaux XVI a) et b), présentent les valeurs moyennes de pH et d'acidité titrable totale (TTA) des pains obtenus avec les différents levains en fonction des farines et des levains boulangers.

Les mesures du pH et de l'acidité titrable totale des levains sont présentées Figures 15 a) et b).

Les résultats de pH des pains (Tableau XVI a) sur les 6 farines confirment que tous les pains ne peuvent rentrer dans une appellation « Pain au levain de tradition française » dont la base de pH est au maximum de 4,3 (Décret Pain 93...) . Seuls les boulangers B2 et B3 pourraient prétendre à cette appellation à condition de répondre au critère de 900 ppm minimum d'acide acétique.

Tableau XVI a) et b) : pH et TTA des pains selon les farines et boulangers
(MM : Mélange Moderne, MA Mélange Ancien) (Farines anciennes en grisé)

Farine	pH					TTA				
	B1	B2	B3	B4	Moyenne	B1	B2	B3	B4	Moyenne
F1	4,61	4,24	4,22	4,39	4,36±0,16	7,39	9,17	8,99	8,48	8,51±0,7
F2	5,18	4,32	4,23	4,57	4,57±0,37	5,59	7,55	8,77	7,37	7,32±1,1
F3	4,92	4,28	4,24	4,40	4,46±0,27	6,97	7,93	7,89	6,99	7,45±0,5
F4	4,29	4,27	4,14	4,44	4,29±0,11	8,21	7,72	8,83	7,03	7,95±0,6
F5	5,05	4,31	4,18	4,51	4,51±0,33	6,61	8,79	9,16	8,37	8,23±1,0
F6	4,31	4,20	4,15	4,44	4,28±0,11	8,89	9,24	9,91	7,4	8,86±0,9
Moy.	4,73±0,35	4,27±0,04	4,19±0,04	4,46±0,06	MA : 4,44±0,06 MM: 4,38±0,13	7,28±1,1	8,40±0,7	8,93±0,6	7,61±0,6	MM: 8,06±0,45 MM: 8,04±0,6

Selon les farines, le pH moyen varie de 4,28 pour F6 à 4,51 pour F5. Si l'on considère les boulangers, le pH moyen varie de 4,19 pour B3 à 4,73 pour B1. L'origine du levain conduit donc à des variations plus forte que le facteur farine. Les levains B1 et B4 présentent les valeurs de pH les plus élevées.

Les valeurs de TTA (Tableau XVI b) varient globalement de 5,6 à 9,9 mL NaOH /g et sont en accord avec les valeurs de pH. A noter que pour un boulanger donné, les valeurs de TTA des pains sont corrélées avec la TTA des levains et que celle-ci est donc prédictive de l'acidité des pains. Les pains B1 présentent les variations les plus fortes de pH et TTA, d'une farine à l'autre. Les pains issus des levains des Boulangers B1 et B4 sont significativement moins acides que les pains issus des levains B2 et B3. Il faut sans doute voir ici, entre autres hypothèses, un effet de compétition entre la microflore levures et la flore lactique. Les levains B1 et B4, avec l'espèce *S. cerevisiae* majoritaire (Tableau IX), pourraient voir leur microflore lactique être moins active en termes d'acidification.

Il n'apparaît pas de différences significatives entre Mélanges Anciens et Modernes que ce soit sur les données de pH ou de TTA, et ce pour chaque boulanger ou pour les valeurs moyennes MA/MM.

6.4. Teneur en maltose des pains

La teneur en différents composés glucidiques (glucose, fructose, maltose, ...) des pains a été analysée par Chromatographie HPLC. Les résultats concernant le maltose sont présentés Tableau XVII.

