



**HAL**  
open science

# Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité

Marcia Leyva Salas

## ► To cite this version:

Marcia Leyva Salas. Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0058 . tel-02080859

**HAL Id: tel-02080859**

**<https://theses.hal.science/tel-02080859>**

Submitted on 27 Mar 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600  
*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*  
*Spécialité : Microbiologie, Virologie, Parasitologie*

Par

**Marcia LEYVA SALAS**

## **Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité**

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 6 novembre 2018

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA 3882)  
Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA (UMR1253)

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Nathalie DESMASURES Professeure, Université de Caen Normandie  
Christophe MONNET Chargé de Recherches, INRA Grignon

### **Composition du Jury :**

Présidente : Marie-Christine CHAMPOMIER-VERGES Directrice de recherches, INRA Jouy en Josas  
Examineurs : Nathalie DESMASURES Professeure, Université de Caen Normandie  
Christophe MONNET Chargé de Recherches, INRA Grignon

Dir. de thèse : Emmanuel COTON Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest  
Co-dir. de thèse : Anne THIERRY Chargée de recherche INRA, Rennes

### **Invité**

Laurence ABRAHAM Responsable laboratoire Ferments RD, Sodiaal Fromages



Cette thèse, réalisée en co-encadrement entre le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM) de l'Université de Bretagne Occidentale et l'Institut National pour la Recherche en Agronomie (INRA) – Sciences et Technologie du Lait et de l'Œuf (STLO), s'intègre dans le projet interrégional « Assemblages protéiques multi-fonctionnels pour l'innovation en industrie laitière » (PROFIL), coordonné par l'INRA (J. Léonil) et géré par l'association Bretagne Biotechnologies Alimentaires (BBA), l'INRA–STLO et le Pôle Agronomique Ouest (PAO), avec le soutien financier des régions Bretagne et Pays de la Loire

*“Only those who will risk going too far can possibly find out how far one can go.”*

*— T.S. Eliot*

# Remerciements

La thèse de doctorat constitue un travail scientifique au long cours et pour cette raison, il est loin d'être un travail solitaire. Ces trois années passées au sein du LUBEM et du STLO m'ont donné l'occasion de rencontrer des personnes conviviales, passionnées et passionnantes, qui, à travers les échanges que j'ai eus avec elles, ont rendu cette aventure agréable et enrichissante aussi bien au niveau personnel que professionnel. Vos contributions, vos précieux conseils et votre soutien au quotidien m'ont permis de mener ce projet à bien. À l'issue de cette thèse, je souhaite donc remercier toutes les personnes qui de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de ce travail de trois ans.

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et me faire profiter ainsi de leur expertise.

Merci aux régions Bretagne et Pays de la Loire, à l'association BBA, aux industriels investis et partenaires académiques pour le financement et le pilotage de ce merveilleux projet PROFIL, et plus particulièrement ceux du comité technique de l'axe 1 dont cette thèse fait partie. Merci à Joëlle Léonil pour la coordination scientifique et à BBA pour la gestion du projet. Un grand merci à Morgane Raison et Stéphan Rouverand pour leur accompagnement et leur implication dans PROFIL.

Mes remerciements les plus sincères à mon directeur de thèse le professeur Emmanuel Coton, également directeur du LUBEM, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire. Merci tout particulièrement pour avoir dirigé ma thèse avec ton optimisme inconditionnel, ton aide, ta disponibilité et ta bienveillance pendant ces trois années.

Je remercie chaleureusement ma co-directrice de thèse, Anne Thierry, merci pour ton énergie et ton implication à chaque étape de ce projet. Merci pour l'intérêt que tu as porté à ma vision de ce sujet de thèse et pour la rigueur pour m'aider à organiser mes idées. J'ai beaucoup apprécié ton encadrement dynamique au quotidien et ta réactivité pendant ces trois années.

D'énormes remerciements pour Jérôme Mounier et Florence Valence, pour leur incroyable gentillesse et leur disponibilité. Merci pour tout ce que vous m'avez appris et pour tout le temps que vous m'avez consacré.

Merci à vous quatre pour la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de travailler sur ce projet. Merci pour votre investissement dans l'écriture des articles et dans la correction de mon manuscrit. La complémentarité des compétences que vous avez, la motivation... Je n'aurais pas pu avoir un meilleur soutien pour ma thèse. Ensemble, vous avez réussi à transmettre une méthode, une vision de la science et un état d'esprit qui, je le crois, auront un grand impact sur la scientifique que je serai. J'ai pris plaisir à travailler avec vous pendant ces trois années.

Le LUBEM est un laboratoire accueillant et une équipe qui m'a accompagnée dans ce projet. Un grand merci à Audrey pour m'avoir guidée à mon arrivée, Monika pour les nombreux conseils prodigués sur le fonctionnement de su spectromètre de masse; Franck pour ses conseils sur les champignons ; Jean-Luc, Adeline, Laurence, Marie-Elisabeth, Flora, Stéphanie, Nolwenn, Gaëtan Le Floch, Karim, Valérie, Gaëtan Burgaud et Patrice pour nos échanges ; Stella, Elisabeth, Christophe et Christelle pour m'avoir toujours rendu service quand je vous sollicitais ; Marie-Hélène, Marielle, Anne-Cécile et Dominique

pour votre gentillesse. Un travail de thèse c'est aussi beaucoup de temps passé devant un ordinateur... et je remercie donc mes colocataires de bureau et les autres doctorants pour lesquels nos chemins se sont croisés, Lucille pour avoir partagé ses connaissances du projet PROFIL ; Marie-Caroline, Nicolas, Fabienne, Annie, Laura, Guillaume, Marine, Thibaut, Maxence et Vincent pour les échanges ; aux post-docs avec qui j'ai pu échanger au cours de ces trois ans, Ricardo et Jose.

Enorme merci au STLO. Je n'oublierai jamais votre accueil, votre bienveillance et vos sourires pendant ces trois années. Un merci particulier à Paulette et Jessica pour le soutien logistique, Laurence, Danielle et Nathalie pour leur aide administratives et les nombreuses fiches de déplacement Brest-Rennes, Anne pour son aide à trouver des publications, Rachel pour m'avoir appris les *mind-maps* et l'aide rédactionnelle, Valérie pour ta disponibilité et tes conseils, Stéphane et Sébastien pour leur expertise en statistique, Aurélie pour nos échanges, Christelle pour tes connaissances en globules gras, Marie-Bernadette ma voisine du bureau rennais pour m'avoir formée et m'aidée à analyser une quantité énorme d'échantillons, l'équipe microbiologie pour les diverses échanges et avoir assisté à mes ateliers de rédaction, Gilles, Marielle, Manon pour votre expertise et la quantité d'heures passées à la Plateforme Lait, Marie-Noelle et Bénédicte pour m'avoir toujours rendu service quand je vous sollicitais. Merci aux doctorants Houem, Floriane, Natayme, Omaima, Elma, et Alexia pour nos échanges.

Merci également aux stagiaires qui ont participé à ce projet : Mégane, Mathilde, Marine, Charles, Mickaël, Elen et Baptiste, pour votre aide, votre gentillesse et votre bonne humeur quotidienne.

Enfin, un grand merci à celles et ceux qui me sont le plus chers, et qui extérieurs à cette thèse m'ont soutenue, aidée et supportée pendant ces trois ans. Au-delà des mots de remerciements que je peux écrire ici, sachez que votre présence m'est essentielle. Tout cela ne serait jamais arrivé sans mes parents et grands-parents, qui avez su me donner toutes les chances de réussite professionnelle et également personnelle, pour les années passées et celles à venir. Merci pour m'avoir donné l'opportunité d'arriver jusqu'ici.

*Finalmente, muchas gracias a mis seres queridos, que fuera del contexto de la tesis me han apoyado, y ayudado antes y durante estos 3 años. Muy aparte de lo que escribo aquí, sepan que su presencia es esencial. Todo esto no hubiera jamás sucedido sin mi primer apoyo, mis padres y abuelos, ustedes me han dado todas las posibilidades de éxito profesional así como personal. Gracias por tanto amor y la oportunidad de llegar aquí.*



# Table des matières

<i>Chapitre I. Introduction</i> .....	<b>1</b>
<b>Problématique</b> .....	<b>2</b>
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Perspectives historiques sur les produits fermentés</b> .....	<b>5</b>
1.1. Définition et origine des produits fermentés .....	5
1.2. Histoire des produits laitiers fermentés .....	7
<b>2. Diversité des produits laitiers fermentés</b> .....	<b>11</b>
2.1. Production du lait .....	11
2.2. Composition du lait .....	12
a. Eau .....	12
b. Matière grasse .....	13
c. Protéines laitières .....	14
d. Lactose .....	19
e. Les minéraux .....	19
2.3. Types de produits laitiers fermentés .....	20
a. Lait fermenté .....	20
b. Fromage .....	23
<b>3. Microbiologie des produits laitiers fermentés</b> .....	<b>25</b>
3.1. Le microbiote du lait comme source de ferments .....	25
3.2. Complémentarité des méthodes de caractérisation du microbiote du lait .....	26
3.3. Grands groupes de micro-organismes et leur contribution .....	27
a. Micro-organismes ensemencés .....	28
b. Micro-organismes non-ensemencés .....	30
<b>4. Bactéries lactiques des produits laitiers</b> .....	<b>32</b>
4.1. Définition et taxonomie des bactéries lactiques .....	32
4.2. Ecologie des bactéries lactiques .....	35
4.3. Classification des bactéries lactiques selon leur métabolisme des glucides .....	36
4.4. Fermentation des sources de carbone du lait .....	39
4.5. Conversion des constituants du lait .....	39
4.6. Propriétés technologiques des bactéries lactiques .....	42
a. Acidification .....	42
b. Production de composés d'arômes .....	43
c. Production d'exopolysaccharides .....	43
d. Innocuité des bactéries lactiques .....	44
<b>5. Contrôle des contaminations fongiques</b> .....	<b>46</b>
5.1. Contaminations fongiques des produits laitiers .....	46
5.2. Bioprotection par des bactéries lactiques .....	47
5.3. Bactéries lactiques bioprotectrices : applications et mécanismes d'action .....	49
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>90</b>
<i>Chapitre II. Résultats</i> .....	<b>94</b>
<b>Partie 1. Développement de cultures antifongiques pour la bioprotection des produits laitiers</b> .....	<b>95</b>
<b>Annexes I</b> .....	<b>124</b>
<b>Annexes II</b> .....	<b>128</b>
<b>Annexes III</b> .....	<b>135</b>
<b>Parti 2. Identification des composés antifongiques supports</b> .....	<b>142</b>
<i>Chapitre III. Discussion générale et perspectives de travail</i> .....	<b>181</b>
<b>Références</b> .....	<b>202</b>
<b>Valorisation de la thèse</b> .....	<b>221</b>

# Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Composition en acides gras de la matière grasse du lait de vache (adapté de Kailasapathy, 2015).....	14
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques des caséines du lait (adapté de Kailasapathy, 2015).....	15
<b>Tableau 3.</b> Principales différences entre les propriétés physiques et chimiques des caséines et celles des protéines sériques (adapté de Chandan and Kilara, 2013) .....	18
<b>Tableau 4.</b> Types de laits fermentés, produits et micro-organismes associés à la fermentation (adapté de Macori and Cotter, 2018).....	21
<b>Tableau 5.</b> Types de fromages et micro-organismes associés (d’après Desmasures et al., 2015; Fox et al., 2016 et <a href="http://www.produits-laitiers.com">www.produits-laitiers.com</a> ) .....	24
<b>Tableau 6.</b> Classification des micro-organismes du fromage selon leur rôle principal dans les produits laitiers fermentés .....	27
<b>Tableau 7.</b> Taxonomie actuelle des bactéries lactiques de l'ordre des <i>Lactobacillales</i> dans la branche <i>Clostridium</i> (adapté de König and Fröhlich, 2017).....	34
<b>Tableau 8.</b> Classification des bactéries lactiques selon leur métabolisme (adapté de Collins et al., 1991; Felis and Dellaglio, 2007; Wood and Holzappel, 1995) .....	38
<b>Tableau 9.</b> Bactéries lactiques bioprotectrices ajoutées en tant que ferment additionnel à activité antifongique dans des produits laitiers (données de la littérature sur la période 2014-2018) .....	88

# Figures

<b>Figure 1.</b> Types de produits fermentés (adapté de Steinkraus, 1997).....	6
<b>Figure 2.</b> Développement des produits laitiers au cours de l'histoire .....	8
<b>Figure 3.</b> Utilisation du total du lait de vache collecté pour la fabrication de produits laitiers en 2016, France (adapté de CNIEL, 2017) .....	11
<b>Figure 4.</b> Composition du lait (adapté de Kailasapathy, 2015) .....	12
<b>Figure 5.</b> Représentation schématique de la micelle de caséines (tiré de Dalgleish, 2011) .....	16
<b>Figure 6.</b> Proportions moyennes (% des protéines totales) des principales protéines du lait de vache au printemps (mars-mai) (adapté de Gellrich et al., 2014).....	18
<b>Figure 7.</b> Concentrations des minéraux majeurs et du citrate dans le lait de vache (adapté de Chandan and Kilara, 2013).....	19
<b>Figure 8.</b> Arbre phylogénétique représentant la relation entre les familles de l'ordre des Lactobacillales basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S. (tiré de Felis et al., 2015) .....	33
<b>Figure 9.</b> Evolution du mode de vie des lactobacilles (adapté de Duar et al 2017).....	35
<b>Figure 10.</b> Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques (adapté de Wee et al., 2006).....	37
<b>Figure 11.</b> Voies métaboliques conduisant à la formation des principaux composés d'arômes par les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires dans les produits laitiers fermentés. (adapté de Atlan et al., 2008; Thierry et al., 2015) .....	40
<b>Figure 12.</b> Schéma du contenu de l'Article 1: ' <i>Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review</i> ' .....	50
<b>Figure 13.</b> Diagramme représentant les interactions possibles entre les produits laitiers fermentés, les contaminants fongiques et les cultures antifongiques en tant que ferments additionnels dans un contexte de bioprotection.....	87
<b>Figure 14.</b> Récapitulatif du contenu de la synthèse bibliographique du Chapitre I et des différentes étapes des travaux de thèse présentés en 2 parties dans le Chapitre II. ....	93
<b>Figure 15.</b> Photos des fromages à pâte pressée. ....	125
<b>Figure 16.</b> Photos des fromages à pâte pressée. ....	126
<b>Figure 17.</b> Représentation des différences entre deux fabrications de fromages par analyse en composantes principales (ACP) : .....	127
<b>Figure 18.</b> Diagramme représentant les interactions possibles entre les cultures antifongiques en tant que ferments additionnels producteurs des composés antifongiques, les cibles fongiques et les produits laitiers fermentés dans un contexte de bioprotection. Les aspects étudiés dans cette thèse sont indiqués en noir et en gras. ....	183

## Abréviations

<b>ACP :</b>	Analyse en composantes principales
<b>AD:</b>	Analyse discriminante
<b>AF :</b>	Antifongique
<b>a<sub>w</sub> :</b>	Activité de l'eau
<b>BBA :</b>	Bretagne Biotechnologie Agroalimentaire
<b>CE :</b>	Commission Européenne
<b>CEE :</b>	Communauté Economique Européenne
<b>CIRM-BIA :</b>	Centre International de Ressources Microbiennes – Bactéries d'Intérêt Alimentaire
<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CNIEL :</b>	Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Dioxyde de carbone
<b>DLC :</b>	Date Limite de Consommation
<b>EFFCA:</b>	<i>European Food and Feed Culture Association</i>
<b>EFSA:</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>FAO:</b>	<i>Food and Agricultural Organization</i>
<b>FIL :</b>	Fédération Internationale de Laiterie
<b>GC:</b>	<i>Gas Chromatography</i> (Chromatographie en phase gazeuse)
<b>GC-MS:</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
<b>GRAS:</b>	<i>Generally Recognize As Safe</i>
<b>HACCP:</b>	<i>Hazard Analysis Critical Control Point</i>
<b>HPLC:</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>INRA :</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>ITS:</b>	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (espaceur interne transcrit)
<b>LAB :</b>	Bactéries lactiques ( <i>Lactic acid Bacteria</i> )
<b>PAB :</b>	Bactéries propioniques ( <i>Propionic acid bacteria</i> )
<b>LC-qToF:</b>	<i>Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry</i>
<b>LUBEM :</b>	Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne
<b>MFGM :</b>	<i>Milk fat globule membrane</i> (membrane du globule gras du lait)
<b>OMS :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PCR :</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PROFIL :</b>	Assemblages PROtéiques multi-Fonctionnels pour l'Innovation en Industrie Laitière
<b>QPS :</b>	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
<b>STLO :</b>	Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf
<b>UBOCC :</b>	Université de Bretagne Occidentale Culture Collection
<b>UE :</b>	Union Européenne





---

# **Chapitre I. Introduction**

---

# Problématique

Les produits laitiers, qui existent depuis des millénaires, sont consommés à travers le monde entier pour leurs qualités gustatives et nutritionnelles. En France, l'industrie laitière génère un chiffre d'affaires de 29,8 milliards d'euros, la plaçant en deuxième position du secteur agroalimentaire, après la filière viande, avec une consommation de produits laitiers parmi les plus fortes au monde (environ 27,2 kg/habitant/an de fromages en 2016) mais également une activité exportatrice en forte expansion (CNIEL, 2018). Les enjeux économiques associés à ces produits se situent donc à l'échelle nationale et mondiale.

Les produits laitiers sont sensibles aux contaminations fongiques, et ce malgré les mesures prises pour assurer leur qualité microbiologique : respect de bonnes pratiques d'hygiène et d'autres moyens de prévention et de contrôle (système Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), filtration de l'air, traitements thermiques etc.). Ces contaminations fongiques peuvent engendrer une détérioration importante des propriétés organoleptiques des produits (aspect visuel, texture, arômes), entraînant des retraits de lots et un rejet de la part des consommateurs. Ces contaminations peuvent en outre limiter leur durée de vie, et par conséquent les capacités d'exportation. Ainsi, ces contaminations génèrent des pertes économiques aussi bien au niveau industriel qu'au niveau du consommateur et sont responsables de gaspillage alimentaire. Plus précisément, on estime que chaque année, 1,3 milliard de tonnes d'aliments sont perdues ou gaspillées, dont 20% de produits laitiers (Lyons et al., 2015).

Pour éviter le développement des contaminants fongiques et augmenter la durée de vie des produits laitiers, différents conservateurs chimiques sont utilisés, tels que les acides lactique, benzoïque, acétique, propionique, sorbique et leur sels, mais aussi certains esters d'acide gras (monolaurine) ou composés phénoliques (Doyle and Buchanan, 2013; Gould, 1996). Leur utilisation (molécules autorisées, dose, type de produit alimentaire) est règlementée par le règlement de l'Union Européenne (UE) n°1129/2011.

Cependant, il existe actuellement une forte demande sociétale, soutenue par les autorités publiques, pour des aliments sans conservateurs chimiques et moins transformés, ce qui a conduit à des initiatives comme le « clean label », appellation qui se rapporte principalement à l'emploi de mots clairs et courants sur les emballages et à la réduction du nombre d'ingrédients, dont les additifs, dans les produits. D'autre part, la législation européenne (Directives

89/107/Communauté Économique Européenne [CEE] et 95/2/Conformité Européenne [CE]) tend à réduire l'utilisation des additifs chimiques en raison de la nocivité potentielle associée à la consommation de certains d'entre eux, tels que les benzoates de sodium (E211), potassium (E212) et calcium (E213) (Silva and Lidon, 2016). De plus, il faut noter que des fréquences de mutation élevées de micro-organismes cibles ont été signalées lors de l'utilisation d'agents antifongiques communs, ce qui entraîne une résistance accrue (Brul and Coote, 1999; Piper, 2011; Wang et al., 2012). Un exemple est l'utilisation de la natamycine (E235), un antibiotique antifongique produit par *Streptomyces natalensis*, autorisé dans certains fromages (Stark and Tan, 2003). Certaines cibles fongiques peuvent développer des résistances à ce conservateur (Streekstra et al., 2016).

Dans ce contexte, l'utilisation d'alternatives naturelles comme la bioprotection suscite un grand intérêt pour améliorer la stabilité microbiologique de ces aliments ou remplacer les méthodes existantes comme l'utilisation de conservateurs chimiques. La bioprotection, définie par Stiles (1996), est un moyen d'étendre la durée de vie des aliments grâce à l'utilisation de micro-organismes et/ou de leurs métabolites antimicrobiens. Depuis quelques années, le potentiel antifongique de nombreuses souches de bactéries lactiques et propioniques a été mis en évidence, révélant toute l'étendue des capacités inhibitrices de ces micro-organismes (Bai and Li, 2014; Crowley et al., 2013a; Fernandez et al., 2017; Leyva Salas et al., 2017). La production de composés antifongiques et la diminution du pH sont les principaux facteurs contribuant à l'activité antifongique des bactéries lactiques et propioniques dans les aliments. Les composés antifongiques incluent des acides organiques, des acides gras libres, des composés volatils, des dipeptides cycliques et d'autres composés de nature protéique. Ces bactéries produisent respectivement de l'acide lactique pour les bactéries lactiques et des acides propionique et acétique pour les bactéries propioniques comme principaux produits finaux de fermentation. Au-delà de ces acides majoritaires, différents composés produits par ces bactéries au cours de la fermentation peuvent agir en synergie pour inhiber les contaminants fongiques. La multiplicité et la variété des composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ou propioniques rendent difficile leur identification et leur quantification exhaustive, ainsi que l'évaluation de leur contribution à l'activité antifongique. Les composés produits par les bactéries lactiques et propioniques *in situ* dans des aliments comme les produits laitiers sont moins étudiés qu'en milieu synthétique. En conclusion, les bactéries lactiques et propioniques représentent un potentiel d'intérêt pour la bioprotection des produits laitiers, et les molécules



impliquées et leur contribution respective dans leur activité antifongique reste largement à élucider.

Ce travail de thèse se situe donc dans un contexte de bioprotection des produits laitiers. Il fait partie intégrante du projet PROFIL « *Assemblage protéique multi-fonctionnels pour l'innovation en industrie laitière* ». Ce projet interrégional a pour objectif principal d'exploiter les propriétés multifonctionnelles des protéines laitières afin de créer des produits laitiers sans additifs répondant ainsi aux attentes intrinsèques de naturalité des consommateurs et à de nouveaux usages. Les propriétés technologiques ciblées du projet PROFIL sont divisées en 4 grands axes concernant i) les propriétés antifongiques, axe dans lequel s'insère cette thèse, ii) les propriétés émulsifiantes, iii) les propriétés texturantes et iv) les propriétés de vectorisation et d'encapsulation.

La finalité de l'axe « *propriétés antifongiques* » est le remplacement des conservateurs chimiques utilisés dans l'industrie laitière par des ingrédients fonctionnalisés issus du lait, ceci afin de tendre vers des formulations 100 % laitières. Les micro-organismes étant capables de produire naturellement des composés antifongiques, il s'agit ici de les exploiter, soit comme agents de bioprotection directe c'est-à-dire les utiliser en tant que ferments, soit de façon indirecte (*e.g.* utilisation du milieu de culture après fermentation, contenant les cellules, appelé « fermentats » laitiers). Ce travail de thèse présenté ci-après s'inscrit dans la première option, à savoir développer des cultures bioprotectrices antifongiques utilisables dans une variété de matrices laitières fermentées.

# Synthèse bibliographique

## 1. Perspectives historiques sur les produits fermentés

### 1.1. Définition et origine des produits fermentés

Les aliments fermentés sont définis comme les aliments dont la production inclut une croissance microbienne contrôlée et des conversions enzymatiques des composants majeurs et mineurs de l'aliment (Marco et al., 2017). La fermentation est un processus qui a été utilisé par l'Homme depuis des millénaires. Elle joue un rôle essentiel dans la conservation des aliments, ainsi que dans l'amélioration des caractéristiques organoleptiques (flaveur, texture, couleur) et nutritionnelles des aliments.

La fermentation des aliments, via l'activité de micro-organismes, entraîne une transformation des constituants complexes en composés plus simples, dont beaucoup peuvent posséder des propriétés bioactives. Ces propriétés contribuent à assurer la sécurité sanitaire, une durée de vie étendue, des attributs organoleptiques renforcés et à diversifier les produits alimentaires (Sahu and Panda, 2018). De plus, ces dernières années, il y a un intérêt accru pour les aliments fermentés du point de vue de la nutrition et de la santé. Lorsque les humains ont évolué sur Terre, ils ont appris à éviter les aliments altérés par des micro-organismes quand leur ingestion causait des maladies ou la mort ou bien simplement du fait de leur odeur désagréable. Cependant, si la colonisation de l'aliment par les micro-organismes apportait des arômes, des saveurs et des textures attrayants, les humains ont appris à apprécier et à rechercher de tels aliments. Ce fut le début des aliments fermentés, y compris le lait fermenté, le fromage, le vin, la bière, le vinaigre, les produits lacto-fermentés en général et des centaines d'autres aliments fermentés consommés aujourd'hui (Hui et al., 2004).

Les aliments fermentés peuvent être classés en sept types (Steinkraus, 1997), illustrés par la Figure 1. La grande diversité des fermentations est directement liée à la grande variété de matières premières, de leur composition, de leurs caractéristiques physico-chimiques et des micro-organismes impliqués. Les micro-organismes impliqués dans la fermentation des aliments correspondent à des bactéries, des levures et des champignons filamenteux (uniquement en aérobiose). À ce titre, il existe quatre principaux types de fermentation des aliments sur la base des principaux micro-organismes responsables : la fermentation

bactérienne, la fermentation levurienne, la fermentation fongique et la fermentation en culture mixte (Hui and Evranuz, 2012). Les fermentations acides sont parmi les fermentations les plus anciennes et les plus importantes au monde : elles ont permis à l'espèce humaine de prospérer et elles restent importantes dans notre régime alimentaire aujourd'hui.

Les matières premières fermentées principales comprennent le lait, les fruits, les légumes et la viande. Les produits laitiers sont les aliments fermentés les plus nombreux car ils sont consommés par 6 milliards de personnes dans le monde et fournissent 6 à 7% des protéines alimentaires en Asie et en Afrique et 19% en Europe (Sahu and Panda, 2018).

Initialement, la fermentation ne reposait que sur l'activité des micro-organismes naturellement présents dans les aliments crus, à la surface des récipients utilisés pour stocker ou transformer les aliments, ou bien par un procédé connu sous le terme de *back-slopping*. Le *back-slopping* consiste en l'utilisation d'une partie de la matière provenant d'une fermentation précédente pour inoculer un substrat frais (Zannini et al., 2016). Au siècle dernier, de façon concomitante avec la production à plus grande échelle d'aliments fermentés, l'utilisation de ferments a remplacé de plus en plus le *back-slopping*.



**Figure 1. Types de produits fermentés (adapté de Steinkraus, 1997)**

## **1.2. Histoire des produits laitiers fermentés**

Le développement de la consommation de produits laitiers a été une étape critique dans le développement de l'agriculture. Les produits laitiers ont été rapidement adoptés comme composantes majeures de l'alimentation des derniers chasseurs-cueilleurs et des premiers agriculteurs de la préhistoire. La transformation du lait, en fromage par exemple, permettait non seulement de conserver le lait sous une forme moins périssable et plus facilement transportable, mais elle le rendait aussi, du fait d'une teneur réduite en lactose, plus facile à digérer pour la population à l'époque majoritairement intolérante au lactose et engendrait l'apparition de caractéristiques organoleptiques d'intérêt (Burger et al., 2007; Salque et al., 2012).

Des données historiques montrent l'évolution de la production et de la consommation des produits laitiers fermentés au cours du temps (Figure 2). Ainsi, des résidus organiques conservés dans des récipients en poterie ont fourni des preuves directes de l'utilisation précoce du lait au Néolithique au Proche-Orient et en Europe du sud-est, en Afrique du Nord, au Danemark et dans les îles britanniques (Vigne and Helmer, 2007). La découverte de résidus de lait abondants dans des vases en poterie provenant des sites du 7<sup>ème</sup> millénaire au nord-ouest de l'Anatolie a fourni les premières preuves du traitement du lait, bien que la pratique exacte n'ait pu être explicitement définie (Salque et al., 2012).

L'origine exacte des laits fermentés est difficile à établir, mais il est raisonnable de supposer qu'elle pourrait remonter à plus de 10 000 ans alors que le mode de vie des humains passait de la récolte d'aliments à la production d'aliments (Pederson, 1971). Ce changement comprenait également la domestication de certains mammifères tels que vache, brebis, chèvre, bufflonne, jument et chamelle; et il est fort probable que la transition ait eu lieu à différentes dates dans différents pays. Cependant, des preuves archéologiques concernant certaines civilisations (Sumériens, Babyloniens, Egypte ancienne et Indiens) suggèrent qu'elles étaient bien avancées dans l'agriculture et dans la production de laits fermentés. Il est probable que l'origine géographique de ces produits ait été le Moyen-Orient et les Balkans, et l'évolution des laits fermentés à travers les âges pourrait être attribuée aux compétences culinaires des habitants de ces régions (Tamime, 2002).



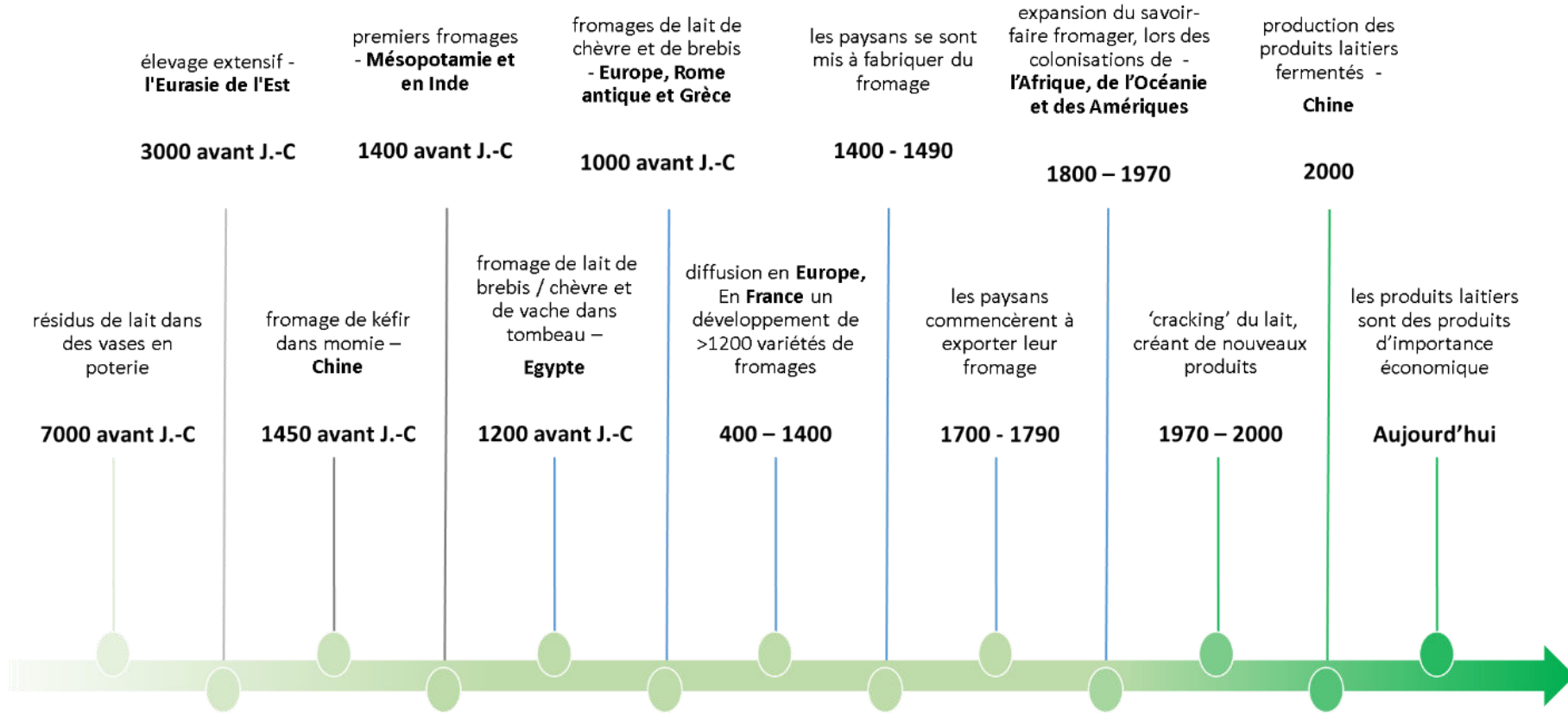


Figure 2. Développement des produits laitiers au cours de l'histoire

Concernant le fromage, il y a des preuves directes issues d'études protéomiques de la production d'un fromage de kéfir, probablement fabriqué à partir de lait écrémé de ruminant. C'est le témoignage le plus ancien qui a été trouvé, associé aux momies du cimetière de Xiaohe (1980-1450 avant J.-C.) au Xinjiang, en Chine. La production du kéfir par fermentation du lait par une culture symbiotique de *Lactobacillus kefiranofaciens* et d'autres bactéries lactiques et de levures était à la base de produits laitiers robustes, évolutifs, contenant des micro-organismes bénéfiques et sans lactose. Cette avancée technologique a induit des avantages économiques à un élevage extensif dans la population de l'Eurasie de l'Est déjà au début de l'âge du bronze (environ le 3<sup>ème</sup> millénaire avant J.-C) (Yang et al., 2014). Le XV<sup>e</sup> siècle av. J.-C. est marqué par la naissance des premiers fromages en Mésopotamie et en Inde avant leur développement dans le reste du monde (McSweeney et al., 2017). Des analyses protéomiques sur un échantillon archéologique trouvé dans un tombeau égyptien datant du le XIII<sup>e</sup> siècle av. J.-C ont montré des traces d'un fromage obtenu par mélange de lait de brebis / chèvre et de vache (Greco et al., 2018). Ensuite, c'est au 1<sup>er</sup> millénaire av. J.-C que les fromages de lait de chèvre et de brebis sont devenus des aliments quotidiens en Europe, aussi bien dans la Rome antique qu'en Grèce. C'est au Moyen-Âge que le savoir-faire fromager a été diffusé dans toute l'Europe. A cette époque, les monastères ont maîtrisé la production d'une diversité de produits laitiers notamment les fromages, jouant un rôle important dans l'essor de ces produits (McSweeney et al., 2017). L'influence monastique sur la diversité et la qualité des fromages a donc été déterminante pour le développement de ces produits et c'est en Europe, et plus particulièrement en France que les moines mirent au point des recettes variées et commencèrent à composer ce qui deviendra, avec plus de 1200 variétés de fromages, le « plus grand plateau de fromages » du monde (CNIEL, 2018). Les déplacements des moines d'un monastère à un autre ont également contribué à disséminer les différentes variétés de fromage et probablement aussi à la création de nouvelles variétés hybrides (McSweeney et al., 2017).

C'est à partir du XV<sup>e</sup> siècle que les paysans se sont mis à fabriquer du fromage pour conserver leur lait le plus longtemps possible et ainsi résister à la famine qui gagnait les campagnes. C'est seulement à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle que les paysans commencèrent à exporter leur fromage dans les villes en mettant au point des recettes pour optimiser la conservation et faciliter le transport. Enfin, l'ultime étape dans l'expansion du savoir-faire fromager à travers le monde est marquée par l'apport des compétences et connaissances des européens en matière de production fromagère lors de la colonisation de l'Afrique, de l'Océanie et des Amériques.

Enfin, pour tous les produits laitiers fermentés, la sécurisation des procédés de fabrication, grâce à la pasteurisation et à l'utilisation de ferments acidifiants, a permis le transport des produits laitiers fermentés sur de longues distances. De plus, les connaissances sur la biochimie et la microbiologie des produits laitiers se sont renforcées et ont permis de mettre en place des réglementations, notamment des normes d'hygiène, qui ont pour but de protéger le consommateur. Dans les années 1970, le '*cracking*' du lait, c'est-à-dire la séparation des différents éléments qui le constituent, a permis à l'industrie laitière d'innover en créant de nouveaux produits. Au début du XXI<sup>e</sup> siècle, la Chine commence, elle aussi, à produire et consommer des produits laitiers fermentés (McSweeney et al., 2017).

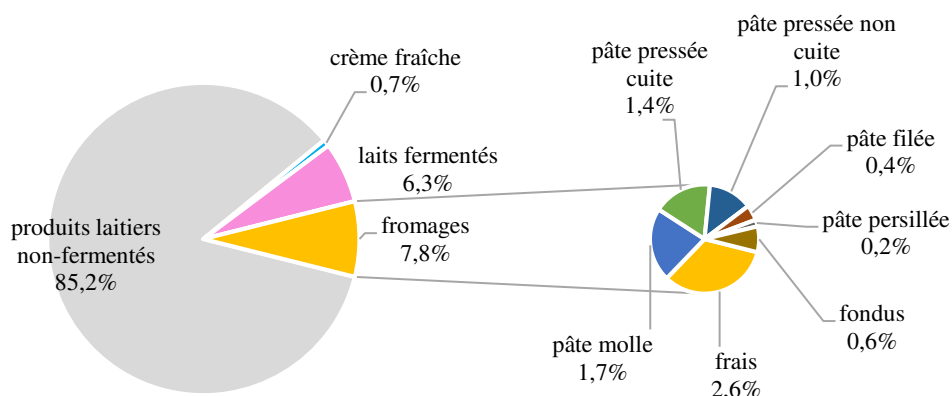
Aujourd'hui, les produits laitiers sont des produits d'importance économique majeure dans certains pays tels que les États-Unis ou la France, qui ont produit respectivement plus de 7 et près de 3 millions de tonnes de produits laitiers (fromages, beurres et lait en poudre) en 2014 (IDF, 2017). La production mondiale de lait a été de 826 milliards de litres en 2016 et devrait augmenter de 177 milliards de litres d'ici 2025 (CNIEL, 2018; FAO, 2016). Au cours de la même période, la consommation de produits laitiers par habitant devrait augmenter de 0,8% et de 1,7% par an dans les pays en développement, et de 0,5% à 1,1% dans les économies développées (FAO, 2016). Ainsi, les produits laitiers fermentés sont consommés à travers le monde entier et font l'objet d'intenses recherches, portant notamment sur leur diversité microbienne, leurs bienfaits pour la santé mais aussi sur leur qualité et leur sécurité.

## 2. Diversité des produits laitiers fermentés

Le lait entre dans la catégorie des produits laitiers et peut être consommé sous différentes formes (*e.g.* entier, demi-écrémé, écrémé, concentré). Mais le lait est également la matière première à l'origine de nombreux produits laitiers fermentés. En effet, le lait a une certaine plasticité de composition, en lien avec le patrimoine génétique des animaux (races) et en lien avec leur alimentation (Lortal and Boudier, 2011). Le lait cru contient également un microbiote naturel (Delavenne et al., 2012) ainsi que des enzymes natives (Fox et al., 2016). Ainsi, la fabrication des produits laitiers commence avec la sélection du lait. Parmi les produits laitiers fermentés on distingue deux groupes principaux : les laits fermentés comme la crème fraîche et le yaourt ; et les fromages. Chaque type de produit présente un schéma technologique différent et un microbiote particulier.

### 2.1. Production du lait

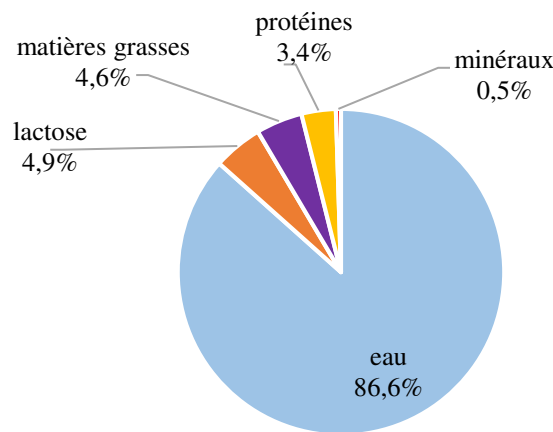
Parmi les différents types de laits produits en 2016, la production de lait de vache correspondait à 82% du total de la production mondiale, suivi par celles de lait de bufflonne (14%), de chèvre (2%), de brebis (1%) et d'autres mammifères (1%) (CNIEL, 2018). Sur la collecte totale de lait de vache en 2016, en France, 15% de la production du lait de vache est utilisée pour la fabrication de laits fermentés, crème fraîche et fromages (Figure 3) (CNIEL, 2017).



**Figure 3. Utilisation du total du lait de vache collecté pour la fabrication de produits laitiers en 2016, France (adapté de CNIEL, 2017)**

## 2.2. Composition du lait

La composition chimique du lait et son comportement physico-chimique fournissent des bases scientifiques pour comprendre les bases de la transformation du lait et la fabrication de produits laitiers. La composition du lait est généralement décrite en fonction de ses constituants commercialement importants, matière grasse du lait et matière sèche non grasse. La fraction de matière sèche non grasse se compose de protéines, de lactose et de minéraux (Kailasapathy, 2015) et constitue donc, avec l'eau et la matière grasse, les principaux constituants du lait. Comme illustré dans la Figure 4, le lait de vache entier cru contient 86,6% d'eau, 4,6% de matières grasses, 3,4% de protéines (2,8% de caséine et 0,6% de protéines sériques), 4,9% de lactose et 0,5% de minéraux (*i.e.* Ca, P, K, Cl, Mg et Na) (Kailasapathy, 2015).



**Figure 4. Composition du lait (adapté de Kailasapathy, 2015)**

### a. Eau

Parmi les principaux constituants, l'eau est le milieu dans lequel tous les autres composants du lait sont dissous ou en suspension. Dans les produits laitiers (beurre, fromage, lait en poudre), on trouve l'eau sous forme d'eau libre mais également l'eau sous forme d'eau chimiquement liée, comme l'eau d'hydratation des protéines, et du lactose cristallisé (McSweeney and Fox, 2009). L'eau influence surtout la texture, et les propriétés physiques et mécaniques des aliments.

La conservation d'un produit sur le plan microbien est contrôlée par l'eau librement disponible. Cette partie est appelée activité de l'eau ( $a_w$ ), qui représente la partie libre de l'eau disponible dans un matériau hygroscopique. Pour simplifier, l'activité de l'eau peut être définie comme le rapport entre la pression de vapeur d'eau à la surface de l'aliment et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température. Les aliments riches en humidité ont une  $a_w$  de 0,9 à 1,0 ; les

aliments semi-hydratés de 0,6 à 0,8 et les aliments secs de 0 à 0,5. Les bactéries ont besoin d'une  $a_w > 0,85$  pour leur croissance et leur métabolisme; certaines levures et moisissures nécessitent une  $a_w > 0,75$ . Les réactions enzymatiques sont ralenties avec une  $a_w < 0,8$ , mais peuvent toujours avoir lieu à une  $a_w = 0,3$ . L' $a_w$  optimale pour les réactions chimiques (réactions non enzymatiques ou réaction de Maillard) est de 0,6 - 0,7; pour l'oxydation des graisses une  $a_w > 0,3$  est nécessaire (Shah and Ravula, 2000).

## **b. Matière grasse**

La matière grasse du lait varie selon l'espèce et la race de l'animal, le stade de lactation, l'alimentation et les facteurs environnementaux (Brisson and Singh, 2013). La matière grasse du lait est constituée principalement de triglycérides d'acides gras; dans le lait de vache, ils constituent 95-96% de la matière grasse (30,7 g/L), les autres composants de la matière grasse étant les diglycérides (0,72 g/L), les monoglycérides (0,03 g/L), les acides gras libres (AGL) (0,09 g/L), les phospholipides (0,36 g/L) et le cholestérol (0,06 g/L) (Kailasapathy, 2015). La composition en acides gras du lait de vache est décrite dans le Tableau 1.

La matière grasse du lait est sécrétée sous forme d'une émulsion de gouttelettes lipidiques appelés « globules gras » de taille allant de 0,1 à 15  $\mu\text{m}$ . Ces globules gras sont entourés d'une membrane composée de bicouches lipidiques et de protéines. La membrane du globule gras (MFGM de l'anglais *milk fat globule membrane*) provient de la membrane plasmique des cellules sécrétoires de la glande mammaire par extrusion de gouttelettes lipidiques de la cellule (Kanno, 1990; Mather and Keenan, 1998). Comme chaque globule gras dans le lait a sa propre MFGM, les globules gras sont présents dans le lait sous une forme dispersée. Ce n'est qu'après la destruction de la structure de la membrane, par exemple, par une force mécanique telle que le barattage ou même le cisaillement lors d'opérations de pompage, que les globules gras s'agrègent et forment ensuite de gros amas de graisse. La MFGM du lait est composée de protéines et de lipides dans un rapport pondéral de 1:1 (Kanno, 1990). Beaucoup de ces protéines sont des glycoprotéines (Spitsberg, 2005).

La membrane des globules gras est importante pour empêcher la graisse de se séparer sous forme d'huile libre. Elle protège les lipides contre une abrasion physique pendant la manipulation et la transformation du lait, ainsi que de l'action de la lipase du lait, enzyme qui contribue au développement du rancissement (Kailasapathy, 2015).

**Tableau 1. Composition en acides gras de la matière grasse du lait de vache (adapté de Kailasapathy, 2015)**

Acide gras	Nom commun	Proportion (%)
C4:0	acide butyrique	3,3
C6:0	acide caproïque	2,3
C8:0	acide caprylique	1,2
C10:0	acide caprique	2,8
C12:0	acide laurique	3,4
C14:0	acide myristique	11,4
C14:1	acide myristoléique	2,6
C16:0	acide palmitique	29,5
C16:1	acide palmitoléique	3,3
C18:0	acide stéarique	9,8
C18:1	acide oléique	27,4
C18:2	acide linoléique	2,7
C18:3	acide linoléique	0,6

La matière grasse confère richesse et onctuosité aux produits laitiers gras. Elle est plutôt fade mais contribue indirectement à l'arôme des produits laitiers fermentés. Premièrement, la matière grasse est un réservoir d'arôme, car la plupart des composés d'arômes sont liposolubles. Deuxièmement, la proportion et la structure de la matière grasse peuvent affecter la rhéologie du produit et donc sa dispersion en bouche. En conséquence, la matière grasse peut impacter la dispersion des composés d'arôme et leur perception (Thierry et al., 2017).

### **c. Protéines lactières**

Les principales protéines du lait sont classées en caséines et protéines du lactosérum, ou protéines sériques. Ces protéines confèrent leur texture caractéristique aux produits laitiers et participent au développement des micro-organismes tels que les bactéries lactiques.

- ***Caséines***

Les caséines, représentent 80% des protéines du lait (soit ~25 g/L lait), et sont présentes sous forme d'une structure supramoléculaire, les micelles de caséines, associant les caséines (93 %) et des minéraux (7%, contenant calcium, phosphore et magnésium principalement). Ces micelles sont constituées de quatre caséines : caséine  $\alpha_{s1}$ , caséine  $\alpha_{s2}$ , caséine  $\beta$  et caséine- $\kappa$ , représentant respectivement 38%, 10%, 36% et 13% du total des caséines. Elles sont phosphorylées suite à des modifications post-traductionnelles au niveau des résidus sérines

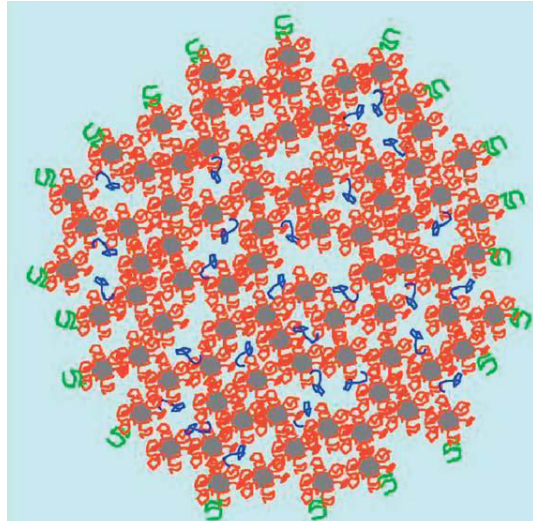
(phosphosérine, PSer, Tableau 2), ce qui leur permet d'interagir avec le calcium pour former les micelles. Elles possèdent des zones alternées hydrophiles et hydrophobes qui leur permettent de s'auto-associer. De plus la caséine  $\kappa$  est glycosylée au niveau de sa partie N-terminale, ce qui permet de stabiliser les autres caséines notamment en présence de calcium (Dalglish, 2011; Kailasapathy, 2015). Seules les caséines  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$  possèdent des ponts disulfures. Les micelles de caséines sont très stables à la chaleur, supportant des températures supérieures à 140 °C. Leur hydrophobicité est due à leur teneur élevée d'acides aminés hydrophobes, notamment valine, leucine, isoleucine, phénylalanine et proline (35% à 45%). Les caséines ont des caractéristiques différentes les unes des autres comme résumé dans le Tableau 2 (Kailasapathy, 2015).

**Tableau 2. Caractéristiques des caséines du lait (adapté de Kailasapathy, 2015)**

Caséines	Acide aminés	KDa	Caractéristiques
caséine $\alpha_{s1}$	199	23,6	la charge la plus élevée de toutes les molécules de caséine, 7-9 PSer
caséine $\alpha_{s2}$	207	25,4	la moins hydrophobe, 11-13 PSer
caséine $\beta$	209	25	la plus hydrophobe, 5 PSer
caséine- $\kappa$	1169	19	contient à la fois des résidus glycosylés et phosphorylés, et peut exister sous forme de dimère jusqu'à décamère du fait de la présence de cystéine, 1-2 PSer

Concernant la structure de la micelle de caséines, la micelle est hautement hydratée, avec 3 à 4 g d'eau par gramme de protéine et elle a une structure fortement poreuse, comme une « éponge ». La caséine  $\beta$  est la plus mobile des caséines grâce à ses propriétés amphiphiles et tensioactives. La structure interne de la micelle est un système constitué de canaux d'eau et de brins de caséines en interaction avec des nanoclusters de phosphate, schématisé dans la Figure 5 (Dalglish, 2011).





**Figure 5. Représentation schématique de la micelle de caséines, incorporant des nanoclusters de phosphate de calcium (en gris) avec leurs caséines attachées (en rouge) et la caséine-κ en surface (en vert). La caséine β mobile liée de manière hydrophobe est indiquée en bleu dans les canaux d'eau à l'intérieur de la micelle. Les tailles relatives des composants individuels ne sont pas à l'échelle (tiré de Dagleish, 2011)**

La micelle de caséines est sensible aux changements de charge entraînés notamment par des variations de pH, qui influencent fortement les interactions électrostatiques. Les minéraux présents dans les micelles sous forme de phosphate de calcium colloïdal sont libérés de la micelle lors d'une acidification.

Les caséines précipitent à partir de pH 5.2 et deviennent insolubles à pH 4,6 correspondant au pH isoélectrique des caséines, à une température supérieure à 20 °C. Cette déstabilisation peut s'effectuer par ajout d'acide ou par la production d'acide lactique produit par les bactéries lactiques. N'ayant plus aucune charge pour se maintenir en suspension, les caséines précipitent de manière irréversible en formant un gel. Il en résulte l'agrégation des micelles de caséine, conduisant à une coagulation. Ce type de coagulation acide existe dans tous les produits laitiers fermentés, comme les laits fermentés, les yaourts, et le fromage blanc. Les caractéristiques du gel et donc de la texture du produit dépendent de la température et du taux d'acidification du lait (Chandan and Kilara, 2013).

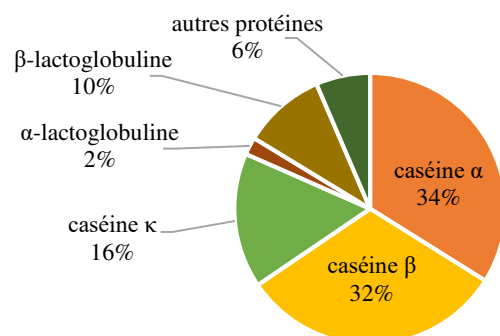
La micelle de caséines est également sensible à l'action des enzymes protéolytiques. C'est le moyen de coagulation le plus employé dans la production de fromage. La principale enzyme utilisée, dite enzyme coagulante, est la chymosine, qui est une protéase acide. Elle est apportée par addition de caillotte de veau dans les méthodes traditionnelles, de présure (mélange de

chymosine et de pepsine extraites de caillette) plus ou moins purifiée, ou de chymosine recombinante, la plus employée actuellement. Cette enzyme hydrolyse spécifiquement la caséine- $\kappa$ , au niveau du site Met<sub>105</sub>-Phe-<sub>106</sub> de la séquence, ce qui entraîne la libération de la partie C-terminale glycosylée responsable de la stabilité des micelles. Ces dernières s'agrègent entre elles et forment un gel (Chandan and Kilara, 2013). Ce gel se réorganise au cours du temps suite à la modification des interactions hydrophobes, ce qui entraîne une expulsion de l'eau des micelles coagulées, provoquant une rétraction du gel puis une synérèse. Ce gel est appelé caillé en fromagerie (Spreer and Mixa, 1998). De nombreux fromages, comme le camembert par exemple, sont fabriqués à partir d'un caillé dit « mixte », en associant l'action de l'enzyme coagulante et l'acidification et la perte de minéraux consécutive, due à la croissance des ferments lactiques.