Tableau XVII : Teneurs en maltose (g/kg) mesurées sur les pains (MA Mélange Ancien, MM Mélange Moderne) (Farines anciennes en grisé)

Farine	Boulangier				Moyenne
	B1	B2	B3	B4	
F1	2,6	3,1	3,4	2,0	2,8 ±0,5
F2	4,2	6,8	5,0	4,0	5,0 ±1,1
F3	3,1	3,9	2,3	1,7	2,8 ±0,8
F4	3,5	6,7	4,5	3,5	4,6 ±1,3
F5	5,5	4,7	3,0	2,9	4,0 ±1,1
F6	3,6	5,5	3,8	2,6	3,9 ±1,0
Moyenne	3,8 ±0,9	5,1 ±1,4	3,7 ±0,9	2,8 ±0,8	MA : 3,2 ±0,6 MM : 4,5 ±0,5

L'analyse du maltose résiduel des pains permet d'envisager une relation avec le dégagement de CO₂ et les levures des levains. Les levains du boulanger B4, caractérisés par une forte production gazeuse (Figure 23), présentent les teneurs moyennes en maltose les plus faibles. La moyenne obtenue avec les boulangers B1, B3 et B4 est inférieure à la moyenne des levains du boulanger B2. Les levains des boulangers B1 et B4 dans lesquels la levure *S. cerevisiae* est dominante (Tableau IX), ont une activité levurienne supérieure (Nombre de levures/g, production gazeuse) qui peut expliquer une plus grande consommation de maltose. Les levains du boulanger B3 contiennent également l'espèce *S. cerevisiae* (Tableau IX et Figure 14). La présence de cette levure de phénotype maltose positive (capacité à consommer utiliser le maltose comme substrat),

contrairement au genre *Kazachstania sp.* (présence dans levain B2 et aussi en B3) pourrait donc être en lien avec la teneur en maltose résiduel plus faible.

Les résultats font apparaître une moindre teneur en maltose résiduel en moyenne sur les Mélanges Anciens (F1, F3, F5), que pour les Modernes (F2, F4, F6) : $3,2 \pm 0,6$ g/kg contre $4,5 \pm 0,5$ g/kg. Ceci peut s'expliquer par la teneur en amidons endommagés plus faible des farines anciennes par rapport aux variétés modernes (Tableau VI), avec une action plus lente des amylases pour l'hydrolyse des chaînes d'amidon dans le granule. Les levures consomment en premier les substrats disponibles de la farine puis ceux issus de l'activité amylasique et en premier le glucose et ensuite le maltose. Une moindre dégradation de l'amidon conduira à un « stock » de glucides fermentescibles moindre et donc une quantité résiduelle finale plus faible.

Néanmoins et dans le cadre de cette étude, cette différence ne se traduit pas par un effet de la variété de farine sur la pousse et la production gazeuse (Figures 21 et 23), la teneur en substrats carbonés (glucose, maltose) n'étant sans doute pas limitante pour assurer la fermentation.

Il faut toutefois noter que le maltose résiduel après cuisson, peut-être la conséquence d'une différence d'hydrolyse en cours de cuisson, en fonction du taux d'amidons endommagés et de l'activité amylasique.

6.5. Teneur des pains en acides lactique et acétique et Quotient Fermentaire (QF)

Acides organiques : Acides formés par des organismes vivants. Les acides se caractérisent par la présence d'au moins une fonction COOH dans leur formule chimique. La **dissociation**, en milieu hydraté, du groupement acide (COOH), en COO^- et H^+ contribue à augmenter la concentration en ions H^+ dans le milieu et à diminuer la valeur du **pH** (**p**otentiel **H**ydrogène) du milieu (plus la concentration en ions H^+ est élevée plus le pH du milieu est bas : relation inversement proportionnelle). Cette capacité de dissociation est variable selon les acides et traduit la force d'un acide. Les acides organiques sont considérés comme des acides faibles c'est-à-dire qu'ils se dissocient plus difficilement qu'un acide fort comme l'acide chlorhydrique ou sulfurique. Ils font donc moins diminuer le pH. Dans les **levains**, on retrouve principalement de l'acide lactique et de l'acide acétique produits par les microorganismes du levain. L'acide lactique se dissocie plus que l'acide acétique, l'acide lactique est donc un acide plus fort que l'acide acétique. Par ailleurs, chaque acide possède des caractéristiques sensorielles propres.

La notion de Quotient Fermentaire (QF) : Les levains se caractérisent par la production d'acides lactique et acétique, en teneurs et proportions variables selon les microflores présentes (Flore lactique homo / hétérofermentaire, cf. paragraphe 1.1), et la conduite des levains et de la panification. A partir des données des acides lactique et acétique, il est possible de déterminer le Quotient Fermentaire (QF : Rapport molaire entre ces deux acides). Ce QF permet d'indiquer la tendance plus lactique ou plus acétique d'un pain au levain : un QF supérieur à 5 indique une fermentation à tendance lactique, un QF inférieur à 3 montre une tendance acétique. Ces variations dépendent à la fois de la nature de la flore microbienne du levain, de l'activité de cette flore, des paramètres du procédé (temps, température...).