Lors des traitements thermiques de type traitement UHT (Ultra Haute Température), la caséine  $\kappa$  forme des ponts disulfures avec les principales protéines sériques, ce qui limite l'accessibilité de la caséine  $\kappa$  par la chymosine (Chandan and Kilara, 2013; Spreer and Mixa, 1998). De plus, cette interaction avec les protéines sériques, en particulier la  $\beta$ -lactoglobuline, entraîne une perte de caséine  $\kappa$  de la micelle vers le lactosérum à une température  $> 70^\circ\text{C}$ . De plus, la dissociation de ce complexe  $\beta$ -lactoglobuline-caséine  $\kappa$  dépend fortement du pH. Les micelles de caséines dépourvues de caséine- $\kappa$  sont plus sensibles à la coagulation, qui peut se produire rapidement pendant le traitement thermique, si le pH est suffisamment bas (Yada, 2017).

- ***Protéines sériques***

Les protéines sériques comportent de nombreuses protéines dont les majoritaires sont la  $\beta$ -lactoglobuline (2 à 4 g/L de lait) et l' $\alpha$ -lactalbumine (0,6 à 1,7 g/L). D'autres protéines dérivées du sang sont également présentes, comme la sérum albumine, la lactoferrine, les immunoglobulines, ainsi que d'autres protéines mineures dont des enzymes (Chandan and Kilara, 2013). La Figure 6 montre les concentrations moyennes des caséines et principales protéines sériques.



**Figure 6. Proportions moyennes (% des protéines totales) des principales protéines du lait de vache au printemps (mars-mai) (adapté de Gellrich et al., 2014)**

Les protéines sériques sont des protéines globulaires, avec une distribution de séquence relativement uniforme de résidus non polaires, polaires et chargés (Kailasapathy, 2015). Contrairement aux micelles de caséine, les protéines sériques sont relativement thermolabiles, et sont dénaturées de manière irréversible à partir de 80 °C. La β-lactoglobuline est plus thermolabile que l'α-lactalbumine en raison de la présence d'un groupe sulfhydrile libre, ce qui permet d'initier des réactions d'échanges de ponts disulfures (Kailasapathy, 2015). Cette capacité à se dénaturer thermiquement est utilisée en technologie laitière. Elle permet d'obtenir une structure de gel plus ferme dans les produits acidifiés, une augmentation du rendement des produits frais, un goût de cuit (Spreer and Mixa, 1998). Les principales différences de comportement des caséines et des protéines sériques sont résumées dans le Tableau 3.

**Tableau 3. Principales différences entre les propriétés physiques et chimiques des caséines et celles des protéines sériques (adapté de Chandan and Kilara, 2013)**

	Caséines	Protéine sériques
Structure	Alternance de zones hydrophobes et hydrophiles, forte présence de proline peu de structure secondaire	Régions hydrophobes et hydrophiles structure secondaire élevée avec feuillet β et hélices α
Acides aminés phosphorylés	Oui	Non
Teneur en cystéine	Faible (2 résidus)	Forte (5 résidus)
Stabilité thermique	Très stable	Peu stable
Comportement en fonction du pH	Précipite à pH 4,6	Soluble à pH 4,6
Comportement en fonction des ions présents	Précipite avec des ions di- et polyvalents	Relativement résistantes aux ions

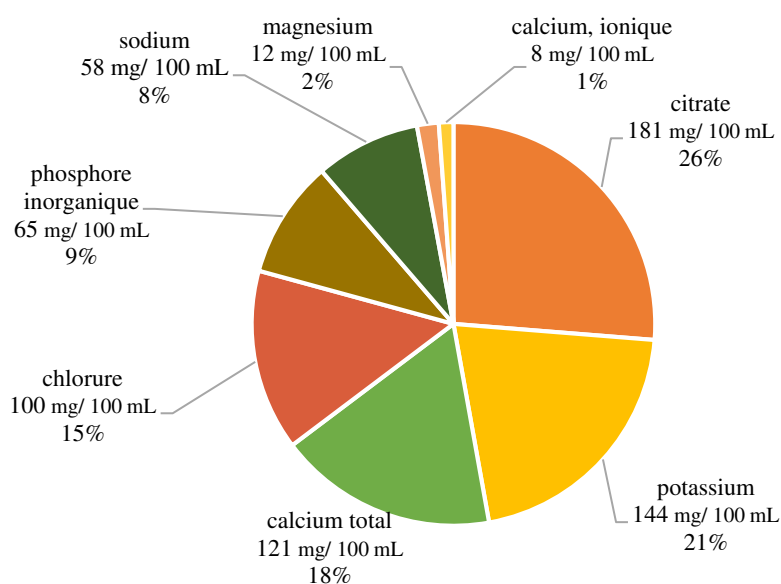
#### d. Lactose

Le lactose est un disaccharide composé d'une molécule de  $\beta$ -D-galactose et d'une molécule de  $\alpha/\beta$ -D-glucose reliées entre elles par une liaison osidique  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4).

Le lactose a une importance technologique pour les fermentations car c'est le principal substrat carboné des ferments acidifiants. Le lactose est un sucre réducteur qui participe aux réactions de Maillard (réaction entre un sucre et certains acides aminés, sous l'effet de la chaleur) avec des acides aminés du lait, en particulier la lysine, résultant en l'apparition d'une couleur brunâtre du lait. Dans les produits laitiers à fort traitement thermique, la réaction de Maillard peut entraîner un brunissement ainsi que la formation de goûts et d'odeurs de « cuit », « caramel » (Kailasapathy, 2015).

#### e. Les minéraux

Les minéraux du lait se composent principalement de bicarbonates, chlorures, phosphates et citrates de calcium, magnésium, potassium et sodium (Figure 7). Ces minéraux sont en équilibre entre la phase soluble (sérum) et la phase colloïdale (micelles de caséine). Ainsi, jusqu'à 60% du calcium et 50% du phosphore peuvent être présents dans la phase colloïdale.



**Figure 7. Concentrations des minéraux majeurs et du citrate dans le lait de vache (adapté de (Chandan and Kilara, 2013))**

La distribution du calcium, du citrate, du magnésium et du phosphate entre les phases solubles et colloïdales, et leurs interactions avec les protéines du lait ont des conséquences importantes sur la stabilité du lait et des produits laitiers. Le rapport de l'état soluble/colloïdal peut influencer la stabilité thermique, la qualité et la stabilité au stockage des produits concentrés. La teneur en calcium du lait influe sur la fermeté du caillé et sur la viscosité des laits fermentés (Kailasapathy, 2015).

### **2.3. Types de produits laitiers fermentés**

Les normes existant dans de nombreux pays classent les produits laitiers fermentés principalement sur la base de la composition chimique ou de la teneur en matière grasse (produit entier, demi-écrémé ou écrémé). Parmi les produits laitiers, on distingue les produits non fermentés des produits laitiers fermentés. Chaque catégorie de produits présente un schéma technologique différent et un microbiote associé particulier lorsqu'il s'agit de produits fermentés, qui sont présentés dans les Tableaux 4 et 5.

#### **a. Laits fermentés**

La Fédération Internationale de Laiterie (FIL) définit les laits fermentés comme des produits préparés à partir de lait et/ou de composants dérivés du lait sous l'action d'une microbiote spécifique, entraînant une réduction du pH et coagulation ultérieure de la caséine (IDF, 1992).

Les laits fermentés sont fabriqués dans le monde entier et environ 400 noms génériques sont utilisés pour désigner des produits traditionnels ou industrialisés (Kurmman et al., 1992). En réalité, cette diversité de produits peut être classée en quelques variétés selon les micro-organismes dominants dans le produit, comme montré dans le Tableau 4. Cette classification diffère un peu de celle proposée par Robinson (2002).

- fermentations lactiques : les produits de ce groupe constituent de loin le plus grand nombre connu à l'échelle mondiale. Selon la température de croissance des ferments ces produits ont été classés en : a) mésophiles, *e.g.* babeurre fermenté, crème fraîche, *filmjolk*, *tätmjolk* et *langofil*; (b) thermophiles, *e.g.* yaourt, *zabadi*, *dahi*; et c) de type thérapeutique ou probiotique, *e.g.* lait 'acidophilus'
- levures et fermentation lactique, *e.g.* kéfir, *koumiss*, *viilli*.
- moisissures et fermentation lactique.

**Tableau 4. Types de laits fermentés, produits et micro-organismes associés à la fermentation (adapté de Macori and Cotter, 2018))**

Type de laits fermentés	Produits	Principaux micro-organismes associés à la fermentation
<b>Laits fermentés - laits acides thermophiles</b>	Ayran, Yaourt, Matzoon	<i>L. bulgaricus</i> et <i>S. thermophilus</i>
	Babeurre fermenté	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. diacetyllactis</i>
	Crème fraîche	<i>L. diacetyllactis</i>
	Nunu	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. mesenteroides</i>
	Skyr	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i>
<b>Laits fermentés-laits mésophiles</b>		<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. diacetyllactis</i> ,
	Viili	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>G. candidum</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>P. fermentans</i>
	Ymer	<i>L. lactis</i>
	Gioddu	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
<b>Laits fermentés acides et alcoolisés</b>	Kéfir	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefirifaciens</i> , <i>L. lactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp. <i>K. marxianus</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>K. lactis</i> <i>S. kefir</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. kefir</i>
<b>Laits fermentés de type thérapeutique ou probiotique ('acidophilus')</b>	Laits «acidophilus»	<i>L. acidophilus</i>
	Shubat ou Chal	<i>L. paracasei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>S. thermophilus</i>
	Gariss	<i>K. marxianus</i> , <i>C. kefir</i> , <i>P. kudriavzevii</i> <i>S. infantarius</i> , <i>L. fermentum</i>

**Abréviations des noms de genres et d'espèces :**

**Genres et espèces bactériens :** *B.* : *Bifidobacterium*, *E.* : *Enterococcus* *L.* : *Lactobacillus* *L. bulgaricus* : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ; *L. lactis* subsp. *cremoris* : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. diacetyllactis* : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, *L. mesenteroides* : *Leuconostoc mesenteroides*, *S. thermophilus* : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *S. infantarius* : *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*

**Levures :** *C.* : *Candida*, *G.* : *Geotrichum*, *K.* : *Kluveromyces*, *P.* : *Pichia*, *S.* : *Saccharomyces*, *T.* : *Torula*

Les laits fermentés par des micro-organismes mésophiles incluent les produits regroupés sous les termes « fermentations lactique et levure » et « fermentations lactiques ». Les micro-organismes du premier groupe appartiennent aux genres *Lactococcus* (*L.* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris*) et *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* subsp. *cremoris* et *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*), et sont généralement utilisés en cultures mixtes (Tamime, 2002). Cependant, le microbiote de ces derniers produits est complexe et pas toujours constant; de nombreuses espèces de bactéries lactiques et de levures

ont ainsi été identifiées. Par exemple, dans les grains de kéfir, il a été trouvé des bactéries lactiques des genres *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc*, et des levures des genres *Kluyveromyces*, *Torula* et *Saccharomyces* (Macori and Cotter, 2018).

- ***Yaourt***

Selon la définition du CODEX Alimentarius (CODEX Alimentarius Commission, 2003), les deux espèces bactériennes permettant l'appellation « yaourt » sont *L. bulgaricus* et *S. thermophilus*. Le produit où l'une ou l'autre de ces espèces a été remplacée ou l'ajout d'espèces supplémentaires est appelé « lait fermenté ».

Le lait utilisé pour la fabrication du yaourt est standardisé en matière grasse et enrichi plus ou moins fortement en protéines, selon la texture recherchée, par l'ajout de la poudre de lait écrémé ou de lait concentré. Après homogénéisation, le lait est pasteurisé par traitement thermique puis refroidi à la température de fermentation. Selon le produit souhaité, le lait peut ensuite être supplémenté en sucre (5 à 10 %) ou par d'autres additifs. Pour les yaourts fermes, l'ajout de sucre se fait avant fermentation. Pour les yaourts brassés, soit le sucre est ajouté en totalité avant fermentation, soit une partie seulement est ajoutée avant fermentation, le reste étant ajouté après fermentation (Beal and Sodini, 2003). Arômes naturels et artificiels, pulpes et jus de fruits, confitures, fruits, sucres et additifs au pouvoir sucrant tels que le miel ou l'aspartame font partie de la liste des additifs.

- ***Crèmes***

La crème est un concentré issu du lait riche en matière grasse, elle est obtenue mécaniquement par centrifugation ou naturellement par décantation du lait cru. C'est une émulsion résultant d'une forte concentration des globules de la matière grasse laitière. La crème fraîche épaisse est produite en fermentant de la crème pasteurisée par des ferments acidifiants. Un procédé classique de fabrication consiste à enrichir du lait entier avec de la crème pour atteindre une teneur en matière grasse désirée, de 18% à 50%. La crème est traitée thermiquement à 72°C pendant 20 min et homogénéisée pour améliorer sa consistance. Elle est refroidie à 22°C,ensemencée en ferments acidifiants (*Lactococcus* ou *Leuconostoc* spp.) et incubée pendant 18 à 20 h jusqu'à ce que son pH chute à ~4,7. Elle est ensuite conditionnée et refroidie à 4°C. (Chandan, 2006; Robinson, 2002).

## **b. Fromage**

Le fromage est le produit laitier fermenté le plus populaire. Le fromage est défini par la norme de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) /n°A-6 (1978, modifiée en 1990) comme un « *produit frais ou affiné, solide ou semi-solide, dans lequel le rapport protéines de lactosérum/caséine n'exécède pas celui du lait obtenu : (i) par coagulation du lait, lait écrémé, lait partiellement écrémé, crème de lactosérum ou babeurre, seul ou en combinaison, grâce à l'action de la présure ou d'autres agents coagulant appropriés et par égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation ; (ii) par l'emploi de techniques de fabrication entraînant la coagulation du lait et/ou des matières obtenues à partir de lait, présentant des caractères physiques, chimiques et organoleptiques similaires à ceux du produit défini plus haut* ». ».

En France, selon le décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères, « un fromage est un produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière suivantes : lait, lait partiellement ou totalement écrémé, crème, matière grasse, babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse ». Seules les étapes de coagulation et d'égouttage sont communes à tous les types de fromages selon ces deux définitions juridiques. Néanmoins, la préparation du lait, le salage et l'affinage sont des étapes communes à un très un grand nombre de fromages.

Le fromage est un groupe d'aliments très variés (peut-être jusqu'à 1500 fromages). Pour aider les consommateurs, les détaillants et les techniciens du fromage, plusieurs systèmes de classification du fromage ont été proposés et utilisés. Les critères de classification comprennent : l'agent coagulant (coagulation par la chymosine ou coagulation acide); l'humidité (pâtes molles, pâtes pressées, etc.); la présence d'une étape d'affinage ou pas (fromages affinés ou frais); le type de ferments employés (bactéries lactiques, bactéries et levures de surface, champignons filamenteux internes ou de surface, bactéries propioniques) (Fox et al., 2016). Le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) classe les fromages en: fromages à pâte fraîche, à pâte filée, à pâte pressée cuite, à pâte pressée semi-cuite, à pâte pressée non cuite, à pâte molle persillée, à pâte molle à croûte fleurie ou lavée, et à pâte fondue (mélange de fromages fondus). Chacune de ces familles et des variétés qui les composent ont donc un procédé de fabrication particulier ainsi qu'un microbiote qui leur est propre, conférant ainsi aux fromages des caractéristiques organoleptiques uniques (Tableau 5).



**Tableau 5. Types de fromages et micro-organismes associés (d'après Desmasures et al., 2015; Fox et al., 2016 et www.produits-laitiers.com)**

Type de pâte	Description	Exemples	Bactéries lactiques	Autres micro-organismes
<b>Fromages frais ou blancs</b>	Fromages non affinés ; texture onctueuse et fondante, caractérisés par leur forte teneur en eau (de l'ordre de 77%)	faisselle et fromage blanc	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>cremoris</i> ou <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<b>Fromages à pâte filée</b>	Fromages obtenus par pétrissage et étirement du caillé jusqu'à consistance désirée	mozzarella, caciocavallo, halloumi	<i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>E. durans</i>	
<b>Fromages à pâte molle et à croûte fleurie</b>	Fromages à croûte blanche et duveteuse ; pâte souple et onctueuse, avec une saveur caractérisée par des notes de champignon, de levure, de mousse ou encore de terre humide	camembert, brie, neufchâtel, maroilles	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Penicillium camemberti</i> , <i>Geotrichum candidum</i>
<b>Fromages à pâte molle à et croûte lavée</b>	Fromages régulièrement lavés en surface et brossés pendant l'affinage pour activer la fermentation	maroilles, munster, époisses, langres, livarot, pont-l'évêque, aisy cendré, curé nantais, limburger	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>	<i>Brevibacterium</i> spp., <i>Glutamicibacter</i> spp., <i>Geotrichum candidum</i> , <i>K. lactis</i> , <i>D. hansenii</i>
<b>Fromages à pâte pressée non cuite</b>	Fabriqués à partir de lait de vache ou de lait de brebis, cru ou pasteurisé. C'est la croûte des fromages qui leur donne toute leur saveur et leur arôme. Elle peut être plus ou moins épaisse selon la durée de l'affinage.	cheddar, reblochon, tome de Savoie, port Salut, cantal	<i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i>	<i>Brevibacterium</i> spp., <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Champignons filamenteux</i>
<b>Fromages à pâtes persillées</b>	Fabriqués à partir de lait de vache ou de brebis. plutôt fabriqués dans les régions montagneuses de France.	le bleu ou la fourme d'Ambert (lait de vache) roquefort (lait de brebis)	<i>L. lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<b>Fromages à pâte pressée cuite</b>	Fromages issus de lait de vache ; texture peut être tendre, moelleuse ou ferme.	Comté, Gruyère, emmental, Bergkäse	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>S. thermophilus</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>

**Abréviations des noms de genres et d'espèces :** *E.* : *Enterococcus*, *L. bulgaricus* : *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ; *L. helveticus* : *Lactobacillus helveticus* ; *S. thermophilus* : *L. lactis* subsp. *cremoris* : *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. diacetylactis* : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. mesenteroides* : *Leuconostoc mesenteroides*, *S. thermophilus* : *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *S. infantarius* : *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *K. lactis* : *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* : *Kluyveromyces marxianus*, *D. hansenii* : *Debaryomyces hansenii*

## **3. Microbiologie des produits laitiers fermentés**

### **3.1. Le microbiote du lait comme source de ferments**

La haute valeur nutritionnelle du lait, sa teneur élevée en eau et son pH quasiment neutre permettent la croissance de nombreux micro-organismes formant un écosystème microbien complexe.

La diversité microbienne du lait sortant de la mamelle des vaches laitières (et autres mammifères) est influencée par l'état de santé et l'hygiène des animaux, l'hygiène de l'environnement dans lequel les animaux sont logées et traitées, les pratiques de préparation des mamelles, de traite, de nettoyage et de désinfection des trayeuses et des tanks à lait, et la durée et la température de stockage (Cempírková, 2008). Lorsque le lait est produit dans de bonnes conditions d'hygiène, il contient une population microbienne totale de l'ordre de  $10^3$  à  $10^5$  unités formant colonies (UFC)/ml (Odet, 1999).

Les micro-organismes qui se développent dans le lait comprennent des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Certains de ces micro-organismes peuvent être d'intérêt technologique ou correspondre à des micro-organismes d'altération. Parmi les bactéries retrouvées dans le lait, il y a des les bactéries lactiques qui contribuent à des réactions fermentaires désirables dans la transformation du lait en produits laitiers fermentés (Fox et al., 2016; Ogier et al., 2002). D'autres bactéries sont également présentes dans le lait, ainsi que diverses levures et champignons filamenteux jouant également un rôle dans les caractéristiques chimiques et organoleptiques des produits laitiers (Lavoie et al., 2012; Ogier et al., 2002). La composition spécifique du microbiote du lait influence directement la production et les caractéristiques des produits laitiers (Quigley et al., 2013).

L'isolement des micro-organismes présentant une fonctionnalité d'intérêt dans la production des produits laitiers a été un pas important pour maîtriser les fermentations et obtenir les qualités attendues des produits. Cela peut être particulièrement important dans les situations où la réglementation autorise l'utilisation de lait pasteurisé et la fermentation naturelle n'est plus possible. Dans ce contexte, l'inoculation de micro-organismes laitiers peut compenser le retrait de populations commensales et l'effet défavorable associé sur les arômes des produits résultants.

### 3.2. Complémentarité des méthodes de caractérisation du microbiote du lait

Le moyen traditionnel pour déterminer la nature du microbiote présent dans le lait est basé sur la culture en boîte de Pétri. Les méthodes basées sur la culture reposent sur l'isolement et la culture de micro-organismes avant leur identification sur la base du phénotype et/ou du génotype. Parmi le microbiote cultivable du lait des bactéries lactiques comme *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* et *Pediococcus*. *Lactococcus* ( $8.10^1$  à  $1.10^4$  UFC/mL) et *Lactobacillus* ( $1.10^2$  à  $3.10^4$  UFC/mL) sont les genres retrouvés dans le lait et c'est également le cas dans la plupart des produits laitiers fermentés (Coppola et al., 2008; Quigley et al., 2013).

Il est devenu évident que les approches qui incluent une étape de culture peuvent conduire à des inexactitudes. Les espèces présentes en petit nombre sont surclassées sur les milieux de laboratoire par des espèces microbiennes numériquement plus abondantes ou certaines espèces peuvent simplement ne pas être cultivables en laboratoire dans les conditions généralement mises en œuvre (Head et al., 1998). Pour ces raisons, avec le développement des techniques de séquençage de nouvelle génération, d'autres approches ont été développées ces dernières années pour étudier la composition microbienne des aliments.

Les techniques de séquençage haut-débit sont indépendantes de la culture des micro-organismes et sont basées sur l'analyse directe de l'ADN (ou de l'ARN) microbien présent dans l'aliment (Coppola et al., 2008; Quigley et al., 2011). A titre d'exemple, l'étude de (Verdier-Metz et al., 2011), combinant des approches culture-dépendante et -indépendante, a montré pour la partie culturelle que les bactéries présentes sur la peau des trayons, qui sont une des sources potentielles de la population microbienne du lait, appartenaient aux phyla *Firmicutes* (76%), *Actinobacteria* (4,9%), *Proteobacteria* (17,8%) et *Bacteroides* (1,3%). Lorsque cette approche a été complétée par une approche culture-indépendante basée sur le séquençage des banques de clones, des phyla supplémentaires, à savoir les *Planctomycetes*, les *Verrucomicrobie*, les *Vyanobactera*, les *Vhloroflexi* et des bactéries non classées, ont été détectés à de faibles niveaux. Notamment, un grand pourcentage des séquences détectées de cette étude et d'autres études (Fricker et al., 2011) correspondaient à des bactéries encore non identifiées. De façon attendue, parmi celles qui ont été identifiées, une large part correspondait à des bactéries technologiquement importantes telles que *Lactobacillus*, et *Leuconostoc*.

### 3.3. Grands groupes de micro-organismes et leur contribution

Les micro-organismes sont une composante essentielle des laits fermentés et de toutes les variétés de fromage, où ils jouent un rôle important à la fois dans la fabrication et l'affinage. Ils peuvent être classés selon leur appartenance à un groupe microbien donné (bactéries lactiques, autres bactéries, levures et champignons filamenteux), selon leurs rôles principaux dans les produits (acidification, aromatisation, formation de la croûte...) et selon qu'ils sont ensemencés volontairement (ferments, également appelés levains ou cultures) ou non (NSLAB, autres bactéries non levains et champignons) (Tableau 6).

**Tableau 6. Classification des micro-organismes du fromage selon leur rôle principal dans les produits laitiers fermentés**

Groupes microbiens		Bactéries lactiques		Autres bactéries	Levures	Champignons filamenteux
Rôle dans les produits laitiers		Acidification	Aromatisation	Rôle dans l'aspect et la saveur		
		Tous les fromages, crèmes fraîches et laits fermentés		Fromages à croûte lavée		Fromages à croûte fleurie et pâtes persillées
Espèces représentatives	Ensemencés	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactococcus diacetylactis</i>	<i>Glutamicibacter arilaitensis</i> <i>Brevibacterium spp.</i>	<i>Geotrichum candidum</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Penicillium camemberti</i> <i>Penicillium roqueforti</i>
	Non ensemencés	Rôle en général mineur	NSLAB Impact positif ou négatif	Nombreuses autres espèces Impact positif ou négatif		

NSLAB : non-starter lactic acid bacteria , *Lactococcus diacetylactis* : *Lactococcus lactis lactis* biovar *diacetylactis*

La physiologie des ferments acidifiants et des cultures secondaires, leur métabolisme et leur aptitude à convertir les différents composants du lait (protéines, matière grasse) contribuent à différencier les produits laitiers fermentés. Ces micro-organismes ont une action déterminante sur les caractéristiques organoleptiques des produits fermentés, via de la formation de composés d'arômes, d'exopolysaccharides, de gaz.

## a. Micro-organismesensemencés

- ***Ferments acidifiants***

Les ferments acidifiants sont des cultures pures ou des mélanges de souches de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées dans la première étape de fabrication de produits fermentés (acidification du lait par la conversion du lactose en acide lactique). On distingue les ferments naturels, souvent des mélanges complexes de nombreuses souches bactériennes dont la composition exacte est inconnue, des ferments mixtes, composés de cinq ou six souches soigneusement sélectionnées (Doleyres, 2003).

Le choix des espèces de bactéries lactiques est un élément clé au regard du produit final recherché et des fonctionnalités désirées. Les ferments acidifiants produisent suffisamment d'acide lactique pour abaisser le pH (Corrieu and Luquet, 2008). Ils contribuent également à l'affinage via la production de composés d'arômes (Fox et al., 2016). Ainsi, les ferments utilisés doivent être adaptés à la température de fermentation. La température de croissance se situe généralement entre 30 et 45°C pour les bactéries lactiques thermophiles utilisées (e.g. *S. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) et entre 20 et 30°C pour les bactéries mésophiles (e.g. *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*) (Zannini et al., 2016)

- ***Autres microorganismesensemencés***

Comme signalé précédemment (Tableau 6), les ferments d'affinage forment un groupe hétérogène constitué de bactéries lactiques et non lactiques, mais aussi de levures et de champignons filamenteux (dans les fromages à croûtes fleuries et à pâte persillée) (Chamba and Irlinger, 2004; Corrieu and Luquet, 2008). Les ferments d'affinage sont spécifiques de la phase de maturation lors de la fabrication des fromages et peuvent être ajoutés dans le lait.

Ces microorganismes contribuent aux caractéristiques organoleptiques de la surface ou du cœur des fromages. Par exemple, les bactéries propioniques, comme *P. freudenreichii* qui participe à la formation d'ouvertures dans les fromages comme l'emmental, font partie des microorganismes d'affinage (Beresford et al., 2001).

Les levures ont la capacité de se développer à basse température, à de faibles pH et, pour certaines espèces, à de fortes concentrations en sel (Pitt and Hocking, 2009a). En consommant l'acide lactique et en produisant des métabolites alcalins (NH<sub>3</sub>), les levures vont participer à la

désacidification du caillé rendant ainsi possible la croissance des bactéries d'affinage acidosensibles. Elles participent également au développement des arômes grâce à leurs activités lipolytique et protéolytique. Les levures et les bactéries de surface interviennent dans la maturation des fromages à croûte morgée. Quelques exemples de ce type de fromages sont des fromages allemands ou hollandais, comme le Tilsiter ou le Limburger, des fromages français tels que le Beaufort et le Münster et des fromages italiens tels que le Taleggio (Corsetti et al., 2001; Mounier, 2015). Le morgeage se caractérise par une ou plusieurs opérations de lavage de la croûte utilisant de l'eau salée, dans laquelle des micro-organismes de maturation sont parfois ajoutés. Les opérations de lavage permettent le développement d'un microbiote mixte de levures et de bactéries à la surface du fromage pouvant atteindre des densités de population situées entre  $10^7$  et  $10^9$  UFC/g de fromage à la fin de l'affinage (Mounier, 2015). On pense généralement que la biochimie du processus d'affinage est initialement due au métabolisme du lactate en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , et à la production d'ammoniac à partir des acides aminés par les levures, ce qui entraîne une augmentation du pH de la surface de pH 4,8 à ~ pH 6.0 et qui favorise la croissance des bactéries pendant l'affinage (Desmasures et al., 2015). Les levures présentes à la surface des fromages à croûte morgée correspondent principalement à *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis* alors que les bactéries appartiennent aux actinobactéries (*Glutamicibacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium casei*) et aux firmicutes (*Staphylococcus xylosus*). Ce microbiote de surface confère aux fromages une croûte caractéristique et luisante et collante. La morge des fromages participe donc à la typicité des fromages dits « à croûte morgée », elle protège également le fromage du dessèchement, de la perte d'arômes et de la croissance de micro-organismes indésirables par antagonisme (Desmasures et al., 2015; Valdes-Stauber et al., 1991; Wyder et al., 1999). Certains de ces fromages se caractérisent également par une couleur orange à rose sur la croûte, due soit à des pigments microbiens (production des caroténoïdes par des bactéries du genre *Brevibacterium* par exemple - (Chandi and Gill, 2011), soit à l'ajout de colorants naturels.

Quant aux champignons filamenteux, ils neutralisent la pâte en métabolisant l'acide lactique, et, en produisant de nombreuses enzymes, ils participent également activement à la maturation du fromage et au développement d'arômes caractéristiques (McSweeney et al., 2017). Un exemple correspond au développement du feutrage blanc à la surface des fromages à croûte fleurie comme le camembert. Les souches de champignons filamenteux sont sélectionnées selon différents critères tels que leur capacité de colonisation ou encore la hauteur, la densité et

la couleur du mycélium. Par exemple, dans le Gorgonzola et le Roquefort, les souches de *Penicillium roqueforti* utilisées vont du bleu clair au jaune et du vert au vert sombre respectivement.

### **b. Micro-organismes non-ensemencés**

Dans la catégorie des micro-organismes non-ensemencés se trouvent les bactéries lactiques non levains, souvent appelées NSLAB, acronyme anglais de *Non Starter Lactic Acid Bacteria*. Beaucoup de travaux de recherche se sont focalisés sur la contribution possible de ces NSLAB au développement de la flaveur du fromage, notamment dans le cheddar (Gobbetti et al., 2015; Settanni and Moschetti, 2010; Shakeel et al., 2016). Les NSLAB ont été trouvées dans les fromages affinés en grand nombre ; elles sont issues soit du lait ou de l'environnement de l'usine en tant que contaminants adventices (Settanni and Moschetti, 2010).

Le groupe des NSLAB est particulièrement hétérogène et les lactobacilles, *L. farciminis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. curvatus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri* et *L. brevis*, y sont principalement représentés (Coeuret et al., 2004; Gobbetti et al., 2015; Švec et al., 2005). Les autres espèces de NSLAB couramment isolées pendant l'affinage du fromage sont des pédiocoques comme *P. acidilactici* et *P. pentosaceus* (Settanni and Moschetti, 2010).

A titre d'exemple, les fromages de brebis italiens se caractérisent par une population de NSLAB très hétérogène, influencée par des facteurs géographiques et technologiques, et pouvant être responsable de diversité dans les fromages (De Angelis et al., 2001). Un autre exemple correspond au cheddar dans lequel il n'y a pas de microbiote secondaire délibérément ajouté. Ces NSLAB peuvent atteindre plus de  $10^8$  UFC/g de fromage et constituent le microbiote principal des fromages affinés. Ces souches offrent donc des possibilités pour moduler l'arôme des produits et innover, et nombreuses recherches ont lieu pour but d'étudier leur application comme ferments additionnels dans les aliments fermentés (Crow et al., 2002).

Au-delà de ces NSLAB, il existe une large diversité de micro-organismes non ensemencés procaryotes (Gram-positifs mais aussi Gram-négatifs - (Coton et al., 2012) et Eucaryotes pouvant affecter positivement ou négativement les caractéristiques organoleptiques des produits laitiers. Pour nombre d'entre eux, leur rôle n'est pas élucidé à ce jour.

La présence de ces différents micro-organismes au sein d'un même écosystème conduit de fait à des interactions biotiques. Ci-après, quelques exemples d'interactions, entre ferments acidifiants et microorganismes ensemencés ou non, sont présentés.

Dans le cas du yaourt, il existe une interaction de type mutualiste appelée proto-coopération entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (Sieuwert et al., 2008). La plupart des souches de l'espèce *S. thermophilus* présentent peu d'auxotrophies pour les acides aminés et ont donc moins d'exigences nutritionnelles que celles de l'espèce *L. bulgaricus*. Aussi, après inoculation des deux espèces dans le lait, seul *S. thermophilus* entre rapidement dans sa phase exponentielle de croissance. Au cours de sa croissance, cette espèce produit divers composés qui stimulent la croissance de *L. bulgaricus*, tels que les acides formique et folique, respectivement précurseurs et cofacteurs de la biosynthèse des purines, et le dioxyde de carbone, précurseur de la synthèse de l'aspartate, du glutamate, de l'arginine et des nucléotides. *L. bulgaricus* entre alors à son tour dans une phase de croissance exponentielle et stimule la croissance de *S. thermophilus* par l'hydrolyse de la caséine et la libération consécutive de petits peptides et d'acides aminés libres, beaucoup de souches de *S. thermophilus* étant dépourvues de protéases extracellulaires (Sieuwert et al., 2008).

Le commensalisme est un autre type d'interactions entre microorganismes dans les fromages à croûte morgée. Dans le commensalisme, un seul des microorganismes obtient un bénéfice tandis que l'autre n'y trouve ni avantage ni véritable inconvénient. Le commensalisme par désacidification de la surface par les levures est l'interaction plus courante dans les fromages entre les bactéries et les levures des croûtes morgées. Dans cette interaction, les levures (*e.g.* levures des genres *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* mais aussi *Candida* et *Rhodotorula*) dominant initialement la surface après la fabrication car elles sont tolérantes aux acides et au sel, mais à la fin de la période de maturation, les bactéries des genres *Brevibacterium*, *Micrococcus* et *Corynebacterium* dominant.



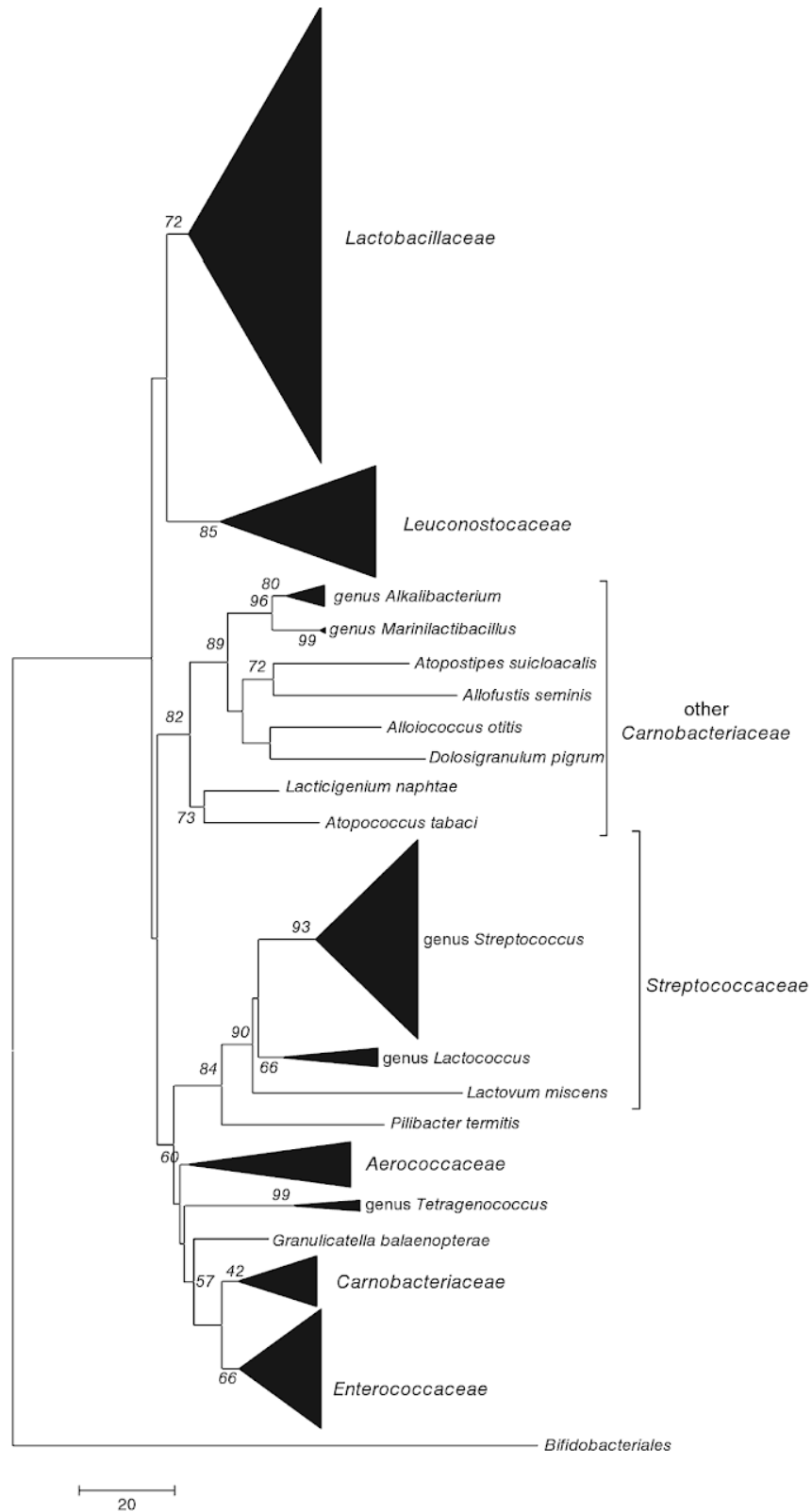
## 4. Bactéries lactiques des produits laitiers

### 4.1. Définition et taxonomie des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont apparues il y a 3 milliards d'années et leur diversité génétique a connu une expansion rapide avec l'apparition des mammifères, il y a 65 millions d'années. Cet essor s'est encore accentué lorsque les humains ont commencé à élever le bétail, il y a environ 8000 ans (Tailliez, 2001).

Les bactéries lactiques sont des procaryotes ubiquitaires, formant un groupe hétérogène constitué de coques et de bacilles Gram-positif généralement non sporulants. Le terme «bactéries lactiques» ne reflète pas un taxon phylétique, mais les capacités métaboliques de ces espèces qui produisent le même métabolite final, l'acide lactique (Pfeiler and Klaenhammer, 2007). Sur le plan taxonomique, elles font partie du phylum des Firmicutes, de la classe des Bacilli et de l'ordre des Lactobacillales. Les bactéries lactiques se répartissent en différentes lignées: famille des Bacillaceae (genre *Bacillus*), famille des Sporolactobacillaceae (genre *Sporolactobacillus*), famille des Bifidobacteriaceae (genre *Aeriscardovia*, *Alloiscardovia*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Metiscardovia*, *Parascardovia* et *Scardovia*) et ordre des Lactobacillales, considérées comme les véritables bactéries lactiques (Figure 8) (Felis and Dellaglio, 2007). Ce ordre englobe 34 genres (Tableau 7), d'environ 500 espèces bien décrites appartenant à six familles de bactéries Gram (+) à faible teneur en guanine et en cytosine (% GC), le génome des bactéries lactiques présentant un GC de 33 à 55%. D'un point de vue technologique, des espèces appartenant à neuf genres sont utilisées dans les industries agroalimentaires : *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (König and Fröhlich, 2017; Stiles and Holzapfel, 1997).

Les *Lactobacillaceae* forment la famille la plus nombreuse et la plus hétérogène, avec environ 180 espèces reconnues ([www.bacterio.net/lactobacillus](http://www.bacterio.net/lactobacillus)), bien que de nouvelles espèces soient décrites régulièrement.



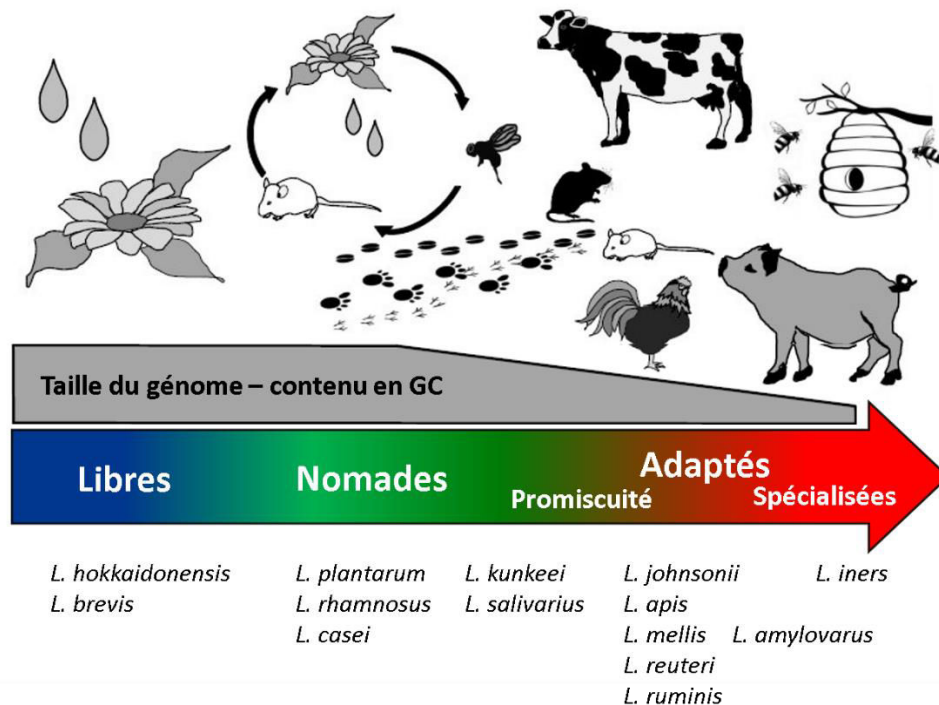
**Figure 8.** Arbre phylogénétique représentant la relation entre les familles de l'ordre des Lactobacillales basé sur la séquence du gène de l'ARNr 16S. (tiré de Felis et al., 2015)

**Tableau 7. Taxonomie actuelle des bactéries lactiques de l'ordre des *Lactobacillales* (adapté de König and Fröhlich, 2017)**

Familles	Genres
<b>Aerococcaceae</b>	I. <i>Abiotrophia</i>
	II. <i>Aerococcus</i>
	III. <i>Dolosicoccus</i>
	IV. <i>Eremococcus</i>
	V. <i>Facklamia</i>
	VI. <i>Globicatella</i>
	VII. <i>Ignavigranum</i>
<b>Carnobacteriaceae</b>	I. <i>Alkalibacterium</i>
	II. <i>Allofustis</i>
	III. <i>Alloi</i>
	IV. <i>Alloiococcus</i>
	V. <i>Atopobacter</i>
	VI. <i>Atopococcus</i>
	VII. <i>Atopostipes</i>
	VIII. <i>Carnobacterium</i>
	IX. <i>Desemzia</i>
	X. <i>Dolosigranulum</i>
	XI. <i>Granulicatella</i>
	XII. <i>Isobaculum</i>
	XIII. <i>Marinilactibacillus</i>
	XIV. <i>Trichococcus</i>
<b>Enterococcaceae</b>	I. <i>Enterococcus</i>
	II. <i>Melissococcus</i>
	III. <i>Tetragenococcus</i>
	IV. <i>Vagococcus</i>
<b>Lactobacillaceae</b>	I. <i>Lactobacillus</i>
	II. <i>Paralactobacillus</i>
	III. <i>Pediococcus</i>
<b>Leuconostocaceae</b>	I. <i>Leuconostoc</i>
	II. <i>Oenococcus</i>
	III. <i>Weissella</i>
<b>Streptococcaceae</b>	I. <i>Lactococcus</i>
	II. <i>Lactovum</i>
	III. <i>Streptococcus</i>

## 4.2. Ecologie des bactéries lactiques

Les espèces de bactéries lactiques sont capables de coloniser de nombreuses niches, y compris le tractus gastro-intestinal des vertébrés, la peau de mammifères, les plantes, le sol et les aliments (Figure 9) (Holzapfel et al., 2001). Elles sont notamment retrouvées dans le lait et les produits laitiers fermentés, et dans bien d'autres aliments fermentés d'origine animale ou végétale (saucisson, vin, choucroute, olives...), dans les matières végétales intactes ou altérées et dans les ensilages. Elles prédominent donc au sein du microbiote naturel de nombreux aliments fermentés dans lesquels elles contribuent à la conservation et induisent également des modifications organoleptiques et nutritionnelles (Stiles, 1996).



**Figure 9. Evolution du mode de vie des lactobacilles, des espèces libres aux espèces strictement adaptées à un hôte. Quelques espèces représentatives sont indiquées en fonction de leur mode de vie, de leur dépendance à l'égard des niches environnementales et du degré de spécificité de l'hôte (adapté de Duar et al., 2017)**

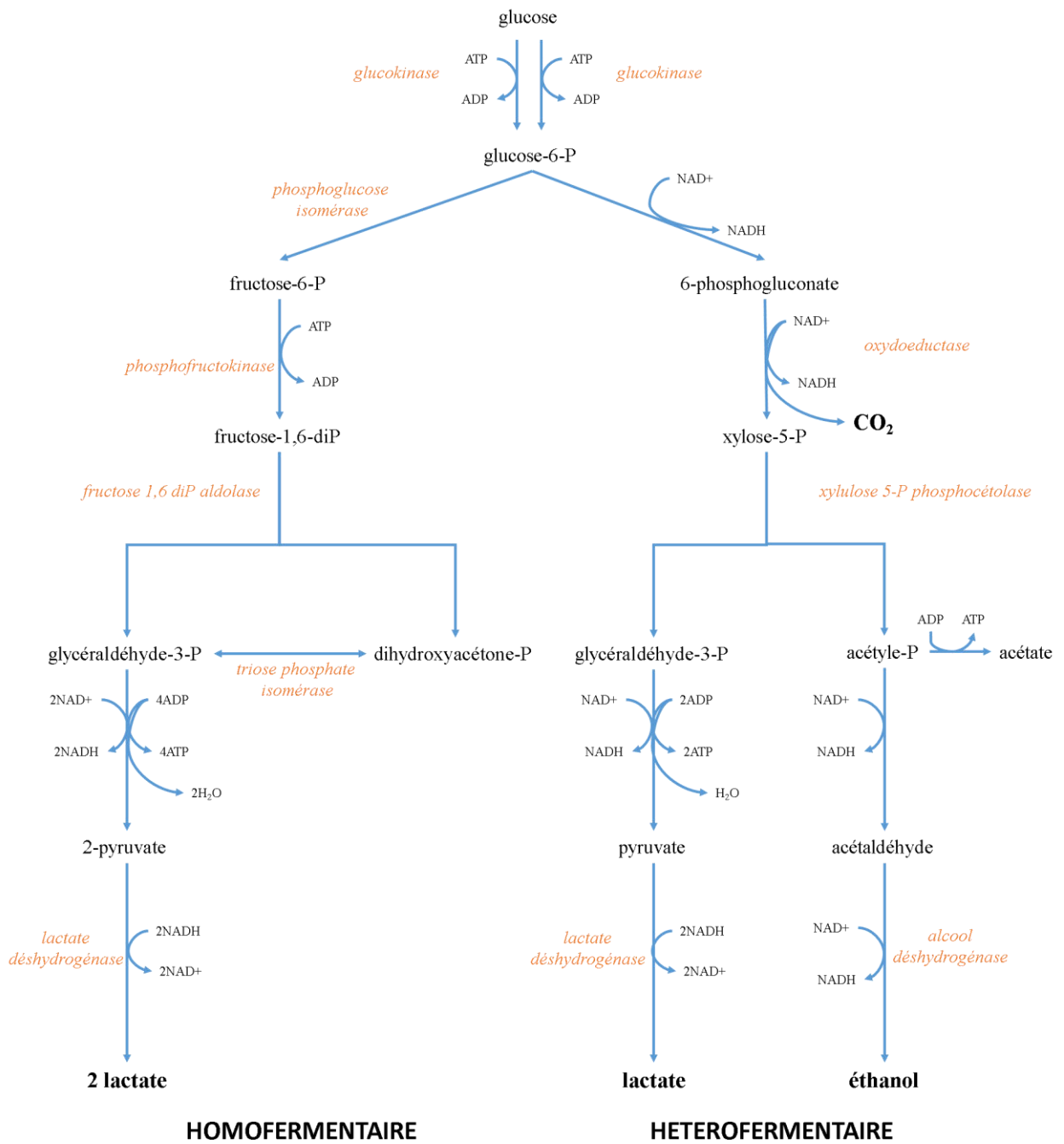
La plupart de bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels complexes. Elles sont exigeantes en vitamines, bases azotées, minéraux ou bien encore en dérivés d'acides nucléiques. Elles sont incapables d'effectuer la synthèse de tous les acides aminés à partir de sources azotées plus simples. Certaines possèdent des protéases, des endopeptidases et/ou des exopeptidases leur permettant d'utiliser des peptides ou protéines exogènes comme source d'azote (Tailliez, 2001).

Les bactéries lactiques sont donc retrouvées dans des écosystèmes riches en ces différents nutriments. Le lait représente un milieu de croissance favorable à certaines bactéries lactiques qui y trouvent notamment une source importante en carbohydrates, protéines et minéraux.

### **4.3. Classification des bactéries lactiques selon leur métabolisme des glucides**

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes chimio-organohétérotrophes strictement fermentaires qui synthétisent leur ATP par phosphorylation du substrat. Elles sont classées en trois groupes distincts selon les voies métaboliques utilisées pour fermenter les glucides: (i) les bactéries lactiques homofermentaires strictes sont capables de fermenter les hexoses presque exclusivement en acide lactique par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ou la glycolyse; (ii) les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives dégradent les hexoses en acide lactique par la voie d'EMP produisent de l'éthanol et/ou de l'acide acétique en plus de l'acide lactique; et (iii) les bactéries lactiques hétérofermentaires strictes peuvent produire de l'acide lactique, de l'éthanol ou de l'acide acétique et du dioxyde de carbone (Hammes and Hertel, 2006).

Les bactéries homofermentaires strictes possèdent une fructose-1,6-disphosphate aldolase, enzyme clef de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) aboutissant à la production quasi-exclusive d'acide lactique (Figure 10). Ces bactéries ne possèdent pas de phosphocétolase pour la fermentation des pentoses et du gluconate. Elles comprennent quelques espèces du genre *Lactobacillus* et la plupart des espèces des genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries hétérofermentaires possèdent, quant à elles, une fructose xylulose-5-phosphate phosphocétolase, enzyme clef de la voie des pentoses phosphates (voie de Warburg-Dickens-Horecker) qui conduit respectivement à la synthèse d'acide lactique et d'éthanol ou d'acide acétique. Ces bactéries sont également capables de dégrader les pentoses et souvent le gluconate car elles possèdent à la fois une aldolase et une phosphocétolase. Les bactéries lactiques hétérofermentaires strictes, étant dépourvues de fructose-1,6-disphosphate aldolase intervenant dans la glycolyse, métabolisent les hexoses et les pentoses par la voie du phosphogluconate pour produire de l'acide lactique, de l'éthanol ou de l'acide acétique et du dioxyde de carbone (Figure 10). Ces dernières comprennent les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* ainsi que quelques espèces du genre *Lactobacillus* (Tableau 8) (Hammes and Hertel, 2006).



**Figure 10. Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques (adapté de (Wee et al., 2006).**

**Tableau 8. Classification des bactéries lactiques selon leur métabolisme (adapté de Collins et al., 1991; Felis and Dellaglio, 2007; Wood and Holzapfel, 1995)**

		<b>Lactobacillaceae</b>	
<b>Type de fermentation</b>	<b>Homofermentaires stricts</b>	<i>L. animalis</i> , <i>L. aviarius</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sharpeae</i> , <i>L. yamanashiensis</i> <i>P. damnosus</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. parvulus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylophilus</i> , <i>L. amylotrophicus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. animalis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>delbrueckii</i> , <i>indicus</i> et <i>lactis</i> , <i>L. gallinarum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kalixensis</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> et <i>kefirgranum</i> , <i>L. ultunensis</i>
	<b>Hétérofermentaires facultatifs</b>	<i>L. agilis</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. bif fermentans</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. coryniformis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. graminis</i> , <i>L. homohiochii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>	<i>L. acetotolerans</i> , <i>L. fornicalis</i> , <i>L. hamsteri</i> , <i>L. intestinalis</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. kitasatonis</i> , <i>L. sobrius</i>
	<b>Hétérofermentaires stricts</b>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. suebicus</i> , <i>L. vaccinofermentum</i> , <i>L. vaginalis</i> <i>L. psittaci</i>	<i>L. fructosus</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. halotolerans</i> , <i>W. hilgardii</i> , <i>W. kandleri</i> , <i>W. minor</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> , <i>Leuconostoc. amelibiosum</i> , <i>Leuconostoc argentinum</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> , <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Leuconostoc fallax</i>
<b>Noms de genres:</b> <i>L.</i> : <i>Lactobacillus</i> , <i>P.</i> ; <i>Pediococcus</i> , <i>W.</i> : <i>Weisella</i>			

#### **4.4. Fermentation des sources de carbone du lait**

Dans le lait, les bactéries lactiques métabolisent principalement le lactose (clivé en glucose et galactose) et le citrate (McSweeney et al., 2017).