La teneur des pains en acides organiques (acides lactique et acétique) a été analysée par HPLC (Chromatographie Liquide Haute Pression). Les valeurs estimées en g/kg sont présentées Figure 26a et le Quotient Fermentaire en Figure 26b.

Les teneurs en acide lactique varient de 4,3 à 6,9 ± 0,7 mg/kg et sont plus élevées pour les pains issus des levains B2 et B3, conformément aux mesures de TTA.

Les teneurs en acide acétique vont en moyenne par boulanger, de 0,7 à 1,5 ± 0,3 mg/kg. Ces variations, du simple au double, sur cet acide sont plus fortes que sur l'acide lactique. Les pains issus des levains B1 présentent les valeurs estimées d'acide acétique en moyenne les plus élevées (1,4 ± 0,6 mg/kg), tandis que pour le levain B4 elles sont les plus faibles (0,7 ± 0,2 mg/kg). Cette teneur en acide acétique pourrait être pénalisante, pour les levains B1, comme évoqué ci-avant, pour la production gazeuse par les levures.

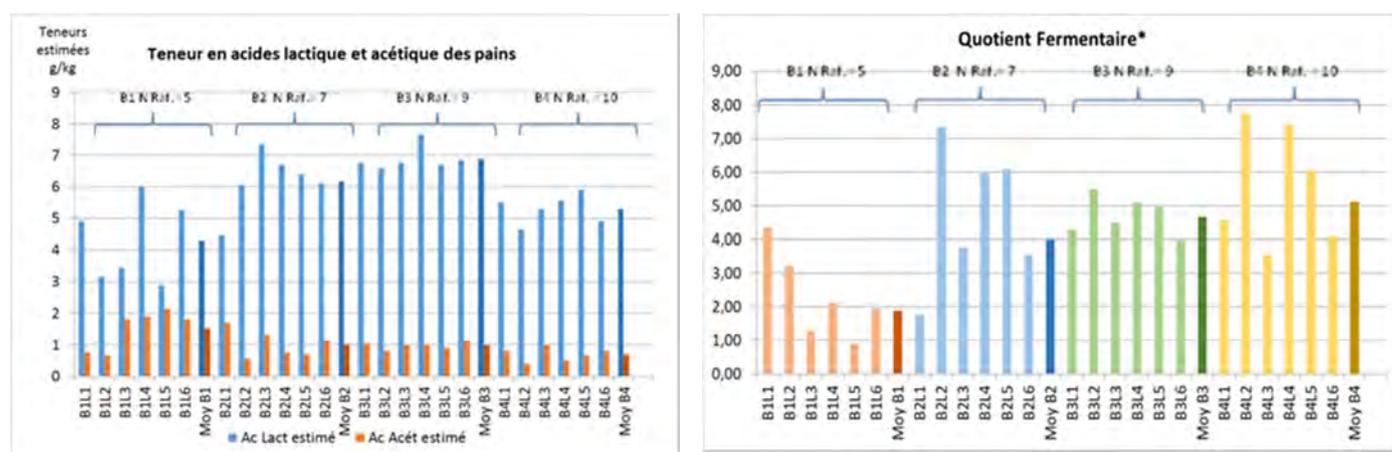


Figure 26 a et b : Teneur en acides lactique et acétique des pains (Figure 25a). Valeur du Quotient fermentaire (QF) de l'acidité lactique/acétique des pains (*QF : rapport molaire de [acide lactique] / [acide acétique])

Les Quotients Fermentaires varient de 1 à 7,75 pour l'ensemble des pains. Les levains B1 conduisent à des QF plus faibles, moins lactique et plus acétique. Les levains B4 présentent les QF les plus élevés. Il semble qu'un moindre nombre de rafraichis des levains sur la période considérée, conduise à un QF faible (B1 : 5 rafraichis B2 : 7 B3 : 9 B4 :10), plus acétique. Différents travaux tendent à montrer que des temps de fermentation longs favorisent la production d'acide acétique. Par ailleurs, la nature homo ou hétérofermentaire des flores lactiques des levains est aussi une cause possible de ces variations. Notons que la flore bactérienne des levains expérimentaux et du levain maison du boulanger B4 présentent moins de bactéries lactiques hétérofermentaires productrices d'acide acétique, que les microflores des levains des autres boulangers.

Au niveau des farines, il existe des variations au sein d'un même fournil, sauf pour B3 qui est assez homogène. Il n'apparaît pas de différence significative des teneurs en acides organiques entre farines anciennes et modernes.

Par ailleurs, la mise en relation de la teneur en acide acétique des pains et les notes d'élasticité des pâtes en cours de panification montre une relation inverse entre l'élasticité des pâtes et la concentration en acide acétique quelles que soient les farines (Figure 27).

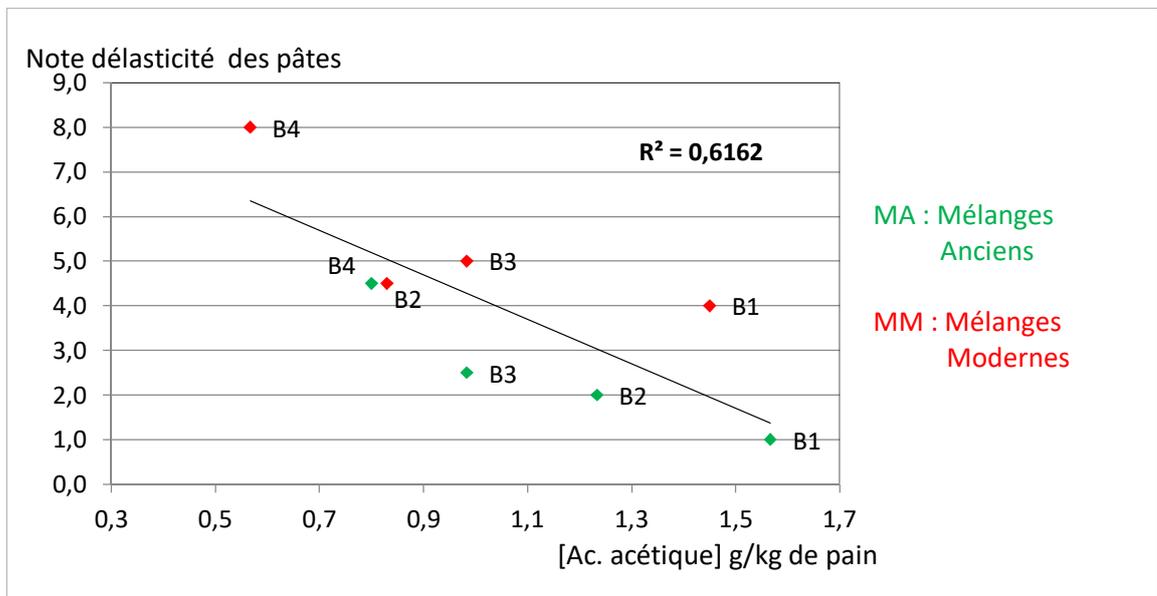


Figure 27 : Relation entre la concentration en acide acétique dans les pains et l'élasticité des pâtes

Tout se passe comme si, une moindre teneur en acide acétique, conduisait à des pâtes plus élastiques. Un tel lien n'a pas été observé ni avec l'acidité titrable totale, ni avec l'acide lactique. La teneur en acide acétique d'un levain est le résultat d'un métabolisme favorisant cet acide par rapport à l'acide lactique soit du fait de la nature des bactéries lactiques présentes (hétérofermentaires obligatoires), soit selon les paramètres de conduite du levain (N et fréquence des rafraichis, temps, ...).

La teneur en acides organiques peut avoir un effet direct sur le réseau de gluten, du fait de la modification des liaisons ioniques qu'elle engendre rendant ainsi les protéines moins liées et donc plus solubilisables. Il est cependant surprenant de constater que cet effet semble marqué par la teneur en acide acétique, dont la concentration et le coefficient de dissociation (cf. encart acides organiques, § 6.5) sont plus faibles comparativement à l'acide lactique. Face à ces constatations, il est possible d'émettre plusieurs d'hypothèses :

- le nombre de rafraichis inférieur serait un indicateur d'effets induits, notamment par une modification des propriétés des protéines et de leur stabilité, en milieu plus réducteur (cf. encart gluten § 3.3).