Dans le fromage, la fermentation du lactose en acide lactique par les ferments lactiques se produit principalement dans les premières heures de production et peut être considérée comme le processus de fermentation primaire. Au cours de la période d'affinage plus longue, qui peut durer de quelques semaines à plusieurs mois voire années, des fermentations secondaires peuvent se produire en raison des activités des ferments d'affinage et/ou des NSLAB (Martley and Crow, 1993).

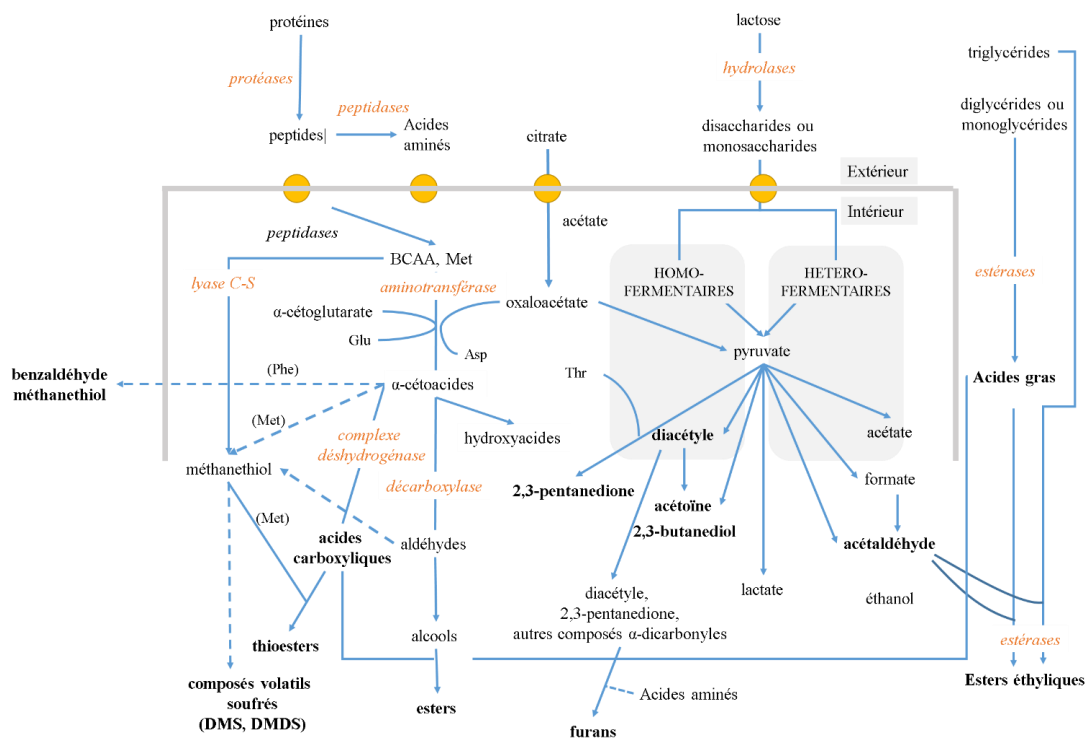
En plus du lactose résiduel, dont la concentration diminue dans le fromage pendant l'affinage, les NSLAB utilisent des hydrates de carbone dérivés de glycomacropéptides de caséines et de glycoprotéines dérivant de membranes de globules gras ainsi que le pentose issu de la lyse des ferments acidifiants.

Le citrate résiduel constitue également une source de carbone utilisable pour certaines souches. L'activité citrate-positif de certaines souches des bactéries lactiques résulte de la présence de gènes de transport du citrate, tel que le gène codant la citrate perméase, et du métabolisme du citrate. Les gènes impliqués dans le métabolisme du citrate sont parfois portés par un plasmide, comme chez *Weissella paramesenteroides*. Chez d'autres espèces, telles celles du genre *Lactococcus*, seuls les gènes de transport sont portés par un plasmide, ceux du métabolisme sont localisés sur le chromosome. Chez *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, ces deux fonctions sont portées par le chromosome, ce qui lui confère un phénotype citrate-positif stable (Hugenholtz, 1993; Levata-Jovanovic and Sandine, 1996).

#### **4.5. Conversion des constituants du lait**

Les bactéries lactiques contribuent à l'arôme et à la saveur des produits laitiers fermentés via la production de composés d'arômes, qui sont des produits finaux ou intermédiaires du métabolisme des substrats carbonés (lactose, citrate), et de leurs activités protéolytiques, lipolytiques et de catabolisme des acides aminés (Figure 11) (Urbach, 1995; van Kranenburg et al., 2002). De nombreuses enzymes sont mises en jeu dans les diverses réactions impliquées dans la formation des composés d'arômes (Smit et al., 2005).





**Figure 11. Voies métaboliques conduisant à la formation des principaux composés d'arômes par les bactéries lactiques homofermentaires et hétérofermentaires dans les produits laitiers fermentés. Principales enzymes impliquées = orange italique ; réactions chimiques non enzymatiques = flèches en pointillé ; BCAA = acides aminés ramifiés (leucine, isoleucine, valine, de l'anglais *Branched-Chain Amino Acids*) ; Asp = aspartate ; Phe = phénylalanine ; Thr = thréonine ; Met = méthionine ; DMS = sulfure de diméthyle ; DMDS = disulfure de diméthyle (adapté de (Atlan et al., 2008; Thierry et al., 2015))**

La saveur est l'attribut sensoriel le plus affecté par la fermentation. Les substrats du lait (glucides, protéines, lipides, acides organiques, acides aminés, composés phénoliques, glycosides, etc.) sont transformés en composés d'arômes non volatils et volatils qui affectent non seulement le goût mais aussi l'arôme et donc l'acceptation et l'attrait des produits laitiers fermentés. Ces composés aromatisants confèrent une gamme de propriétés sensorielles telles que le sucré (*e.g.* glycine), l'acidité (*e.g.* acide lactique), la saveur *umami* (*e.g.* acide L-glutamique), l'amertume (peptides hydrophobes), le fruité (esters) et des notes soufrées (composés soufrés volatils) (Hui and Evranuz, 2012).

Le pyruvate issu du métabolisme du citrate peut être converti en nombreux composés tels que l'acétate, l'éthanol, l'acétoïne (2-hydroxy-3-butanone), le diacétyle (2,3-butanedione) et

l'acétaldéhyde pour équilibrer la balance redox du métabolisme cellulaire (Smit et al., 2005). Certaines bactéries lactiques peuvent également synthétiser de la 2,3-pentanedione à partir de pyruvate et de thréonine.

Le diacétyl et la 2,3-pentanedione sont associés à un arôme de beurre qui contribue positivement à la flaveur d'une gamme de produits laitiers fermentés tels que le beurre, le yaourt et le fromage. Le diacétyl est largement produit par les bactéries lactiques, notamment par des espèces des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Oenococcus* (Thierry et al., 2015). Ainsi, les métabolismes du lactose et du citrate chez les bactéries lactiques conduisent à la formation de composés volatils qui contribuent à l'arôme typique de certains produits fermentés, tels que le kéfir et le koumiss (éthanol), la crème fraîche et le babeurre (diacétyl), et le yaourt (acétaldéhyde).

La protéolyse de la caséine, la métabolisation des peptides et des acides aminés, puis le catabolisme des acides aminés conduisent à la formation d'alcools, d'aldéhydes, d'acides, d'esters et de composés soufrés (Atlan et al., 2008). Même si d'autres voies peuvent être mises en jeu, une grande partie des composés d'arômes produits par les bactéries lactiques dérivent du catabolisme des acides aminés (principalement de la méthionine, de la phénylalanine, de la thréonine et des acides aminés à chaîne ramifiée) issus de la protéolyse de la caséine (Leroy and De Vuyst, 2004).

Les bactéries lactiques interviennent peu dans les réactions de lipolyse, plutôt dues à l'activité des levures et des moisissures (Smit et al., 2005). Ces activités sont généralement plus importantes chez *S. thermophilus* et les lactobacilles que chez les lactocoques. D'une manière générale, on distingue les estérases qui hydrolysent de façon préférentielle les esters formés avec des acides gras à chaîne courte (C2 à C8), des lipases qui sont actives sur des substrats émulsifiés contenant des acides gras à chaînes longues (>C8) (Atlan et al., 2008). Ces enzymes sont aussi capables de catalyser 4 types de réactions de synthèse d'esters : l'estérification par condensation d'un alcool sur un acide gras; la réaction d'alcoololyse entre un alcool et un glycéride, dans laquelle l'alcool joue un rôle analogue à celui de l'eau dans l'hydrolyse; l'acidolyse par la réaction d'un ester et d'un acide et la transestérification par réaction de deux esters. L'estérification et l'alcoololyse seraient les deux mécanismes impliqués dans la synthèse d'esters dans le fromage (Abeijón Mukdsi et al., 2018; Atlan et al., 2008; Thierry et al., 2017). La plupart des LAB ne possèdent que des estérases intracellulaires, à l'exception de *Lactobacillus fermentum*, chez lequel une estérase associée à la surface a été isolée. En

conséquence, la plupart des estérases de LAB ne peuvent hydrolyser les lipides alimentaires avant leur libération par les bactéries lysées (Thierry et al., 2015).

Les souches des NSLAB offrent un potentiel d'innovation dans la production des produits laitiers fermentés, notamment pour diversifier les notes aromatiques des produits. L'ajout de souches considérées comme NSLAB en tant que ferments additionnels pour la fabrication du fromage peut augmenter le niveau d'acides aminés libres, de peptides et d'acides gras libres, entraînant une augmentation de l'intensité de la saveur et un affinage accéléré du fromage (Banks and Williams, 2004; Settanni and Moschetti, 2010).

#### **4.6. Propriétés technologiques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques utilisées comme ferments acidifiants et ferments additionnels sont sélectionnées selon des critères technologiques (vitesse d'acidification, résistance aux bactériophages) et organoleptiques (production de composés d'arômes, de dioxyde de carbone et d'exopolysaccharides) propres à chaque produit fermenté. D'autres critères, relatifs à leur innocuité, sont également à prendre en compte dans la sélection des souches. Certains de ces critères sont détaillés ci-après.

##### **a. Acidification**

La capacité des ferments lactiques à acidifier le lait par la production d'acides organiques (principalement l'acide lactique) est un critère principal de sélection de ferments acidifiants, en particulier leur cinétique d'acidification, qui est un paramètre d'importance cruciale dans les fabrications industrielles. L'abaissement du pH lié à la production d'acide lactique au cours de la fermentation change la texture et les propriétés organoleptiques du produit. L'acidification joue un rôle clé dans le phénomène de déstabilisation des micelles de caséines, comme détaillé plus haut. Ce phénomène est responsable de la formation du caillé, gel ou coagulum, des laits fermentés et des yaourts, et se combine au phénomène de coagulation enzymatique par la chymosine dans les fromages (Tamime, 2002). L'acide lactique intervient également de façon directe sur le goût des produits (Tungjaroenchai et al., 2004). L'acidification s'accompagne également d'une diminution du potentiel d'oxydoréduction, ce qui favorise le développement des micro-organismes anaérobies impliqués dans l'affinage des fromages (Banks and Williams, 2004).

## **b. Production de composés d'arômes**

La production de composés d'arômes par des bactéries lactiques est un autre critère de choix des ferments d'affinage des fromages ou des ferments d'acidification des yaourts et des laits fermentés (Smit et al., 2005). Les bactéries lactiques contribuent à l'arôme et à la saveur des produits laitiers fermentés via leur métabolisme qui aboutit à la formation de plusieurs composés d'arômes ou précurseurs d'arômes (Wood and Holzappel, 1995). Le caractère souhaitable ou indésirable des composés d'arômes dépend de leurs concentrations et des matrices alimentaires dans lesquelles ils sont produits.

## **c. Production d'exopolysaccharides**

Les polysaccharides sont des polymères d'oses de très hautes masses molaires. Ils sont issus de différentes sources et ont été largement étudiés et utilisés pour leurs propriétés technofonctionnelles dans l'industrie laitière entre autres secteurs. Ce sont des composés d'intérêt pour de nouvelles applications en raison de leur biocompatibilité, de leur biodégradabilité et de leur non toxicité. Divers polysaccharides d'intérêt sont synthétisés par des bactéries lactiques de tous les taxons et sécrétés dans l'environnement externe. Ces polysaccharides sont appelés exopolysaccharides (EPS) et peuvent avoir une composition homopolymère ou hétéropolymère, et des poids moléculaires élevés (10 à 1000 kDa) (Nwodo et al., 2012). Parmi les différentes bactéries produisant des EPS, les bactéries lactiques ont un intérêt particulier. Il existe en effet une grande variété d'EPS produits par les bactéries lactiques en termes de quantité, composition chimique, masse moléculaire, charge, présence de chaînes latérales et rigidité des molécules. Les EPS de bactéries lactiques jouent un rôle crucial dans l'amélioration de la rhéologie, de la texture et de la sensation en bouche des aliments fermentés y compris les produits laitiers, et ont de nombreuses propriétés applicables en médecine (activités antitumorales, antiulcéreuses, antioxydantes et immunostimulantes) (Sanalibaba and Cakmak, 2016).

La production *in situ* d'EPS par les bactéries lactiques joue un rôle majeur dans la production de produits laitiers fermentés tels que le yaourt, le fromage, la crème fraîche et les laits fermentés. Dans ces produits, les EPS contribuent à la texture, à la sensation en bouche, à la perception du goût et à la stabilité du produit final. Les EPS peuvent agir à la fois comme texturants et comme stabilisants, d'une part, en augmentant la viscosité du produit final et, d'autre part, en liant l'eau d'hydratation et en interagissant avec d'autres constituants du lait tels que les micelles (Duboc and Mollet, 2001).

#### **d. Innocuité des bactéries lactiques**

Du fait de leur consommation par l'Homme depuis des millénaires, les bactéries lactiques des produits laitiers sont généralement considérées comme non pathogènes. Aux États-Unis, il existe une liste des souches qui possèdent le statut GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (Drouault and Corthier, 2001). En Europe, l'Agence européenne de sécurité des aliments (EFSA) a proposé en 2007 le système QPS (*Qualified Presumption of Safety* ou présomption d'innocuité reconnue) qui inclut une liste d'espèces définies pour l'alimentation animale. Selon le système QPS, toute nouvelle souche introduite dans l'alimentation doit faire l'objet d'une évaluation qui repose sur quatre critères : une identification précise de la souche au niveau de l'espèce, un état des connaissances sur l'utilisation de l'espèce, le type d'application envisagé (aliment) et la preuve de son innocuité (Bourdichon et al., 2012). D'autres tests complémentaires peuvent être également réalisés selon le microorganisme et les conditions d'utilisation. L'évaluation de la non-pathogénicité peut être également déterminée par des tests d'adhésion sur lignées cellulaires intestinales ou sur des modèles animaux (Vankerckhoven et al., 2008). L'absence d'un micro-organisme de la liste QPS ne signifie pas qu'il y ait obligatoirement un risque associé à son utilisation. De plus, il n'y a aucune obligation en France d'utiliser uniquement des micro-organismes possédant un statut QPS. Cependant, au Danemark, il est obligatoire depuis 1974 de n'utiliser en alimentation que des espèces microbiennes ayant obtenu cette certification (Bourdichon et al., 2012).

- ***Risques associés aux bactéries lactiques : production d'amines biogènes***

Les amines biogènes sont des molécules basiques, de faible masse moléculaire, issues principalement de la décarboxylation des acides aminés. La présence d'amines biogènes (tyramine et histamine en particulier) peut représenter un risque pour le consommateur surtout chez les sujets sensibles ou lors d'une ingestion massive. Ces molécules indésirables sont fréquemment retrouvées dans les aliments fermentés. Ces molécules ont des effets physiologiques négatifs lorsqu'ils se retrouvent dans la circulation systémique. Ils entraînent la libération d'adrénaline et noradrénaline qui va provoquer l'augmentation du rythme cardiaque, des nausées, des migraines ou encore une élévation de la pression sanguine (Linares et al., 2011). Malgré les effets néfastes avérés de ces molécules, il n'existe à ce jour qu'une seule réglementation pour les amines biogènes, concernant l'histamine dans les produits issus de la pêche (200 mg/kg maximum autorisé) (EFSA *Panel on Biological Hazards* (BIOHAZ), 2016).

De nombreuses espèces de bactéries lactiques ont été décrites comme synthétisant ces composés dans les produits fermentés. Les genres *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* présentent des souches capables de produire ces composés (Ladero et al., 2015; Lucas et al., 2003), ce caractère pouvant être espèce- ou souche-dépendant (Coton and Coton, 2009). Plusieurs conditions sont nécessaires pour la production de ces amines biogènes : la présence de précurseurs (acides aminés libres), une souche productrice qui possède au moins une enzyme de type aminoacide décarboxylase, un système de transport acide aminé/amine biogène et les conditions permettant l'expression de ce potentiel. L'EFSA préconise donc qu'il est préférable que les souches ajoutées dans l'alimentation ne produisent pas d'amines biogènes.

La sélection des souches repose sur la recherche du potentiel de production des amines biogènes soit par la recherche des gènes codant pour certaines décarboxylases, enzymes qui s'expriment surtout lors de longs processus de fermentation (par exemple, pendant l'affinage des fromages (Bernardeau et al., 2008), soit par des analyses chromatographiques.

- ***Risques associés aux bactéries lactiques: résistance aux antibiotiques***

Les bactéries lactiques sont connues pour être résistantes à plusieurs antibiotiques. Les bactéries lactiques peuvent porter et pour certaines transférer des gènes de résistance aux antibiotiques (Ammor et al., 2007). Une grande partie de ces bactéries, présentes dans les aliments fermentés, tiendraient leurs résistances de mutations. Beaucoup d'espèces de *Lactobacillus* possèdent des résistances naturelles (intrinsèques) comme celles pour la vancomycine et la teicoplanine (Ammor et al., 2007; Bernardeau et al., 2008). Il est possible de retrouver plusieurs résistances acquises, comme par exemple, la résistance au chloramphénicol (gène *cat*) chez des souches de *L. reuteri* et *L. plantarum*; et le gène de résistance à la tétracycline *tet(M)* chez des souches de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ou encore *L. lactis* (Ammor et al., 2007).

La recherche d'antibiorésistance est effectuée par des méthodes standardisées et normalisées. Tout d'abord, la concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée pour les antibiotiques ciblés. Le calcul de la CMI permet de définir si une souche est résistante ou sensible à un antibiotique donné. Ensuite, il est possible de déterminer le point de rupture microbiologique. Ce point est défini grâce à l'analyse de la répartition des CMI, pour les antibiotiques choisis, et ce pour les populations bactériennes d'une même unité taxonomique. Lorsqu'un microorganisme est défini comme étant résistant à un antibiotique, il est ensuite possible de

déterminer son origine, intrinsèque ou acquise (*European Food Safety Authority (EFSA)*, 2008).

## **5. Contrôle des contaminations fongiques**

### **5.1. Contaminations fongiques des produit laitiers**

Comme indiqué précédemment, plusieurs espèces fongiques peuvent être ajoutées volontairement dans de nombreuses variétés de fromages mais il peut y avoir aussi le développement d'espèces indésirables par contamination. En effet, les produits laitiers fermentés sont sensibles aux contaminations fongiques malgré des conditions de stockage réfrigéré, les traitements thermiques du lait et la teneur en acides organiques après fermentation qui acidifient le produit. Néanmoins, un nombre important d'espèces fongiques peuvent survivre et se développer dans les produits laitiers. Cette capacité d'adaptation peut s'expliquer par la capacité des champignons à utiliser de nombreux substrats, notamment les glucides, les acides organiques, les protéines et les lipides présents dans le lait et ses dérivés (Huis in't Veld, 1996). De plus, ces champignons sont acidotolérants, xérotolérants et/ou psychrotolérants et, dans une certaine mesure, tolèrent les conservateurs chimiques qui sont parfois ajoutés pour augmenter la durée de conservation du produit. Parmi les micromycètes indésirables, de nombreuses espèces sont connues pour altérer les produits laitiers comme récemment confirmé par (Garnier et al., 2016), le genre *Penicillium* étant largement représenté. On notera cependant que les caractéristiques intrinsèques et les facteurs extrinsèques associés à une matrice vont influencer le développement de certains genres ou espèces fongiques. Ceci, combiné à une contamination en général par un nombre faible de spores, conduit à la dominance d'une à quelques espèces fongiques. Leur présence dans les produits laitiers peut entraîner plusieurs types d'altération, par exemple la croissance visible du champignon à la surface du produit, des défauts de texture et la production de métabolites causant des odeurs indésirables (Ledenbach and Marshall, 2009).

Le contrôle de l'altération fongique est une préoccupation pour les industriels et les scientifiques qui recherchent des solutions efficaces pour prévenir et / ou limiter le développement de champignons dans les produits laitiers. Différentes méthodes traditionnelles, également appelées technologies « barrières », sont mises en œuvre pour contrôler ces

contaminations : traitement de l'air, procédures de nettoyage et de désinfection, traitement thermique, réduction de l'activité de l'eau par saumurage, réfrigération, conditionnement sous atmosphère modifiée (Garnier et al., 2017). La fréquence et le taux d'altération de nombreux produits laitiers peuvent être réduits ou retardés par l'application d'un ou plusieurs de ces traitements. Des conservateurs chimiques, considérés comme des additifs alimentaires, peuvent être également être ajoutés. Cependant, l'augmentation de la résistance fongique à ces conservateurs et surtout la demande des consommateurs pour des produits plus «naturels», ainsi que l'évolution de la législation ont conduit les producteurs laitiers industriels à trouver des approches de contrôle complémentaires. Cette situation a conduit au développement de nouvelles technologies de préservation telles que l'utilisation de cultures bioprotectrices

## **5.2. Bioprotection par des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont exploitées empiriquement comme micro-organismes de bioprotection depuis des siècles. Comme définie précédemment, la bioprotection consiste en l'utilisation de micro-organismes et/ou de leurs métabolites sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de micro-organismes indésirables (pathogènes, micro-organismes d'altération), et ainsi protéger et allonger la durée de vie des aliments crus (Stiles, 1996). L'effet conservateur des bactéries lactiques est principalement dû à la production d'un ou de plusieurs composés actifs dotés de propriétés antimicrobiennes, tels que les acides lactique et acétique, qui intensifient leur action en réduisant le pH des aliments. Un des critères de sélection des souches comme ferment additionnels de bioprotection est leur pouvoir d'inhiber les contaminants, en particulier ceux résistants aux pH acides et capables de se développer à basse température.

Dans le cadre de la bioprotection, certaines bactéries lactiques peuvent produire des bactériocines, des peptides de faible masse moléculaire avec un mode d'action antibactérien (Gálvez et al., 2007). Les bactériocines suscitent de plus en plus d'intérêt en raison de leur large spectre antibactérien et de leur application possible dans les aliments tels que la viande et les produits à base de poisson, les fruits et légumes, les céréales et les boissons (Cleveland et al., 2001). De plus, les bactériocines dérivées de bactéries lactiques attirent l'industrie alimentaire en raison de leur activité contre les principaux pathogènes à Gram positif impliqués dans des intoxications alimentaires, tels que *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*. L'utilisation de bactériocines en tant que poudres purifiées et, par conséquent, en tant qu'additifs alimentaires, nécessite une évaluation exhaustive des effets



toxicologiques avant leur acceptation légale. Pour cette raison, seules la nisine et la pédiocine PA-1 sont exploitées commercialement à ce jour (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008). Les bactériocines sont largement connues pour leur activité antibactérienne mais un petit nombre de bactériocines ont montré une activité antifongique, comme par exemple la pentocine TV35b qui inhibe *Candida albicans* (Okkers et al., 1999) et des bactériocines de deux souches de *L. plantarum* contre *Fusarium parasiticus* (Luz et al., 2017).

Concernant, l'activité antifongique des bactéries lactiques celle-ci n'est pas encore totalement élucidée, aussi bien du point de vue des molécules impliquées que de celui des mécanismes d'action. Cependant, la liste des composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ne cesse de s'allonger. Il s'agit de métabolites primaires et secondaires issus de la fermentation et des différentes voies de dégradation utilisées par les bactéries lactiques. Ces dernières produisent plusieurs composés antifongiques, notamment des acides organiques (acide lactique, acide acétique, acide phényllactique, acide caproïque), du dioxyde de carbone, du peroxyde d'hydrogène, du diacétyl, de l'éthanol, des acides gras, des peptides et de la reutéline (Crowley et al., 2013a). La plupart des molécules antifongiques ont ainsi une fonction primaire dans l'élaboration sensorielle et nutritionnelle des produits laitiers fermentés (Strom et al., 2002). Comme évoqué précédemment certains peptides peuvent avoir des activités antifongiques. Un nombre limité de peptides antifongiques produits ont été rapportés et identifiés, tels que cyclo (Phe-OH-Pro), cyclo (Phe-Pro) (Magnusson et al., 2003), cyclo (Leu-Leu) (Yang and Chang, 2010), et des mélange de peptides (Coda et al., 2011). La plupart des peptides rapportés proviennent de l'hydrolyse des composants du milieu en présence de bactéries lactiques.

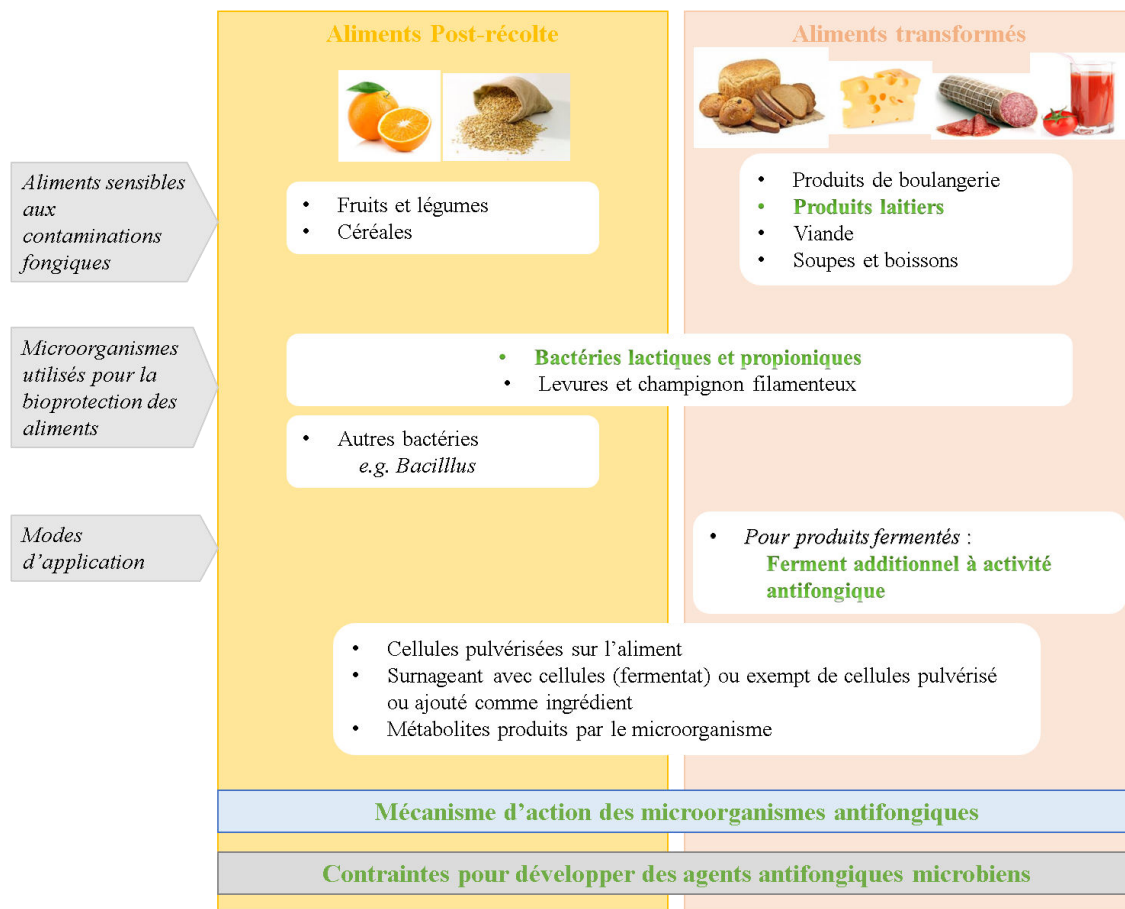
L'utilisation des bactéries lactiques pour la bioprotection des produits laitiers peut être envisagée de trois manières (Stiles, 1996) comme montré dans la Figure 12: (i) par ajout de métabolites purifiés ou semi-purifiés, (ii) par ajout du surnageant de culture sans bactéries (ou CFS pour *cell-free culture supernatant*) ou de fermentat (milieu fermenté contenant les bactéries), qui apportent les métabolites produits par les bactéries dans le milieu, et (iii) à travers la production de métabolites *in situ* par l'ajout des bactéries en tant que ferment additionnels. Actuellement, la troisième option est la plus largement envisagée pour assurer la production de composés antimicrobiens naturels dans l'aliment fermenté (Axel et al., 2016b, 2016a; Delavenne et al., 2015; Le Lay et al., 2016b).

### **5.3. Bactéries lactiques bioprotectrices : applications et mécanismes d'action**

Cette partie fait l'objet d'un article scientifique de synthèse intitulé « *Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review* » et publié dans le journal *Microorganisms* pour une édition spéciale ayant pour titre « *Beneficial Microorganisms for Food Manufacturing - Fermented and Biopreserved Foods and Beverages* ».

Cet article avait pour objet de synthétiser et discuter : (i) les contaminants fongiques dans différents aliments comme les fruits et légumes post-récolte et les aliments transformés (*i.e.* boissons fermentées et non fermentées, produits de boulangerie, produits de charcuterie et produits laitiers), (ii) les différents micro-organismes (levures, champignons filamenteux, bactéries lactiques et autres bactéries) utilisables en bioprotection pour lutter contre ces contaminants, et (iii) leurs mécanismes d'action, c'est-à-dire les moyens par lesquels ces micro-organismes antifongiques inhibent les contaminants fongiques (*i.e.* production des composés antifongiques, formation des biofilms, compétition pour les nutriments). Cet article est orienté vers l'étude de l'activité antifongique des micro-organismes *in situ* dans les aliments et passe également en revue les contraintes associées à l'utilisation et la mise sur le marché de ces micro-organismes pour la bioprotection des aliments. Ces contraintes couvrent les aspects : innocuité, modes d'utilisation des cultures antifongiques, techniques pour augmenter l'activité antifongique, impacts sur les caractéristiques organoleptiques des aliments et efficacité en production à grande échelle.

Ce paragraphe résume l'état de l'art des connaissances sur l'utilisation de bactéries lactiques et propioniques pour la bioprotection des produits laitiers et leur mécanisme d'action (en vert dans la Figure 12). La synthèse bibliographique ouvre une vue plus étendue des applications de la bioprotection comme lutte contre les contaminations fongiques des aliments, schématisée sur la Figure 12. Malgré la diversité des aliments et des micro-organismes (bactéries lactiques, autres bactéries, levures et champignons filamenteux), les questionnements liés au développement de cultures antifongiques, comme le développement d'une démarche de criblage de micro-organismes à activité antifongique, l'importance de validation *in situ* dans l'aliment, les mécanismes d'action impliqués, sont communs quel que soit le couple aliment/microorganisme considéré.



**Figure 12.** Schéma du contenu de l'Article 1: 'Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review' décrivant les contaminations fongiques dans des aliments post-récolte (rectangle jaune) et transformés (rectangle orange), l'utilisation des différents micro-organismes pour la bioprotection de ces aliments et leur mode d'application, ainsi que les mécanismes d'actions des micro-organismes et les contraintes à prendre en compte avant leur mise sur le marché. Le texte en vert concerne directement les éléments étudiés au cours de cette thèse (ferments additionnels antifongiques dans les produits laitiers).


## **Article 1**

# **Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation —A Review**



Review

# Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review

Marcia Leyva Salas <sup>1,2</sup>, Jérôme Mounier <sup>1</sup>, Florence Valence <sup>2</sup> , Monika Coton <sup>1</sup>, Anne Thierry <sup>2</sup> and Emmanuel Coton <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM EA3882), Université de Brest, Technopole Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France; marcia.leyvasalas@univ-brest.fr (M.L.S.); jerome.mounier@univ-brest.fr (J.M.); monika.coton@univ-brest.fr (M.C.)

<sup>2</sup> UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35000 Rennes, France; florence.valence-bertel@inra.fr (F.V.); anne.thierry@inra.fr (A.T.)

\* Correspondence: emmanuel.coton@univ-brest.fr; Tel.: +33-2-9091-5111; Fax: +33-2-9091-5100

Academic Editors: Régine Talon and Monique Zagorec

Received: 9 May 2017; Accepted: 24 June 2017; Published: 8 July 2017

**Abstract:** Food spoilage is a major issue for the food industry, leading to food waste, substantial economic losses for manufacturers and consumers, and a negative impact on brand names. Among causes, fungal contamination can be encountered at various stages of the food chain (e.g., post-harvest, during processing or storage). Fungal development leads to food sensory defects varying from visual deterioration to noticeable odor, flavor, or texture changes but can also have negative health impacts via mycotoxin production by some molds. In order to avoid microbial spoilage and thus extend product shelf life, different treatments—including fungicides and chemical preservatives—are used. In parallel, public authorities encourage the food industry to limit the use of these chemical compounds and develop natural methods for food preservation. This is accompanied by a strong societal demand for ‘clean label’ food products, as consumers are looking for more natural, less severely processed and safer products. In this context, microbial agents corresponding to bioprotective cultures, fermentates, culture-free supernatant or purified molecules, exhibiting antifungal activities represent a growing interest as an alternative to chemical preservation. This review presents the main fungal spoilers encountered in food products, the antifungal microorganisms tested for food bioprotection, and their mechanisms of action. A focus is made in particular on the recent in situ studies and the constraints associated with the use of antifungal microbial agents for food biopreservation.

**Keywords:** antifungal; bioprotection; biocontrol; food; post-harvest; fungi; lactic acid bacteria; propionibacteria; *Bacillus*; fermentates; molecules

## 1. Introduction

Today, food losses are a major concern worldwide especially with an ever-growing world population and the fact that approximately one-third of all food produced for human consumption is either lost or wasted [1]. Each year, an estimated 1.3 billion tons of food are lost or wasted as stated by the Food and Agriculture Organization of the United Nations [2]. When considering each food category, these losses correspond to 40–50% of root crops, fruits, and vegetables; 35% of fish and seafood; 30% of cereals; and 20% of meat, oil seed, and dairy products [2]. In developing countries, post-harvest loss rates are high with 30–40% occurring during the post-harvest and processing stage [3], while in industrialized countries similar loss percentages (30%) occur at the retail or consumer levels [1]. The reasons for this massive global food loss are diverse, but microbial spoilage, which affects organoleptic product quality (aspect, texture, taste, and aroma), plays a major role. Among spoilage



microorganisms, fungi are a major issue at any stage of the food chain because of their ability to grow in different and even harsh environments [4]. Beyond their negative impact on food quality, some fungal genera such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, and *Fusarium* have the ability to produce secondary metabolites that can have a toxic effect on humans and animals and are therefore named mycotoxins. Moreover, mycotoxins are able to withstand various food processing steps and can thus lead to food safety concerns [5]. Fungi, mainly under an airborne spore form (either sexual or asexual), can settle and grow at different stages of a product life, i.e., at the field, post-harvest, during processing, storage and handling steps by the producer, wholesaler, retailer, and consumer. The impact of contamination at each level can obviously lead to economic losses at both the producer and consumer levels [1]. Moreover, producer losses can be reinforced by a negative brand image induced by consumer dissatisfaction.

In this context, it is crucial to reduce food losses by controlling fungal contamination at all stages of food process chains. Three main stages can be defined to group fungal contamination factors: (i) the field, where water, soil, and air are natural fungal niches; (ii) raw materials—such as post-harvest crops, meats, and milk—where fungal occurrence is related to food management during harvest or collecting, transportation, storage, and packaging [4] and (iii) during food processing while manufacturing dairy, bakery, dry-ripened, and drink products. For field crops, fungal contamination is usually controlled by using synthetic fungicides associated with some crop management practices such as crop rotation, use of resistant cultivars, and tillage [6]. Concerning raw materials, fungicides are widely applied to protect post-harvest fruits and vegetables, but other treatments such as disinfection with ozone, chlorine, acidified hydrogen peroxide, pH change with sodium bicarbonate, surface sterilization using irradiation or thermal treatments, as well as waxing with active coatings containing fungicidal agents and preservatives are also used. Moreover, different packaging techniques are also used to protect crops from mechanical damage, which is the most common entry point of microbial infections [7,8]. During food processing and raw material storage, good hygiene practices, a hazard analysis critical control point (HACCP) system, efficient equipment and air decontamination, and control of air pressurization to prevent air flow from the dirtiest to cleanest areas—cleanroom technologies (aseptic or ultraclean technologies)—can also be applied to prevent contaminations. Moreover, hurdle technologies are also applied according to the given process and raw materials. They can include thermal treatments such as cooling or heating by pasteurization, sterilization, and heating at ultra-high temperatures (UHT); water removal by drying, freeze-drying, smoking; water activity reduction by addition of high sugar and salt concentrations; pH modification by immersion in vinegar or other acids; and the use of non-thermal preservation such as modified atmosphere packaging to reduce O<sub>2</sub> and increase CO<sub>2</sub> levels; and finally high-pressure treatment and high electric field pulse to control or inactivate microorganisms and spores especially in foods and beverages such as yogurts, soups, sauces, liquid eggs, fruit and vegetable juices, raw milk and whey, soft drinks, and alcoholic beverages [9,10]. Moreover, chemical preservatives—including benzoate, propionate, sorbate, nitrate, nitrite, and sulfites—are used to avoid fungal spoilage [11]. The only microbial derived antifungal compound used as food preservative is natamycin (E235). It is produced by *Streptomyces nataliensis* and belongs to the group of polyene macrolide antimycotics. The use of natamycin on cheese as a surface treatment is approved by most countries and its addition into other foods depends on legislation [12].

The potential adverse environmental and health effects of certain fungicides and preservatives have led to more natural methods. Concerning crops, undesirable concentrations of residual pesticides on harvested products, regulations, acquired resistances by fungi, and environmental impact have led to biocontrol agent development (reviewed for fruits and vegetables by [13] and for cereals by [14] currently a fast-growing sector, is also in need of natural solutions to reduce crop losses. Several products composed of bacteria, fungi, and yeasts are currently commercialized worldwide [15–18]. Concerning raw materials and processed foods, preservatives are widely used. However, while their use is regulated in many countries, ingestion of some of them raises questions



about their potential adverse health effects, especially when considering their chronic consumption over years [11]. Moreover, fungal spoiler resistances have been previously reported in some cases [19,20]. In this context, there is a strong societal demand, supported by public authorities, for less processed and preservative-free foods, such as 'clean label' products, and the use of natural alternatives. Such alternatives mainly correspond to the use of essential oils [21–23] and antagonistic microorganisms as preservation tools [24–29]. The use of natural or added microorganisms, fermentates (i.e., an ingredient produced by the fermentation of a variety of raw materials by a microorganism), or their metabolites to extend food shelf-life and/or increase food safety (through antibiosis of pathogenic or spoilage microorganism) is referred to as 'biopreservation' or 'biocontrol' [30]. This alternative approach is complementary to hurdle technologies. Biopreservation by lactic acid bacteria (LAB) is currently the principal alternative to preservatives in food and is widely studied because of the role and long history of use of LAB in fermented foods, their ability to produce antifungal metabolites, and their GRAS (Generally Regarded as Safe) and Qualified Presumption of Safety (QPS) status in the USA and EU, respectively. The use of antifungal LAB for food biopreservation was previously reviewed in 2013 by Crowley [24]. Other antifungal microorganisms to prevent post-harvest fungal spoilage has been reviewed by Sharma et al. (2009) and Liu et al. (2013) [29,31]. Since then, there have been significant advances in the knowledge surrounding the use of antifungal microorganisms. Therefore, the objective of this review is to report the advances on LAB applications as antifungal agents (over the last three years) as well as other antifungal microorganisms, namely non-LAB bacteria, yeasts, and molds that can be used at the post-harvest stage, for raw materials, or during food processing. Crop biocontrol will not be considered in this review and the reader is referred to the recent review for cereals by Oliveira et al. 2014 [14], Punja & Utkhede, 2003 [32], Milind et al. 2016 [33], and Nguyen et al. 2017 [34]. It will detail the main fungal spoilers encountered in different raw or processed foods, antifungal microorganisms that can be used for food bioprotection, and current knowledge about their mechanisms of action. Finally, advances and constraints associated with the use of antifungal biopreservatives in food and the future areas of research required in this field will be discussed.

## 2. Fungal Spoilers

### 2.1. Quality and Safety Issues

Food products are susceptible to fungal spoilage due to their natural nutrient rich composition. This susceptibility does however depend on various factors, namely (i) the food matrix nature (living material or not, liquid or solid), its composition (nutrient content, solute type), and biological (e.g., its natural microbiota), physical, and chemical parameters (water activity, pH); (ii) management during harvesting of fruits and vegetables (maturity, handling) and raw material storage (temperature, hygrometry, and duration); (iii) technological processes applied during manufacture (e.g., heating, drying, salting, fermentation, preservative addition) including cleaning/disinfection steps; and (iv) storage conditions after manufacturing (type, atmosphere and extent of packaging, temperature, relative humidity). Food matrix intrinsic characteristics and also associated extrinsic factors will control the development of certain fungal genera or species. This usually leads to the selection or dominance of one or more fungal species on a given matrix.

Regarding quality, the impact of fungal contaminations can lead to visual and/or other defects. Regarding visual defects, the most obvious is product aspect with apparent fungal growth due to noticeable presence of thallus or yeast colonies that eventually leads to rotting. The presence of black, white, green, pink, or yellow spots can also be associated with fungal development [4]. This usually leads to elimination of the entire product at the industrial or consumer level. According to the nature of the commodity and the contaminant type, the impact might be less evident to observe, but fungal metabolism can lead to various organoleptic defects including gas production, off-flavors, and texture changes. One of the best known off-flavors associated with fungal contamination corresponds to animal-like aroma development linked to volatile phenols (4-ethyl phenol, guaiacol,



or catechol) in wine and cider by *Brettanomyces* spp. [35,36]. In wine, molds have also been shown to be responsible for the production of earthy/moldy (e.g., geosmin, methylisoborneol) off-flavors [37,38]. Gas production have also been observed. For example, the presence of bubbles was observed in packaged meat inoculated with *Kazachstania psychrophila* [39]. *Kazachstania servazzii* has been associated with severe package swelling of prepared fresh pizzas [40] while yogurt has been shown to be contaminated by fermentative yeasts (e.g., *Meyerozyma guilliermondii*) that led to top lid bulging [41]. Moreover, due to enzymatic lipolytic, proteolytic, and amylolytic activities, product texture can also be affected. For example, *Yarrowia lipolytica* can produce off-flavors, stimulate the formation of biogenic amines, and negatively affect cheese texture [42].

Regarding safety concerns, fungal presence and growth may also lead to health hazards associated with the presence of mycotoxins that can be produced by species belonging to the *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, and *Alternaria* genera. This aspect is of importance as about 25% of raw materials produced by agriculture worldwide are estimated to be contaminated by fungi and mycotoxins [43,44]. Some mycotoxins can induce toxic, carcinogenic, and mutagenic reactions in humans at low concentrations [5]; aflatoxins, ochratoxin A, patulin, fumonisins, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins, and deoxynivalenol are considered to be the most significant mycotoxins. The main problem is the presence of mycotoxins in processed foods as the presence of the mycotoxigenic spoilers can no longer be detected, but these metabolites are usually resistant to technological treatments. This has led to regulations on mycotoxin limits in various countries [45]. Among important mycotoxins in food spoilage, aflatoxins and ochratoxin A are produced by several members of *Aspergillus* while OTA can also be produced by some *Penicillium* species. *Aspergillus flavus*, the main aflatoxin producer, is a common spoiler of various commodities (fruits and vegetables, spices, cereals, bread, and nuts such as peanuts, almonds and pistachios). Fumonisins are produced by *Fusarium* and *Aspergillus* species. For example, *Aspergillus awamori* strains infecting onions and *Aspergillus niger* found in coffee beans and grapes produced fumonisins and ochratoxins. Moreover, a further potential risk is associated with products derived from raw materials containing these mycotoxins [5]. Patulin, which is non-carcinogenic but immunotoxic and neurotoxic in animals, can be produced by several *Alternaria*, *Paelomyces*, *Aspergillus*, and *Penicillium* species. For example, patulin can be produced by *Penicillium expansum*, a common apple spoiler, and then be transferred to juices and other derived products (e.g., baby food, apple sauce) [5]. Fungi from the *Alternaria* genus are common on post-harvest fruit decay. They can produce different mycotoxins such as alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, altertoxins I, II, III (ATX-I, -II, -III), and tenuazonic acid that have a mutagenic effect [46]. So far, the mycotoxin risk is considered for a single mycotoxin, however, mycotoxin contamination rather corresponds to multi-occurrence due to the simultaneous presence of several mycotoxigenic species and/or of species able to produce several mycotoxins [47].

## 2.2. Isolation and Identification of Fungal Spoilers

Before developing biopreservation or biocontrol tools (i.e., selecting antifungal microbial agents) to control fungal spoilers, it is fundamental to determine the main fungal contaminants and their occurrence in a given food. This mainly relies on their isolation and accurate identification at the species level, which will consequently also provide information on their mycotoxigenic potential. In the context of fungal spoilage, contamination of a given food product is usually linked to a limited number of species and, therefore, culture-dependent methods are the most appropriate. The first step corresponds to isolation and/or enumeration of these microorganisms which can be performed not only from the contaminated food but also from other potential contamination sources like air and surfaces. The use of specific media is a classical step to isolate and determine total counts as well as morphotype observation. After isolation of the observed contaminant, identification is performed using dedicated methods. Although molds can be presumptively identified from their morphology (e.g., by Pitt test), molecular methods have become the gold standard for fungal identification. PCR amplification and sequencing of the D1/D2 domain of the large subunit of ribosomal RNA (26S) and of the internal



transcribed spacer (ITS) are routinely performed for yeast and molds, respectively [48–51]. However, concerning molds, ITS is not always informative enough for some species, and other gene targets can be sequenced to complete identification at the species level. For example, the  $\beta$ -tubulin gene is commonly used for *Penicillium* and *Aspergillus* spp., actin gene for *Cladosporium* spp., and the elongation factor gene for *Fusarium* spp. It is more and more common to use a combination of taxonomically relevant genes to facilitate identification and potentially describe new spoiler agents.

It is worth noting that the constitution of fungal spoiler culture collections would be of great interest to study antifungal cultures. These collections are especially of interest if they contain various strains of a given species. Indeed, most studies only focus on one strain of a given fungal spoiler, raising questions about the representativeness of the selected target strain.

### 2.3. Fungal Spoilers and Food Chains

The diversity of fungi and yeast as food spoilers has been explored in different studies and food products. Notably, fungal species are not always detrimental for food production and some species are even crucial, especially in fermented foods to obtain the typical organoleptic traits of the final product, e.g., *Saccharomyces cerevisiae* in fermented beverages, *Penicillium camemberti* in mold-ripened cheeses, or *Aspergillus oryzae* in soy sauce. Moreover, it should be kept in mind that a fungal species that is expected and often deliberately added in some fermented foods can be a spoiler in another product. For example, *Penicillium roqueforti*—a species essential for blue-veined cheese production—can spoil grated cheese or fresh cheese.

When considering food spoilage by fungi, two main food categories have been proposed by Pitt & Hocking, namely (i) fresh or perishable foods (subcategorized in living and non-living cells) and (ii) stored or processed foods [4]. For a complete view of fungal spoilage of these products, one should refer to these authors' books, which are considered as the reference in the domain. Post-harvest fungal spoilage of crops is most often referred to as 'post-harvest disease', and spoilers are referred to as 'pathogens', therefore these terms will also be used hereafter.

#### 2.3.1. Fresh or Perishable Foods

Concerning foods and raw materials of plant origin, fruits and vegetables are mainly susceptible to fungal contamination during the ripening stage because of changes in pH, skin, carbohydrates, and defenses that induce favorable conditions for fungal spoilers. Fungi induce visible symptoms on post-harvest crops including discoloration and tissue lesion formation. Their presence leads to spoilage of a variety of fruits including citrus, pome, berry, stone, tropical, and solanaceous fruits. Fungal pathogens of fruits and vegetables have been largely documented [5,8,52]. Tubers and other vegetables—including bulbs, crucifers, cucurbits, and legumes—are less affected than fruits by fungal pathogens, partly because of their pH making them a more suitable environment for bacterial pathogens [52]. Fungal species belonging to the *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium*, and *Mucor* genera are responsible for many of the most important postharvest diseases [29].

For foods and raw materials of animal origin, fresh milk and fish are less susceptible to fungal spoilage but highly affected by bacterial spoilage. Concerning meat, fungal spoilage can occur, especially during refrigeration, even if bacterial spoilage is predominant [53]. Despite a need for more studies, *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Aureobasidium* species have been reported to provoke black spots, while *Thamnidium* spp. can cause 'whiskers' on carcasses. Yeast belonging to *Cryptococcus*, *Candida*, and *Yarrowia* genera have been reported on aerobic packaged food and can provoke off-flavors and aspect defects, such as slime or spots [54].

#### 2.3.2. Stored and Processed Foods

Stored and processed foods include a wide variety of food products, in which water activity ( $a_w$ ) determines viability and functionality of microorganisms. Most of them can not multiply below



0.900  $a_w$ , while xerophilic fungi can survive at 0.755–0.605  $a_w$  [55]. Final moisture content and water activity are linked to the technological processes used (e.g., fermentation, drying, salting, evaporation, and freeze-drying) [10]. For intermediate and high water activity products, the main food categories concerned by fungal spoilage are dairy products (yogurt, cream, butter, cheese . . . ). These products, usually kept refrigerated, can be affected by both yeasts, especially *Candida* spp., *Yarrowia lipolytica* and *M. guilliermondii*, and molds, mainly *Penicillium*, *Mucor* and *Cladosporium* spp. [49]. Processed meats (chilled meats, bacon), which exhibit an intermediate moisture content, are commonly spoiled by *Penicillium*, *Aerobasidium*, *Cladosporium*, and *Eurotium* spp., but also *Debaryomyces hansenii*, *Y. lipolytica* and *Candida* spp. For low water activity food products such as cereals, nuts, spices, dried milk, dried meats (dried beef, biltong) and, fermented meats (dry cured ham, salami, and fermented sausage) [4]. *Eurotium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* spp. are the main spoilers. Spoiling yeasts such as *D. hansenii* and *Y. lipolytica* have also been found in dried meats [56] and *Candida* spp. in fermented meat [4]. Some of the most xerophilic species are *Wallemia sebi*, *Eurotium repens*, *Eurotium halophilicum*, *Xeromyces bisporus*, and the yeast *Zygosaccharomyces rouxii* found in concentrated foods (e.g., fruit concentrates, jams and confectionery), cereals and spices, [55,57,58]. Recently, *Aspergillus penicillioides* found in dried fish [59] was shown to be the most xerophilic fungal species registered to date as it was able to germinate at 0.585  $a_w$  [60].

Heat treatments, especially when applied to acidic foods, usually allow for fungal destruction. However, ascospores of some species (*Byssosclamyces nivea*) are resistant and can cause spoilage in fruit puree or fruit juices [61]. Noteworthy, contamination of heat-treated products can occur as post-contamination by non-heat-resistant species. This is the case of bakery products, with breads being particularly susceptible to fungal spoilage. The most frequently found genera are *Penicillium* [62] *Aspergillus*, *Wallemia*, and *Eurotium* [63]. In salted foods, *Wallemia sebi*, *Aspergillus* spp. and *Eurotium* spp. are the main spoilers associated with salted fish [64].

### 3. Antifungal Microorganisms in Food

As previously stated, to answer the strong societal demand for less processed and preservative-free foods, biopreservation has received growing interest for improving food quality and safety [14,65]. In past years, many strains from various microbial species that harbor antifungal properties have been identified. They have been isolated from various sources, such as fruits, vegetables, cereals, milk, meat, and other food-related products. The isolation of new bioprotective cultures has recently been extended to other environments, such as deep-sea [66] and Antarctic soil samples [67] in order to discover microorganisms potentially producing new antifungal metabolites.

Screening steps are required to find efficient antifungal microorganisms as antifungal activity levels and the spectrum of the inhibited fungal targets greatly vary depending on the considered species, and from strain to strain within a species. For example, up to 75% of variation was observed between five strains of *Lactobacillus casei* tested for their potential to inhibit the growth of four spoilage molds [68]. In another study, only a few *L. plantarum* isolates among 88 screened showed a wide spectrum of fungi inhibition [69]. In another example, among 55 yeast isolates (*Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus magnus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zeylanoides*, *Candida sake*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Pseudozyma aphidis*) from the surface of grape varieties, 58% were able to inhibit *A. tubingensis* growth in vitro and 27 from 37 strains of *A. pullulans* were antifungal indicating a strain-dependent trait [70].