- les effets de stress, notamment liés à l'acidité et à l'acide acétique, sur les microorganismes pourraient de ce fait libérer dans le milieu des éléments réducteurs dans la pâte.

6.6. Comparaison des caractéristiques biochimiques des pains par boulanger

Des données biochimiques plus complètes incluant des métabolites issus de l'activité levurienne (Glycérol, éthanol et CO₂ à 4 h) ont été prises en compte et sont présentées dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : Bilan des principales caractéristiques physico-chimiques des pains et pâtes (Moyenne des 6 levains par boulanger)

Boulangier	Caractéristiques des pains								Pâtes
	pH	TTA (mL NaOH /10g)	Ac Lactique (g/Kg)	Ac Acétique (g/Kg)	Quotient Fermentaire	Glycérol (g/Kg)	Ethanol (g/Kg)	CO ₂ mMol /100g à 4h	
B1	4,73 ±0,35	7,28 ±0,07	4,28 ±1,17	1,51 ±0,58	1,89 ±1,17	1,83 ±0,27	0,64 ±0,54	5,8	
B2	4,27 ±0,04	8,40 ±0,69	6,18 ±0,89	1,03 ±0,40	4,02 ±1,89	0,98 ±0,33	0,42 ±0,19	4,2	
B3	4,19 ±0,04	8,93 ±0,60	6,88 ±0,35	0,98 ±0,11	4,67 ±0,52	0,18 ±0,25	0,23 ±0,23	4,0	
B4	4,46 ±0,06	7,61 ±0,60	5,30 ±0,42	0,69 ±0,20	5,11 ±1,62	1,88 ±0,24	1,42 ±0,53	13,5	

Tout se passe comme si les levains B1 et B4 favorisaient les marqueurs d'activités des levures (Glycérol, Ethanol, CO₂ à 4h) confirmant ainsi les observations sur la pousse et le volume des pains. Parallèlement les marqueurs d'activités des bactéries lactiques (acide lactique, TTA et pH) hormis l'acide acétique, témoignent d'une relative moindre activité des bactéries lactiques pour ces mêmes échantillons B1 et B4. Les deux groupes de levains B1 et B4 sont caractérisés par une flore levurienne marquée par une dominance de *S. cerevisiae* de type maltose positive. Les levains B2 et B3 sont eux caractérisés par une flore levurienne plutôt dominée par l'espèce *Kazachstania sp.* de type maltose négative. Il est possible d'émettre l'hypothèse qu'en présence de *S. cerevisiae*, il y ait concurrence pour les substrats entre cette espèce levurienne et la microflore lactique et ce au profit de la levure. Les levains B2 et B3 présentent quant à eux un profil métabolique plus acidifiant (pH, TTA, acide lactique), avec une possible moindre

compétition entre les levures et les bactéries lactiques, mais aussi une activité levurienne moins importante liée aux espèces de levures présentes.

Si le lien entre flores microbiennes et caractéristiques des levains est observable, les conditions d'implantation de la microflore d'un levain et la nature des interactions au sein de l'écosystème entre levures et bactéries lactiques ne sont pas explicites. De plus, il convient de préciser qu'au sein d'une espèce microbienne, il existe des variations qui peuvent être importantes, d'une souche à une autre. Cette diversité intra-spécifique rend à la fois difficile les généralisations à partir d'une fiche d'identité d'un levain mais c'est aussi, au sein d'un levain, un gage de résilience face à des changements de facteurs environnementaux. C'est le caractère vivant d'un levain qui ressort ici.

Une analyse plus complète, non abordée dans cette synthèse, intégrant d'autres composés biochimiques des pains, comme les composés volatils, les éléments minéraux, fait apparaître un effet des facteurs levain, terroir et variété (anciennes/modernes) sur un certain nombre de marqueurs (Thèse Elisa Michel).