#### 3.1. Screening and Validation Methods

##### 3.1.1. In Vitro Screening

Candidate bacteria, yeasts, and molds are generally first isolated from various biotopes and purified in order to be tested for their antifungal properties. These candidates are then tested against one or several fungal targets. As stated in the previous chapter, the choice of fungal target(s) is crucial, since they should be representative of the dominant species associated with a given food product and



since the antifungal effects observed depend on the fungal species. For example, the inhibition of three berry contaminants—namely *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*—by four antifungal yeasts varied according to the target [71]. Also, growth inhibition of seven targets from the *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Cladosporium* genera varied for the 88 *Lactobacillus plantarum* strains tested [69].

Several approaches, ranging from classical methods in agar plates to high throughput assays in multi well-plates, have been developed to screen microorganisms for their ability to inhibit spoilage fungi. In the spot-on-lawn assay, cultures or cell-free supernatants of the tested strains are spotted over an agar plate, over which a second layer containing the fungal target is poured. In the agar diffusion method, the tested agent is spotted over an agar layer inoculated with the fungal target. In both these assays, formation of an inhibition halo after incubation around the spots reveals the antifungal activity. A dual culture technique has also been used to test the antagonistic effect of a potential antifungal mold against a target mold, in which agar plugs containing the target and the antifungal molds, respectively, were inoculated at the opposite sides over an agar plate [70,72]. Another screening approach corresponds to the investigation of the enzymatic activities required to degrade the cell wall of the fungal target as shown by Tokpah et al. (2016) that screened bacteria for control of a rice pathogen, *Magnaporthe grisea*. In this context, activity of cell wall degrading enzymes—such as cellulases, proteases, chitinases, and glucanases—was assessed by plating bacteria on agar media containing substrates of these enzymes where active bacteria induced clearing zones [73].

For high-throughput screening purposes, agar plate methods have been recently adapted in 24-well plates. The fungal target can be included in an agar medium and poured in each well over a first agar layer spotted with the potential antifungal strains [74]. Alternatively, spores of the target mold are inoculated on the surface of the first agar layer containing the potential antifungal strains [63].

Most in vitro screening experiments of LAB antifungal activities have been performed using synthetic media, such as the de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar medium. The composition of MRS can strongly impact the expression of antifungal activity by LAB because it contains acetate, which may reinforce LAB antifungal activity and artificially inflate the number of active isolates, as mentioned in several studies [63,75,76]. Similarly, the presence of several antifungal compounds—such as cyclic and linear peptides and diketopiperazines—has been reported in the classical lactate-tryptone-yeast extract medium used to grow propionibacteria [77]. Other important points are the nature and concentration of sugars and the buffering capacity of the medium, which are highly expected to influence the amount of organic acids and the final pH of the medium, thus modifying antifungal activity. Some alternatives to the use of synthetic laboratory media have been recently reported. Particular attention has been paid to design media more closely related to foods and usable in 24-well plates to screen bacterial antifungal activity. This approach was recently used with a wheat flour hydrolysate agar medium and with yogurt [63,78]. Similarly, a method using a model cheese distributed in 24-well plates was also recently developed allowing for high-throughput antifungal activity screening of either LAB fermentates or LAB starters [79].

Whatever the considered screening experiments, it is important to take into account the conditions prevailing in situ to develop relevant screening approaches. Actually, several studies have shown that strains exhibiting in vitro antifungal activity were far less or even no longer active when tested in the food products [63,80–82]. When grown on a wheat flour medium, 20% of the 270 tested LAB strains representing six genera screened were found to inhibit the five fungal targets tested while none were detected when grown in MRS agar without acetate [63].

For all these reasons, results of in vitro screening are highly heterogeneous in terms of proportion of strains and nature of species harboring antifungal activity. To maximize the chances of finding efficient strains in situ, approaches based on the use of food-related media and screening conditions should be further developed, in particular at a high throughput scale for large collections of strains.



### 3.1.2. Validation by Challenge-Test in the Food Products

In all cases, in situ evaluation in the actual food products of the antifungal activity of the microorganisms or their metabolites selected from in vitro screening is essential, since, as stated above (see also chapter V), many studies report discrepancies between results observed in vitro and in situ [83].

The developed approaches depend on the type of foods to be protected (raw material or processed food, fermented or not), and on the antifungal microorganism used, to maximize efficiency without adverse effects on the sensory characteristics of the food or on the environment. Biopreservation/biocontrol can be achieved either (i) by adding an active ingredient constituted of a fraction containing purified metabolites, a cell-free supernatant (CFS), a fermentate; or (ii) by using cells expected to grow on or in the food product.

Concerning postharvest fruits, bacterial cells, yeast cells, and cell-free supernatants of molds were evaluated by spraying them onto the surface of an intact fruit or on a wound, before inoculation of the fungal target [31,84–86]. Concerning fermented foods, antifungal bacteria can be added as adjunct cultures during the process, along with the usual starters. This has been done in different foods including dairy products [87–89] and bakery products for which adjunct strains were added in the sourdough [90–93]. Alternatively, antifungal ingredients can be incorporated during the process or sprayed over the food, as done for bakery products [63]. In this study, only 12 out of 69 LAB and PAB strains selected from in vitro screening on whey flour agar showed an effect in situ after having sprayed the fermented medium on the surface of the bakery products, thus confirming the necessity to go beyond in vitro tests.

In most cases, fungal targets are inoculated and the ability of tested bioprotective agents to restrain fungal growth is evaluated. Their impact on mycotoxin production can also be investigated, as done for example for deoxynivalenol produced by *Fusarium culmorum* during malting [94] and aflatoxin produced in vitro by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* [95]. Environmental challenge tests are also applied in which the activity is tested to prevent environmental fungal contaminants, after exposing the products to the airborne molds of the environment, for example in a bakery [83] or dairy environment [89]. The interest of appropriate in situ tests against a broad range of contaminants has recently been illustrated by studies using antifungal bacteria in bread bioprotection. Amongst the three *Lactobacillus* strains tested in vitro and in situ, the best performing strain in in situ environmental challenge tests was the least active in vitro [83]. In another study, the antifungal strain *L. amylovorus* DSM19280 was tested in comparison to a non-antifungal *L. amylovorus* strain to protect wheat and quinoa sourdough breads and clearly showed that the production of antifungal compounds varied according to the flour type [80].

### 3.2. Antifungal Microorganisms

A large number of microorganisms have been tested for their antifungal activity against food spoilers. This part mainly focuses on the microorganisms successfully tested as bioprotective tools in food products.

Lactic acid bacteria (LAB) are by far the main microorganisms tested for application in dairy and bakery productions, the two main food sectors studied for biopreservation against fungi. These microorganisms have also been tested in brewing (malting process), and in the manufacture of fermented vegetables or to protect grains, seeds, or fruits. For fruit bioprotection, the main candidates tested are bacteria, especially from the *Bacillus* group, and various yeast species. For fermented meats, yeast (*D. hansenii*) and *Penicillium* species have been tested against fungal spoilers. Many of these antifungal species have the characteristics of ‘microbial weeds’—i.e., species able to dominate communities that develop in open microbial habitats—a concept recently introduced for microorganisms by Cray et al. 2013 [96]. Table 1 lists the published literature on this subject over the past three years.

**Table 1.** Active bioprotective cultures against fungal contaminants of postharvest fruits and processed and raw foods.

Food Field	Group	Antifungal Microorganisms (Active In Situ/Tested Strains)	In Situ Test	Source of Microorganism	Application Method	Activity Spectrum (Inhibited/Tested)	Reference
bakery	LAB	<i>Lactobacillus brevis</i> ITM18	yeast-leavened bread	sourdough	CFS as ingredient	<i>Aspergillus niger</i>	[97]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	Korean draft rice wine	kimchi	CFS	<i>Aspergillus fumigatus</i> and <i>Pichia kudriavzevii</i>	[98]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM19280 (1/1)	sourdough quinoa bread	cereal isolate	cells in sourdough	environmental molds	[80]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> CRL778	wheat bread	homemade wheat dough	SL778: fermentate as ingredient	environmental molds	[99]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> UFG 121 (only 1 in situ from best 2/88 in vitro)	oat-based product	food	cells in sourdough	<i>Fusarium culmorum</i> (only 1 tested in situ), <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , and <i>Aspergillus flavus</i> (5/7 in vitro)	[69]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM19280 (1/3)	sourdough wheat bread	cereal isolate	cells as starter	<i>Fusarium culmorum</i>	[83]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus reuteri</i> R29, <i>Lactobacillus brevis</i> R2, <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM19280	sourdough of quinoa and rice bread	human, pork, and cereal	cells in sourdough	environmental molds	[90]
bakery	LAB	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> CECT 4005, <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 749 (active in situ 2/6), <i>Lactobacillus johnsonii</i> CECT 289, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 288, <i>Lactobacillus ruminis</i> CECT 1324, and <i>Bifidobacterium bifidum</i> CECT 870T (6 active in vitro/16)	loaf bread	not detailed	cells in sourdough	<i>Aspergillus parasiticus</i> (only one tested in situ) and <i>Penicillium expansum</i>	[100]
bakery	LAB & PAB	<i>Leuconostoc citreum</i> (5 strains), <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus spicheri</i> O15, <i>Lactobacillus reuteri</i> 5529, <i>Lactobacillus brevis</i> Lu35, <i>Propionibacterium acidipropionici</i> and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> LSaci68 (by surface-spraying 12 LAB/69)	pound cake and milk bread roll	milk, milk roll sourdough, and others not detailed	whole culture as sourdough ingredient for milk bread roll and sprayed	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> and <i>Wallemia sebi</i> on pound cake; and <i>Eurotium repens</i> , <i>Aspergillus niger</i> , and <i>Penicillium corylophilum</i> on milk bread roll	[63]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1Np, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> K.C8.3.1I, and <i>Lactobacillus paracasei</i> K.C8.3.1Hc1 (3/11)	yogurt	cow and goat milk	cells as adjunct culture	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , and <i>Yarrowia lipolytica</i> (6/6)	[78]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus casei</i> AST18 (1/1)	yogurt	Chinese dairy products	cells as adjunct culture	<i>Penicillium</i> sp. (1/1)	[88]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus paracasei</i> DCS302	yogurt	not detailed	cells as adjunct culture	<i>Penicillium</i> sp. nov. DCS 1541, <i>Penicillium solitum</i> (2/8)	[101]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1Np (1/2)	yogurt	cow milk	cells as adjunct culture	<i>Yarrowia lipolytica</i> (1/1)	[87]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus reuteri</i> INIA P57	semi-hard ewe milk cheese	pig feces (isolated by Langa 2003)	cells as adjunct culture supplemented with glycerol	Not evaluated	[102]
dairy	LAB	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 19280 (1/1)	cheddar cheese	cereal environment	cells as adjunct culture	<i>Penicillium expansum</i> (1/1) and environmental molds	[89]
dairy	LAB	12 strains of <i>Lactobacillus plantarum</i> (12/897)	cottage cheese	fresh herbs, fruits, and vegetables	cells as added to the finished product	<i>Penicillium commune</i>	[103]
dairy	LAB	<i>L. rhamnosus</i> A238, <i>L. rhamnosus</i> A119 (2/5) The association of <i>L. rhamnosus</i> A238 with <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A026, and <i>L. rhamnosus</i> A119 with <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A026	cottage cheese	not detailed	cells added to the finished product	<i>Penicillium chrysogenum</i> (1/1)	[104]
malting	LAB	<i>Lactobacillus brevis</i> R2Δ (1/1)	barley malt extract fermentation	porcine isolate	cells as starter	Not evaluated	[105]



Table 1. Cont.

Food Field	Group	Antifungal Microorganisms (Active In Situ/Tested Strains)	In Situ Test	Source of Microorganism	Application Method	Activity Spectrum (Inhibited/Tested)	Reference
malting	LAB	<i>Lactobacillus brevis</i> R2Δ and <i>Lactobacillus plantarum</i> FST1.7 (2/2)	barley malt extract (wort) fermentation	porcine and barley isolate	cells as starter	<i>Fusarium culmorum</i>	[106]
malting	LAB	<i>Lactobacillus brevis</i> R2Δ (1/1)	barley in malting process	porcine isolate	cells as starters and CFS	<i>Fusarium culmorum</i> and <i>Fusarium graminearum</i>	[107]
malting	LAB	<i>Lactobacillus reuteri</i> R29 and <i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM19280	malting process (steeping and germination)	human and cereal isolates	CFS (wort as growth media) as the steeping liquor	<i>Fusarium culmorum</i>	[94]
fermented vegetables	LAB	<i>Pediococcus</i> spp. A19 (tested in situ) <i>Pediococcus</i> spp. A21, <i>Lactobacillus plantarum</i> B4496, <i>Lactobacillus brevis</i> 207, and <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> BB12 (5/13)	cocoa	fermenting cocoa	cells as starter	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>Aspergillus niger</i> , and <i>Aspergillus ochraceus</i>	[108]
fermented vegetables	LAB	<i>Lactobacillus fermentum</i> YML014	tomato puree	<i>gari</i> , fermented cassava (starchy root)	cells	<i>Penicillium expansum</i> (only one tested in situ), <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida albicans</i> , and <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> (low inhibition of yeasts)	[109]
fermented vegetables	LAB	<i>Lactobacillus helveticus</i> KLDS 1.8701 (1/4 also <i>L. helveticus</i> )	fermented soybean milk	dairy products	cells as adjunct culture	<i>Penicillium</i> sp. (1/1)	[81]
grain/seed	LAB	<i>Lactococcus</i> sp. BSN307	wheat grains	rotten jackfruit, guava, and animals fecal samples	submerged in purified volatile organic compound 2,4-di-tert-butylphenol	<i>A. niger</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> , and <i>F. oxysporum</i>	[110]
grain/seed	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> LR/14	wheat seeds ( <i>Triticum aestivum</i> var. HD 2824)	not detailed	AMP LR14 solution	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Mucor racemosus</i> , and <i>Penicillium chrysogenum</i> .	[111]
grain/seed	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> YML007 (1/1400)	soybean	kimchi	CFS	<i>Aspergillus niger</i>	[112]
grain/seed	LAB & Fungi	kefir grains contain a symbiotic consortium of LAB and yeasts ( <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. kefir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Saccharomyces</i> and <i>Acetobacter</i> )	arepa (corn cakes)	kefir grains	CFS	<i>Aspergillus flavus</i>	[113]
fruit	LAB & other bacteria	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> LABW1, LABW3, LABW4, <i>Burkholderia cenocepacia</i> VBC7 and <i>Pseudomonas poae</i> VBK1	jackfruit	rotten jackfruit	cells sprayed over the fruit	<i>Rhizopus stolonifer</i>	[114]
fruit	LAB	<i>Lactobacillus paracasei</i> LOCK0921 (1 tested in situ) (1/9 in vitro/60))	wild cherries	plant and human	CFS cultivated with xylitol or galactosyl-xylitol directly on wild cherries	<i>Alternaria brassicicola</i> (1 tested in situ), <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , and <i>Mucor hiemalis</i> (6/8)	[115]
fruit	LAB	Lactic acid bacteria strains LCM5, LAB 58, LAB 13, and LAB 43 (4/6)	apple	plants, fermented wheat bran, pickles, and sauerkraut	cells sprayed over the fruit (wounded and non-wounded)	<i>Penicillium expansum</i>	[116]
fruit/dairy	LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> TK9	citrus, apples and yogurt	Chinese naturally fermented congee	cells	<i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , and <i>Rhizopus nigricans</i> (6/7)	[117]
grain/seed	Other bacteria	<i>Acetobacter nigricans</i> AZT 54 (0/1)	maize, sorghum and wheat grains	paddy field soil samples	cereals submerged in suspension	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium poae</i> , and <i>Fusarium equiseti</i> (4/10 in vitro)	[82]

Table 1. Cont.

Food Field	Group	Antifungal Microorganisms (Active In Situ/Tested Strains)	In Situ Test	Source of Microorganism	Application Method	Activity Spectrum (Inhibited/Tested)	Reference
grain/seed	Other bacteria	<i>Bacillus cereus</i>	peanut kernels	entomopathogenic nematode	cells and purified cyclo(4-hydroxy-L-Pro-L-Trp)	<i>Aspergillus flavus</i>	[118]
fruit	Other bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> AFB22 [1/(50/200 in vitro)]	pomegranate	pomegranate leaves and fruits	cells and CFS by spraying on wounded fruits	<i>P. varsoniana</i> (only in situ), <i>A. flavus</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>B. humicola</i> , <i>F. graminearum</i> , and <i>R. stolonifer</i> (in vitro)	[119]
fruit	Other bacteria	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ZJ01 and ZJ02	jujube fruit	phyllosphere of Chinese jujube	whole culture in created wounds-prevention treatment	<i>Phoma destructiva</i> (2 strains), <i>Alternaria alterna</i> (2 strains), and <i>Fusicoccum</i> spp. (5/5)	[120]
fruit	Other bacteria	<i>Bacillus subtilis</i> V26	tomato fruit	rhizosphere of almond trees	whole culture, endospores, and CFS in created wounds	<i>Botrytis cinerea</i>	[84]
fruit	Other bacteria	<i>Paenibacillus polymyxa</i> APEC136 and <i>Bacillus subtilis</i> APEC170	apple	soil from several apple orchards	cells over created wounds	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Colletotrichum acutatum</i> , and <i>Botryosphaeria dothidea</i>	[121]
fruit	Other bacteria	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> BUZ-14	apple, orange, grape, and cherries	surface of peach fruit from an orchard	cells, endospores and CFS	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilinia fructicola</i> , <i>Monilinia laxa</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , and <i>Penicillium italicum</i>	[122]
fruit	Other bacteria	<i>Cryptococcus laurentii</i>	peach fruit	surfaces of apple fruits	cells in created wounds	<i>Penicillium expansum</i>	[123]
fruit	Other bacteria	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> CPA-8	cherries	nectarine surface	wounded fruits packaged with in situ produced volatile organic compounds	<i>Monilia fructicola</i> (1/3)	[124]
fruit	Other bacteria	<i>Paenibacillus pasadenensis</i> R16	grape berries	leaf of grapevine plant	wounded fruit submerged in cell suspension	<i>Botrytis cinerea</i>	[125]
fruit	Yeast	<i>Cryptococcus laurentii</i> 2.3803	strawberries	not detailed	cells sprayed over fruits prior to harvest	<i>Botrytis cinerea</i>	[126]
fruit	Yeast	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	grape berries	strawberries surface	cells in wounds and fruit submerged in salicylic acid or sodium bicarbonate	<i>Botrytis cinerea</i>	[127]
fruit	Yeast	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> BS91, <i>Metschnikowia pulcherrima</i> MPR3, <i>Aureobasidium pullulans</i> PI1, and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BC A62	grape berries	fermented olive brine and pomegranate	cells in created wounds	<i>Botrytis cinerea</i>	[71]
fruit	Yeast	<i>Aureobasidium pullulans</i> (25 strains), <i>Cryptococcus magnus</i> (2 strains), <i>Candida sake</i> 2AM3 [(28/33 in situ) (33/55 in vitro)]	grape berries	surface of grape berries	wounded fruits submerged in cells suspension	<i>Aspergillus tubingensis</i>	[70]
fruit	Yeast	<i>Candida intermedia</i> and <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	avocado	fruits, leaves, and the soil of the avocado orchards	cells in created wounds	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> and <i>Colletotrichum acutatum</i>	[128]
fruit	Yeast	<i>Hanseniaspora uvarum</i> Y3	orange	surfaces of grapes in vineyard	cells in created wounds	<i>Penicillium digitatum</i>	[85]
fruit	Yeast	<i>Pichia membranaefaciens</i>	citrus fruits <i>Citrus sinensis</i>	not detailed	cells in created wounds	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	[129]
fruit	Yeast	<i>Rhodotorula minuta</i> ACBL-23, <i>Candida azyma</i> ACBL-44, <i>S. cerevisiae</i> ACBL-52, <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ACBL-68, and <i>Aureobasidium pullulans</i> ACBL-77	'Pera' orange fruits	citrus leaves, flowers, fruits, and citrus-growing soils	cells in created wounds	<i>Geotrichum citri-aurantii</i>	[130]

Table 1. Cont.

Food Field	Group	Antifungal Microorganisms (Active In Situ/Tested Strains)	In Situ Test	Source of Microorganism	Application Method	Activity Spectrum (Inhibited/Tested)	Reference
fruit	Yeast	<i>Pichia fermentans</i> (2 strains), <i>Wickerhamomyces anomalus</i> , <i>Kazachstania exigua</i> , and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	lemons	surface of leaves and fruits of different citrus and wash-water from lemon shells	wounded fruits submerged cells suspension	<i>Penicillium digitatum</i> and <i>Penicillium italicum</i>	[131]
fruit	Yeast	<i>Debaryomyces hansenii</i> K12a, <i>D. hansenii</i> M11a, and <i>Wickerhamomyces anomalus</i> BS91	peach and plum fruits	blue-veined Rokpol cheese and fermented olive brine	cells in created wounds	<i>Monilinia fructigena</i> and <i>Monilinia fructicola</i>	[132]
fruit	Yeast	<i>Candida tropicalis</i> YZ27	banana	from bitter gourd	cells in created wounds	<i>Colletotrichum musae</i>	[133]
fruit	Yeast	<i>Yarrowia lipolytica</i>	grape berries	surface of grapes	cells in created wounds	<i>Talaromyces rugulosus</i>	[134]
meat	Yeast	<i>Debaromyces hansenii</i> FHSCC 253H	dry-cured ham slices	dry-cured meat products	cells over slices ( $a_w$ controlled)	<i>Penicillium nordicum</i>	[135]
meat	Yeast	<i>Debaromyces hansenii</i> 253H and 226G G	dry-fermented sausage	dry-cured meat products	cells over slices after fermentation	<i>Penicillium verrucosum</i>	[136]
meat	Molds	<i>Penicillium nalgoviense</i>	dry-fermented sausages	TEXEL PN1 from Danisco (Niebüll, Germany)	immersion of sausages in cells suspension	<i>Penicillium verrucosum</i>	[137]
meat	Molds	<i>Penicillium chrysogenum</i> CECT 20922	dry-cured ham slices	not detailed	cells	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> , and <i>C. oxysporum</i>	[138]
fruit	Molds	<i>Clonostachys rosea</i>	tomato fruit	not detailed	cells sprayed over the fruit	<i>Botrytis cinerea</i>	[139]



### 3.2.1. Lactic Acid Bacteria

LAB encompasses a large and heterogeneous group of Gram-positive, low-GC, acid-tolerant bacteria, which produce lactic acid as the major metabolic end product of carbohydrate fermentation. LAB belong to the *Lactobacillales* order, which include 6 families, 36 genera, and more than 200 species. They are found in various biotopes such as environment, plants, human, and animal microbiota. They are largely used in the manufacture of a variety of fermented foods, where they contribute to improve shelf-life, organoleptic properties, and nutritional value. The main LAB in fermented foods correspond to species belonging to the *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, and *Weissella* genera [28].

*Lactobacillus*, *Pediococcus*, and *Leuconostoc* species have been the most studied for their antifungal activity [24,25,140] and they have also been the most evaluated in situ in the past years (Table 1). Among them, *L. plantarum* is the most studied species representing about one third of reports on LAB and many different strains have been tested as antifungals in foods since 2013, (Table 1). *L. plantarum* strains and their metabolites have been tested in a wide range of foods where they inhibited different fungal species such as *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula*, and *Pichia* spp. *L. plantarum* is a ubiquitous species [141] and is found in a wide range of ecological niches, such as milk [75], water for malt production [142], malted barley [143], or the aerial surfaces of plants or vegetables [33]. *L. plantarum* is also widely present in fermented foods, including different cheese varieties [144], and thus has the potential to be tested as an antifungal culture in a variety of applications, as already shown for the strain *L. plantarum* TK9 active against *Penicillium* in citrus, apple, and yogurt spoilage [117]. In another recent study, *L. plantarum* UFG 121 retarded the growth of *F. culmorum* in an oat-based beverage fermented with this strain [69]. There is a growing interest in looking for new antifungal strains in diverse types of fermented foods. With this in mind, *L. plantarum* strains with antifungal activities have been isolated from a variety of fermented foods including kimchi [98,112], koumiss [144], tempeh [145], and a number of other traditional fermented vegetables [95,146].

Other species of lactobacilli have also recently been identified as potential antifungal cultures, such as *L. rossiae* [147], *L. amylovorus* [148], *L. harbinensis* [78], *L. brevis*, and *L. spicheri* [63]. Many other *Lactobacillus* species—including *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, and *L. sakei*—added as adjunct cultures in fermented foods, have been shown to be able to extend the shelf life of various products: yogurt [87–89,142], fermented drinks [98] and bakery products [83,97].

*Leuconostoc* have also shown antifungal activities. *Leuconostoc* are used as starters in some fermented dairy products [149] but are also natural contaminants in various food products such as cheese and modified atmosphere packaged meat and seafood, where they can be responsible for spoilage [150]. In bakery products, *Leuconostoc* spp. exhibited good antifungal potential against fungal spoilers, with the highest proportion of active isolates against the 5 tested fungal targets, and 5 strains of *L. citreum* among the 10 most active LAB strains selected [63].

Concerning pediococci, several studies showed in vitro activity of *Pediococcus pentosaceus* strains against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* [151]. For example, 5 strains including 2 pediococci and 3 lactobacilli were selected from in vitro assessment of 13 strains based on their antifungal properties towards three ochratoxin A-producing *Aspergillus* species. One *Pediococcus* spp. strain was selected to be used as starter in cocoa fermentation inoculated with *A. carbonarius*, where it reduced fungal populations and toxin production [108].

Candidate antifungal bacteria to be tested in a given food product are often chosen among strains isolated from a similar biotope. However, successful results have also been obtained with strains tested in applications unrelated to their original biotope. For example, *L. amylovorus* DSM19280, a species commonly isolated from cereals or whole barley sourdough, inhibited the growth of *F. culmorum* that grows during the malting process and deoxynivalenol production, a mycotoxin produced by this common plant pathogen [152]. This LAB species also performed well in a bakery environmental challenge test [83]. Interestingly, the same *L. amylovorus* strain, added as an adjunct culture along with the usual lactic starters in Cheddar cheese manufacture, delayed *Penicillium expansum* growth



by four days during ripening [89]. Similarly, a *L. reuteri* strain R29 isolated from human microbiota, was successfully used during the malting process to inhibit *F. culmorum* [94], and to extend the shelf life in rice and quinoa breads by incorporating *L. reuteri* in the sourdough [90]. These examples suggest that candidate strains selected for their antifungal properties from screening procedures could also be chosen without restriction of biotopes.