Conclusion

Le projet a permis de réaliser, dans un premier temps, une caractérisation microbiologique des levains sur le territoire français de différents boulangers ayant un environnement de travail exempt de ferments industriels et très lié aux pratiques agricoles paysannes. Plusieurs souches nouvelles de levures dans des levains ont été identifiées. Les pratiques (artisan / paysan boulanger) ont un impact sur la biodiversité des levains. La diversité des pratiques et des levains conduit à des caractéristiques des pains, en termes de pH et d'acidité acétique, qui ne permettent pas théoriquement de respecter dans le cadre réglementaire très restrictif du pain de tradition française au levain. Il serait nécessaire par transparence vis-à-vis du consommateur d'avoir une appellation spécifique comme « pain au levain naturel » qui soit représentatif de cette diversité.

Dans un deuxième temps et de façon plus spécifique, l'élaboration de levains, à partir de différentes farines, dans différents fournils choisis et leur mise en œuvre dans un processus de panification de référence conduit à différentes observations :

- Les levains ont montré **des effets prépondérants par rapport à ceux des farines.**
- **L'élaboration et la conduite du levain impacte la flore microbienne et l'activité du levain chef.**

Le nombre de rafraichis doit être suffisant et régulier pour permettre une activité suffisante et optimale du levain, notamment des levures, tout en favorisant le maintien de la qualité technologique des pâtes.

L'environnement du fournil est confirmé comme ayant un effet direct sur la microflore qui s'implante dans un levain. Le nombre de rafraichis lors de l'élaboration du levain semble être un des facteurs déterminants de l'équilibre quantitatifs et qualitatifs de l'écosystème microbien.

- **Les variétés de farines présentent des caractéristiques différentes.**

Les variétés choisies pour les mélanges anciens et modernes permettent de bien distinguer deux populations sur les aspects qualitatifs et quantitatifs des protéines et du

gluten, sur la dureté des grains, le taux d'amidons endommagés et sur la granulométrie des farines et sont conformes aux différences souvent observées entre ce deux types de blé. Notre échantillonnage permet donc de bien caractériser et distinguer Mélanges Modernes et Anciens représentatifs de la diversité des blés utilisés par les paysans et artisans boulangers bio. Dans ce contexte, il était intéressant de voir si les levains pouvaient de manière spécifique apporter une valeur ajoutée en panification.

Il a été observé des comportements différents en cours de panification, notamment en termes d'hydratation et d'élasticité des pâtes, plus importantes pour les variétés modernes.

Par contre, dans le cadre de la mise en œuvre d'un procédé de référence commun à toutes les farines, il n'y a pas d'effets observés des variétés anciennes et modernes sur la pousse, ni sur le volume des pains. En revanche, la structure alvéolaire apparaît plus ou moins régulière selon les variétés.

- **Le levain impacte les caractéristiques des pâtes et des pains.**

Les caractéristiques des levains influencent celles des pâtes et des pains : résistance élastique, tenue des pâtes, production gazeuse, pousse et structure alvéolaires des pains. Les métabolites issus de l'activité du levain, notamment les acides organiques sont dépendants du levain. Il s'en suit, qu'à procédé identique, les caractéristiques du pain telles le pH, l'acidité, le Quotient Fermentaire, mais aussi les composés volatils, sont impactées par le levain.

Ces caractéristiques associées aux propriétés physiques des pâtes (volume, structure alvéolaire), ont un impact sur les qualités sensorielles du pain final.

Dans les conditions de l'étude et de la mise en œuvre des levains, la nature des microflore présentes influencent les caractéristiques des pains. Cependant, cette observation se devrait d'être prise en compte par une conduite de l'essai de panification différenciée et adaptée selon les caractéristiques et fonctionnalités des levains.

La conduite des levains demande une vigilance particulière à la régularité des pratiques et une attention à l'observation du comportement du levain. Si la diversité des blés

impactent les caractéristiques des farines, l'environnement boulanger et les pratiques semblent avoir plus d'influence sur l'identité et les propriétés des levains.

- **La nature du lien de cause à effet entre levain et caractéristiques des pâtes et pains reste hypothétique.**

Les variations de l'élasticité et de la résistance, de la pousse, de l'alvéolage et du volume des pains semblent à la fois liées à plusieurs facteurs ou hypothèses.

Une population microbienne plus élevée en bactéries lactiques et levures peut impacter l'activité fermentaire et la structure alvéolaire au niveau des origines de nucléation des alvéoles. De même, les propriétés du réseau de gluten en lien avec les blés d'origine vont impacter la structure alvéolaire.

Le nombre de rafraichis variable peut avoir un impact sur l'oxydation des constituants et sur la proportion d'acide acétique. Ces deux phénomènes affectent l'état de cohésion ou d'agrégation du gluten. Un faible rapport acide lactique/acide acétique, autrement dit, une plus faible teneur en acétate serait associé à une plus grande élasticité de la pâte. L'acide acétique ici pourrait aussi être un marqueur de la nature des microflore et de la durée de la fermentation. Ce type d'influence semble indépendant de l'origine des blés (anciens ou modernes), mais plus dépendant du levain et de sa conduite.

Au final, l'approche participative appliquée dans le projet, a permis à la fois des mises en expérimentation proches du terrain, une appropriation des résultats par les professionnels et également des approches croisées entre technologie et science plus fondamentale.

L'expérience menée montre l'impact de la diversité des pratiques et des environnements sur les caractéristiques et les propriétés des levains, cette diversité est un gage de différenciation des produits et de leur diversification. Une meilleure connaissance des liens possibles entre pratiques agricoles, pratiques de transformations des produits, fonctionnalités et caractéristiques de produits et le partage de ces éléments de connaissance est aussi un élément de la durabilité de la filière en permettant aux professionnels d'adapter leurs pratiques.

Dans un contexte de questionnements sur le maintien de la biodiversité globale, il nous paraît essentiel de considérer aussi cette biodiversité à l'échelle microbienne à la fois parce qu'elle est la base de la diversité globale et que cette diversité entretient des écosystèmes qui, appliqués à la production d'aliments, pourraient être favorables à la diversité des produits fermentés, de leurs propriétés et des métabolites associés. La consommation de ces produits, issus de pratiques favorisant la diversité, aurait donc un impact à la fois sur la biodiversité générale et la qualité de l'alimentation à travers sa variété.

Principales références bibliographiques :

- CNERNA, 1977. Le pain. Recueil des Usages des Pains en France CNRS, Paris, 243-306.
- Gobetti M. and Gänzle M. (2013) Handbook on sourdough biotechnology. Springer Science & Business Media.
- ITCF (1972). Contrôle de la qualité des blés, guide pratique. ITCF, Paris. 131-134.
- Lhomme E., Dousset X., Onno B. (2016). Les levains de panification : Microbiote et Fonctionnalités. Ed, Editions Universitaires Européenne.
- Lhomme E., Urien C., Legrand J., Dousset X., Onno B., Sicard D. (2016) : Sourdough microbial community dynamics: An analysis during French organic bread-making processes; Food Microbiology, Volume 53, 41-50.
- Michel E. (2018). Dispersion, sélection et rôle des espèces microbiennes des levains en boulangerie française à faibles intrants. Thèse Université Montpellier SupAgro.
- Michel E., Montfort C., Deffrasnes M., Guezenc S., Lhomme E., Barret M., Dousset X., Sicard D., Onno B. (2016). Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods. International Journal of Food Microbiology 239, 35-43.
- Onno B., Roussel P. (1994) Technologie et microbiologie de la panification au levain, in *Les bactéries lactiques*, Tome II, Ed LORICA (38410 URIAGE), 310-312.
- Roussel P., Onno B. et Sicard D. (2020) La panification au levain naturel – Glossaire des savoirs, Ed. QUAE.
- Tripto 2014 Doc. Feuille d'essai expérimentation boulange. <https://www.triptoleme.org/recherche-et-publications>.
- Tripto 2014 Doc. Glossaire expérimentation boulange. <https://www.triptoleme.org/recherche-et-publications>.
- Tripto (2017-1). Mesure de dureté des grains. <https://www.triptoleme.org/recherche-et-publications>.
- Tripto (2017-2). Expérimentation mouture PaysBlé. <https://www.triptoleme.org/recherche-et-publications>.
- Tripto (2017-3). Tripto 2017 Art. Expérimentation boulange PaysBlé. <https://www.triptoleme.org/recherche-et-publications>
- Urien C., Legrand J., Montalent P., Casagerola S. and Sicard D. (2019). Fungal Species Diversity in French Bread Sourdoughs Made of Organic Wheat Flour; Front. Microbiol. ; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00201>
- Zheng J., Wittouck S., Salvetti E. *et al.*, (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107> ; open access DOI: <https://doi.org/10.7939/r3-egnz-m294>