### 3.2.2. Propionibacteria

Dairy propionibacteria (PAB) are also considered as antifungal candidates. The *Propionibacterium* genus, belonging to the *Actinobacteria* class, is a Gram-positive, high-GC content bacteria divided into 'cutaneous' and 'classical' (also referred to as 'dairy') propionibacteria based on their main isolation biotopes [153]. PAB and related species taxonomy has recently been reconsidered, with in particular 'dairy' PAB separated in the *Propionibacterium* genus consisting of *P. freudenreichii*, the main species used in cheese-making, and three other species, and a novel genus—*Acidipropionibacterium*—which encompasses the former species *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. jensenii*, and three other species [141].

In a large in vitro screening study on 197 dairy PAB strains, 13 strains—including 9 *P. jensenii*, 2 *P. acidipropionici*, and 2 *P. thoenii*—showed high antifungal activity against various yeast and mold species. In another study, in vitro screening revealed that almost all PAB strains were active in vitro against five mold species. Only two strains of *P. acidipropionici* and *P. freudenreichii* slightly delayed *A. niger* and *P. corylophilum* growth in milk bread rolls sprayed with antifungal cultures, whereas no inhibitory effect was observed in pound cake, probably because of the near neutral pH of this bakery product [63].

### 3.2.3. Bacillus and Other Bacteria

Bacilli are Gram-positive, aerobic endospore-forming, and rod-shaped bacteria. They are found in diverse environments and are known to produce a variety of secondary metabolites including antimicrobial compounds. Their antimicrobial activities have been applied for the development of medical treatments but also more recently, as biocontrol agents of pre-harvest crop diseases and postharvest fruit and vegetable spoilage. In particular, *Bacillus subtilis* strains produce a wide variety of antimicrobial compounds, which include peptides and non-peptides [154].

Some recent bioprotection assays performed in situ using *Bacillus* species cells, endospores, CFS, or purified peptides on postharvest fruits illustrate the potential activities that they can exhibit (Table 1). *Bacillus* sp. strains present a large activity spectrum against pathogenic fruit molds from the *Aspergillus*, *Alternaria*, *Beltraniella*, *Botryosphaeria*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Fusicoccum*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Rhizoctonia*, and *Rhizopus* genera. Bioprotective activities were demonstrated in situ in a variety of fruits including tomatoes, apples, grapes, and pomegranates (Table 1). For example, *B. subtilis* AFB22 cells and CFS, selected after screening 200 antifungal *Bacillus* spp. isolates, prevented pomegranates from rotting when challenged with spores of *Phomopsis varsoniana* [119]. In another study, whole cultures of two *B. amyloliquefaciens* strains sprayed on Chinese jujube fruit inoculated with spores of three key pathogens of this fruit, *Phoma destructiva*, *Alternaria alternata* and *Fusicoccum* spp., reduced the disease incidence and induced different kinds of hyphal alterations on the fungal targets [120]. In vitro test using CFS from *B. amyloliquefaciens* also inhibited the growth of *B. cinerea*, a postharvest phytopathogen [155] and *Botryosphaeria dothidea* involved in peach gummosis [156].

Some *Bacillus cereus sensu lato* species have been recently proposed as bioprotective cultures and correspond to species commonly found in soil and foods but they may also be potential spoilers in dairy products and cereals and in some cases, harmful to humans. A *B. cereus sensu lato* strain isolated from an entomopathogenic nematode and its metabolites were active against an *Aspergillus* sp. in peanuts [118].

### 3.2.4. Yeasts

If bacteria are well known for producing a large diversity of antimicrobial compounds, in recent decades, there has been a significant increase in interest regarding yeast antimicrobial properties.



Yeasts are single cell microorganisms classified as members of the fungi kingdom. They are ubiquitous in the environment, are able to grow in a large variety of biotopes such as cereals, vegetables, fruits, meat, milk, as well as processed food products. Yeasts have been involved in food preservation for millennia, through the fermentation process of wine, beer, cereal-doughs, and certain cheese varieties, [157] where they contribute to organoleptic properties of fermented foods. Their antimicrobial activity is attributed to their ability to compete for nutrients, to acidify the medium, to resist stressful conditions (ethanol), but also to produce antimicrobial molecules named ‘mycocins’, also referred to as killer proteins affecting fungal growth [158]. Moreover, their capacity to colonize fruit, seeds, berries, leaves, and to compete for space and nutrients with other microorganisms, make them good candidates as biocontrol agents to limit postharvest decay for example [159]. Yeast antimicrobial activities and the numerous applications of mycocin-producing yeasts for preventing fungal spoilage in various foods and beverages such as wine, olives, beer, sake, miso, soy sauce, and salted vegetables have been reviewed by different authors (e.g. [160]). Nevertheless, these authors underlined that yeast strains must be used with caution since they could have a negative impact on the quality of end-products.

The yeasts *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida fructus*, *Issatchenkia orientalis*, and *Candida quercitrusa* are frequently found associated with fruits or plant surfaces and showed antagonistic activities against fungal pathogens [161]. In a study on 11 yeast strains isolated from avocados, one *Wickerhamomyces anomalus* strain was able to inhibit *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. acutatum* responsible for avocado anthracnose [128]. In the case of citrus fruit anthracnose, *Pichia membranifaciens*—alone or in combination with chitosan—inhibited *C. gloeosporioides* mycelium growth and spore germination [129]. *Hanseniaspora uvarum* isolated from grape surfaces has been reported as a natural preservative acting against the disintegration of gray post-harvest grapes caused by *B. cinerea* [127]. The same species was active against the green mold *P. digitatum* that spoils citrus fruits [85].

Antifungal yeast applications have also been suggested in the past three years for the production of dry-cured ham [136] and sausages [135] to control toxigenic penicillia populations that lead to spoilage inducing visual (black spots) and flavor defects, and above all that can produce ochratoxin A (OTA). In these studies, two *D. hansenii* strains revealed antifungal activity against *Penicillium verrucosum* and *P. nordicum* and were able to decrease OTA production. Paradoxically, *D. hansenii* can be involved in food spoilage as shown for some dairy products such as fresh cheese or cream but, at the same time, is food grade and used as a starter for specific dairy products. It is naturally found in meat products and on fruit surfaces and is used as a ripening culture to manufacture some surface ripened cheeses.

Foods are not the sole source of potential bioprotective yeasts, and yeasts with an antifungal potential have also been isolated from marine environments. This ecosystem confers unique properties to yeast matching with their potential use as bioprotective agents for postharvest fruits and vegetables. Antimicrobial activity screening of deep-sea fungi from the South China sea showed that 56% of fungal isolates exhibited antimicrobial activity against at least one pathogenic bacterium or fungus. Out of these antimicrobial fungi, the genera *Arthrimum*, *Aspergillus*, and *Penicillium* exhibited antibacterial and antifungal activities, while genera *Acremonium*, *Cladosporium*, *Geomyces*, and *Phaeosphaeriopsis* displayed only antifungal activity [162]. The marine yeast, *Rhodospiridium paludigenum*, isolated from the East China Sea, effectively inhibited *P. expansum* on pear fruit, and *Alternaria alternata* on jujube fruits [163]. A number of bioactive metabolites produced by deep-sea fungi have been recently reviewed, thus more than 180 bioactive secondary metabolites derived from deep-sea fungi have been documented in the literature, including compounds with antifungal activity [66].

### 3.2.5. Filamentous Fungi

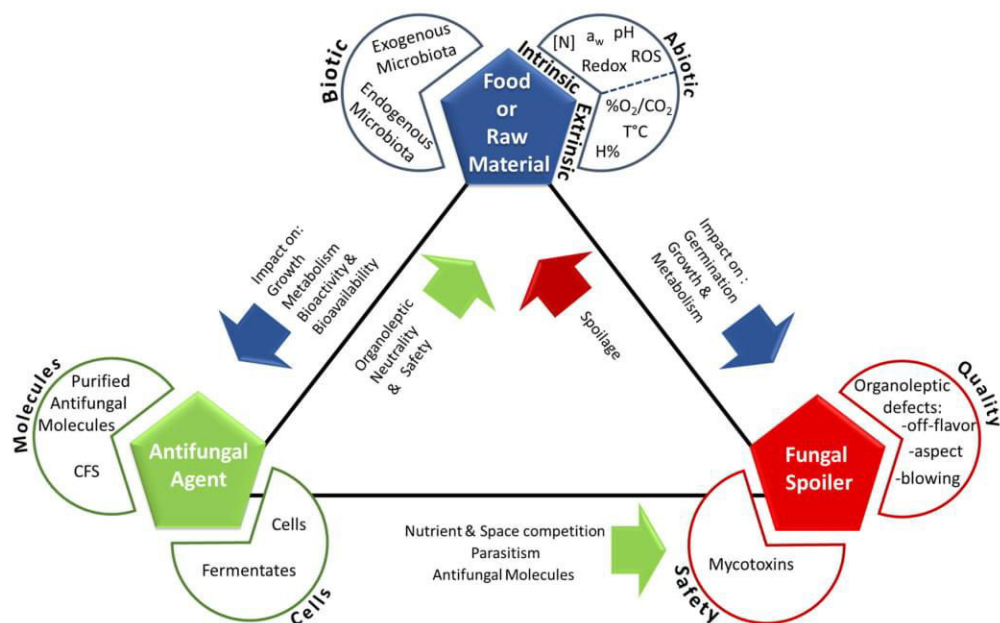
As previously stated, not all filamentous fungi are responsible for food spoilage and postharvest crop disease. Some of them contribute to the flavor and typical visual characteristics of some fermented foods—such as surface-ripened cheese [164], fermented sausage [50], and ham [138]—and can also be used as antifungal agents, in particular to protect the surface of dry-ripened products where the low  $a_w$  prevent the use of antifungal LAB. Some filamentous fungi such as the *Penicillium* species

*P. nalgiovensis* (non-toxigenic) and *P. chrysogenum* are both commercial cultures commonly used in the meat industry [165]. Both species have recently been tested against *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxin producers. *P. chrysogenum* strains isolated from dry-cured ham inhibited two common spoilers *A. flavus* and *P. restrictum* in vitro [166,167] by the production of an antifungal protein, whereas *P. nalgiovensis*, from the commercial culture TEXEL PN1, limits the growth and OTA production of *P. verrucosum* [137]. In another study of the bioprotective role of *P. chrysogenum*, it was suggested to combine the use of *P. chrysogenum* CECT 20922 as bioprotective culture and the reduction of  $a_w$  throughout the ripening process to avoid black spot formation in dry-cured ham [138].

As will be detailed below, fungi produce antimicrobial peptides (AMP) that are a valuable strategy to avoid fungal spoilage and mycotoxin production.

#### 4. Action Mechanisms of Antifungal Microorganisms

Fungal spoilage control using antifungal microorganisms is a complex task which success depends on network of the interactions between three main actors: the food itself (comprising its natural microbiota), the fungal spoiler(s), and the antifungal microorganism(s) (Figure 1). Depending on food type and antifungal microorganism, different action mechanisms—combined or not—can be responsible for spoilage fungi inhibition.



**Figure 1.** Diagram representing possible interactions occurring between food or raw material, antifungal agents, and fungal spoilers in a biopreservation context (CFS: culture-free supernatant, ROS: Reactive Oxygen Species, [N]: nutrient content, H%: hygrometry).

Antifungal molecules can have (i) a target-specific mode of action, such as natamycin which blocks fungal growth via a specific interaction with ergosterol in the membrane, or (ii) a non-specific mode of action. In the latter case, molecules can generate an acid (pH) and/or an osmotic stress, which can draw water from the cytoplasm, or correspond to chaotropic and hydrophobic stressors that can weaken or inhibit non-covalent interactions between macromolecular systems by reducing water [168]. Chaotropicity, like water activity and pH, could be a key parameter in preservation.

##### 4.1. Action Mechanisms of Antifungal Lactic Acid Bacteria and Propionibacteria in Fermented Foods

Antibiosis (e.g., production of antifungal molecules) and pH decrease are the main factors contributing to LAB and PAB antifungal activity in foods. Indeed, LAB and PAB produce lactic



and propionic acids as main fermentation end-products, respectively. Moreover, most antifungal LAB, being facultative or strictly heterofermentative lactobacilli and pediococci, are also able to produce acetate from pentose (facultative or strictly heterofermentative LAB) and ethanol, or acetate (in the absence or presence of O<sub>2</sub> or other electron acceptors, respectively) and CO<sub>2</sub> from hexose (strictly heterofermentative LAB). On the other hand, propionibacteria also produce acetic and succinic acids as well as CO<sub>2</sub> through the transcarboxylase cycle, in molar ratios depending on the substrate, environmental conditions, and strain [169]. These organic acids, synthesized at important levels in food (e.g., in g/L or g/kg order), possess antifungal activities, especially acetate and propionate, whose minimum inhibitory concentrations (MICs) are 30 to 100 times inferior to that of lactate depending on the fungal target. Moreover, acetate MIC is reduced in the presence of lactate, indicating that they can act in synergy. Nevertheless, the production of the aforementioned acids is not sufficient to explain antifungal activity of LAB and PAB [170].

For antifungal LAB, many molecules, produced at low quantities (mg/L or mg/kg) and below their individual MIC, are also likely to act in synergy with lactic and acetic acids. The nature and quantity of these compounds is species- and strain-dependent and so far, a very large array of molecules has been described in the literature [24]. They include other organic acids (hydrocinnamic acid, DL- $\beta$ -phenyllactic acid, DL- $\beta$ -hydroxyphenyllactic acid, polyporic acid, azelaic acid, 2-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, vanillic acid, caffeic acid, succinic acid, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid), fatty acids (decanoic acid, 3-hydroxydecanoic acid, (S)-(-)-2-hydroxyisocaproic acid, coriolic acid, ricinoleic acid), cyclopeptides [cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Tyr-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro), cyclo(Phe-Pro), cyclo(Phe-OH-Pro), cyclo(L-Phe-L-Pro), cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), cyclo(L-His-L-Pro), and cyclo(L-Leu-L-Leu)], reuterin, hydrogen peroxide, and volatile compounds such as diacetyl [101,171–178]. For example, Miezkin et al. (2017) [175] attributed the antifungal effect of *L. harbinensis* K.V9.3.1.Np to the synergistic action of acetic, lactic, 2-pyrrolidone-5-carboxylic, (S)-(-)-2-hydroxyisocaproic, and 2-hydroxybenzoic acids, while Aunsbjerg et al. (2015) [101] showed that increased production of diacetyl and to a smaller extent, 2,3-pentadione, acetic acid, and butanoic acid were involved in the antifungal activity of *L. paracasei* DGCC 2132. In another study, Le Lay et al. (2016) [179] showed that lactic, acetic, and propionic acids, ethanol and hydrogen peroxide, as well as other compounds present at low levels such as DL- $\beta$ -phenyllactic, DL- $\beta$ -hydroxyphenyllactic, azelaic, and (S)-(-)-2-hydroxyisocaproic acids were responsible for the antifungal activity of lactobacilli and propionibacteria CFS active against spoilage molds in bakery products. A fraction extracted from a culture of *Lactococcus* sp. BSN307, that contained 2,4-di-tert-butylphenol, was effective for wheat grains preservation from the attack by *A. niger* and different *Fusarium* sp. [110]

For propionibacteria, the four dairy species (*P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, and *P. jensenii*) also produce DL- $\beta$ -phenyllactic acid [77]. Propionicin PLG-1, a 9 328 Da bacteriocin produced by *P. thoenii* P127, is active against various bacteria but also yeast and mold species [180]. Several antimicrobial organic acids acting in synergy have been identified in a protective mixed culture of *P. jensenii* SM11 and *L. paracasei* strain including 2-pyrrolidone-5-carboxylic, DL- $\beta$ -phenyllactic, and DL- $\beta$ -hydroxyphenyllactic acids [181]

The action mode of organic acids is quite well understood [182]. Organic acids, under their undissociated form, can diffuse through the microorganism membrane and dissociates in the cell, thereby causing a decrease in intracellular pH. The accumulation of toxic ions combined with membrane disruption, inhibition of essential metabolic reactions, and/or stress in intracellular pH homeostasis may finally lead to cell death. In this so-called ‘weak acid theory’, the acid pKa value and the pH of the medium are therefore important factors influencing antifungal activity of organic acids. Indeed, the higher the pKa and the lower the medium pH, the more the acid will be in its undissociated form and the higher will be its effect on intracellular pH and antifungal activity. However, not all organic acids act this way. For example, sorbic acid was shown to inhibit plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase proton pump but not to decrease intracellular pH in *S. cerevisiae* [183]. It is also worth mentioning that



phenolic compounds (4-hydroxy benzoic acid, vanillic acid); acetic, propanoic, and butanoic acids; acetoin; ethanol; and other volatile compounds can act as chaotrophic stressors [168,184,185].

It should be highlighted that the multiplicity and variety of antifungal molecules identified so far in LAB or PAB render difficult their exhaustive identification and quantification. Therefore, in future studies, it would be desirable to conduct large targeted- and untargeted assays for antifungal molecule identification and quantification, by combining different extraction and analysis methods, such as LC-MS/MS or GC-MS. In this context, Brosnan et al. (2012, 2014) [186–188] developed two methods to extract and simultaneously detect and quantify a large variety of antifungal compounds. The method was further slightly modified and applied by Le Lay et al. (2016) [179]. Future work should also include the investigation of individual and combined effects of mixtures of antifungal molecules identified so far. Chaotrophicity could also be taken into account to determine the mechanism of action of antifungal microorganisms, nevertheless further studies must be done to determine the chaotrophicity of the mixture of identified molecules produced at low concentration by antifungal microorganisms of interest in food. Concerning their action mode against different fungal targets, only few studies looked at the effects of antifungal molecules produced by bioprotective LAB on fungal physiology in the food context. Crowley et al., (2013)[189] investigated the response of *Aspergillus fumigatus* Af293 (at the transcriptomic and morphological levels) to antifungal molecules present in *L. plantarum* 16 CFS. These authors observed an altered transcription of a large variety of cellular functions involved in metabolism, transport, signaling, ergosterol biosynthesis, and cell stress, including that of *LaeA*, a global regulator of secondary metabolism. More recently, Mieszkin et al. (2017) [175] investigated the action mechanisms involved in the bioprotective effect of *L. harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Y. lipolytica* in fermented milk. The CFS obtained after milk fermentation by yogurt starters in co-culture with the bioprotective strain had a fungistatic rather than a fungicidal effect accompanied with a significant loss of cultivability in the studied yeast. It also led to membrane depolarization and intracellular pH decrease, as well as morphological changes including membrane collapsing and cell lysis.

#### 4.2. Action Mechanisms of Antifungal Yeasts and Molds in Fermented Foods

As mentioned in the previous sections, selected yeasts and molds can be used as antifungal agents in dry-fermented foods to inhibit the growth of undesirable fungi. Their abilities to compete for space and nutrients with spoilage fungi as well as to produce antifungal molecules such as antifungal proteins and volatile compounds explain their antifungal properties [26]. Núñez et al. (2015) [136] showed that *D. hansenii* isolates are active against spoilage molds from dry-cured ham produced 2-methyl-1-butanol and other volatiles as well as unidentified diffusible molecules which were active against *P. verrucosum*. *M. guilliermondi* LCF1353, in combination with added *L. plantarum* 1A7 and *W. anomalus* 1695 strains that were previously selected for their antifungal activity against *P. roqueforti* in wheat flour bread [92] produced ethyl acetate and a  $\beta$ -1,3-glucanase during dough fermentation, which were efficient in preventing fungal contamination of bread slices without negatively affecting bread sensorial properties [190]. As recently reviewed by Delgado et al. (2016a, 2016b) [26,191] molds can produce various peptides and proteins with antifungal properties, including basic, cysteine-rich antifungal proteins (AFPs) with a 5.5–10 kDa molecular weight. Their structure makes them highly stable to low pH, heat, and proteolysis which is compatible with their possible antifungal role in fermented foods such as cheeses and fermented meats. After binding the cell wall or being internalized by target fungi, AFPs can alter chitin synthesis leading to cell death, or increase intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, leading to cell permeabilization and apoptosis [26].

#### 4.3. Action Mechanisms of Antifungal Yeasts and *Bacillus* spp. for Control of Postharvest Diseases

Biopreservation agents used for controlling postharvest disease have complex action mechanisms including competition for nutrients (e.g., iron and carbon sources) and space [71,130,192], antibiosis (e.g., production of antifungal molecules such as peptides and lipopeptides and volatile



organic compounds) [24,101,193–195], mycoparasitism associated with lytic enzyme production (e.g., glucanases, chitinases, and proteases) [157,195] and induced host resistance [29].

For example, the group of cyclic lipopeptides (surfactins, fengycins, and iturins) produced by *B. subtilis* and other *Bacillus* sp. strains have been shown to protect host plants from a number of pathogens including fungi [154,193]. Cyclic lipopeptides possess surface properties that are believed to contribute to the ability of *B. subtilis* cells to spread and colonize surfaces, whereas the fengycin and iturin molecular families are strongly toxic for fungi [154,196]. New antifungal peptides are continuously characterized, as for example, a large peptide synthesized by *Bacillus subtilis* B25, which inhibits the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, a pathogen infecting bananas [197].

Volatile antifungal compounds that can act at a distance are produced by antifungal species, thus opening new possibilities to control food spoilage such as biofumigation, provided that the safety of this mode of application is ensured [198]. A variety of antifungal volatiles have been identified—including 2-phenylethanol, 2-methyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-propanol, 5-pentyl-2-furaldehyde, 2-nonanone, and 2-ethyl-1-hexanol [18], 2-Phenylethanol was identified for example as one of the antifungal volatiles produced by a strain of *P. expansum* R82 active against different species of postharvest fungal pathogens [199] and its mechanisms of action against *P. digitatum* and *P. italicum* investigated [200].

Many different mechanisms of action were identified in yeasts active against grape pathogens. The most important are the production of laminarinases, antifungal volatiles or growth-inhibiting metabolites, the inhibition of fungal spore germination, decrease of germinal tube length, and the competition for carbon sources and iron [201]. At least two of the mechanisms of action were present in the yeast isolates assayed, with many different ‘antifungal patterns’ found according to the isolates. In *Pichia anomala* strain WRL-076, used as a biocontrol agent to reduce aflatoxin contamination of tree nuts, 2-phenylethanol was identified as an antifungal volatile compound, which inhibited spore germination, growth, and aflatoxin production in *A. flavus* [202].

These aspects were recently reviewed in detail by Spadaro and Droby (2016) [18]. Di Francesco et al. (2016) [18] as well as Rahman (2017) [203]. Biofilm formation, quorum sensing, and oxidative stress were also underlined in these reviews as other important key factors in the action mode of these biocontrol agents. These reviews also pointed out the potential of omics techniques to study antagonist-pathogen-host interactions.

## 5. Implementation of Biopreservation Methods against Fungal Spoilage

### 5.1. Optimization and Application Modes

Once antifungal cultures have been selected and/or the molecules supporting the activity have been identified, the next questions that can be raised concern (i) the potential enhancement of their activity in terms of efficiency or action spectrum (i.e., the number of inhibited species/strains) and (ii) the antifungal product type and its application mode.

Concerning optimization of the antifungal activity, several methods have been developed to enhance the production of bioactive molecules or extend their action spectrum, and correspond to the use of microorganisms in co-cultures, addition of enhancing molecules as precursors to trigger their biosynthetic pathways, induction of stress conditions to cultures, or to associate microbial cultures with other active molecules. For example, mixed fungal cultures using *Phomopsis* sp. K38 and *Alternaria* sp. E33 [204] were shown to create a new cyclic tetrapeptide (cyclo-[L-leucyl-*trans*-4-hydroxy-L-prolyl-D-leucyl-*trans*-4-hydroxy-L-proline]), which was shown to be active against *Gaeumannomyces graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum*, and *Fusarium graminearum* in vitro. Co-cultures can also positively stimulate antifungal activity as observed with a kefir symbiotic consortium combining three bioprotective LAB species (*L. plantarum*, *L. kefir*, and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) that was able to extend shelf life of a maize food product called ‘arepa’ against *A. flavus* contamination [113]. The use of an association of antifungal strains each



exhibiting antifungal activity towards different fungal targets may be a way to enlarge the antifungal spectrum of action. Another means to enhance bioprotective activities is the addition of certain substrates in the medium or food product. Certain substrates can potentially inhibit antifungal microorganism development while others may enhance their activity. Glycerol is known to enhance the antifungal activity of LAB. For example, the use of immobilized cells of *L. reuteri* in a glycerol based medium enhanced reuterin production [102], a widely used preservative in foods. In the same way, Le Lay et al. [63] observed that the antifungal activity of *L. brevis* Lu35 and *L. reuteri* 5529 was increased on wheat based medium supplemented with 2.5% olive oil and 150 mM glycerol, respectively. Other examples correspond to the use of sorbitol [205] or xylitol or galactosyl-xylitol [115] with *Lactobacillus* strains to inhibit a wide spectrum of fungi in vitro, while no inhibition was observed if other media were used. Then, stress conditions such as temperature, pH, nutrient availability, and cell population density during culture of antifungal microorganism can trigger metabolic pathways that enable the bacterium to cope with the stressful environment [206] which leads to the production of diverse metabolites including antifungal molecules.

Finally, the association of bioprotective cultures with other molecules, such as chitosan, has been described and is currently used to protect postharvest crops by the coating technique. Chitosan protects fruits and vegetables from fungal decay, creates a barrier with the environment and delays ripening. A study by [129] tested the coating of citrus fruits with a chitosan mixture containing a *P. membranifaciens* culture to prevent *C. gloeosporioides* fungal infections which was more effective than using the yeast culture alone. Similarly, 2-hydroxybenzoic acid enhanced the biocontrol efficacy of the yeast *R. glutinis* against *P. expansum* and *A. alternata* in cherry fruit [207] Finally, the role of other ingredients in foods to help extend product shelf-life is also important. The use of spices combined with an antifungal LAB culture to efficiently prevent fungal spoilage of an Ethiopian spiced fermented cottage cheese was recently described [208].

Concerning the antifungal agent type, they correspond to the use of cells (as adjunct cultures), their fermentates, CFS, or partially or totally purified compounds, the best example being natamycin, a universal antifungal agent from *Streptomyces natalensis*. The type of antifungal agent combined with the targeted food matrix will then determine the application mode. Legislative aspects may also have to be taken into account. Application modes mainly correspond to the addition in the product as adjunct culture in fermented products or ingredient, spraying, dipping, or drenching. In bakery products, Le Lay et al. (2016) [63] used two different application modes for challenge tests. In milk bread rolls, a fermented product, cell cultures were added to the classical starters and showed that, for some strains, the antifungal activity was conserved despite the baking process. For pound cake, a non-fermented product, bioprotective action was performed through surface spraying. Also, *L. amylovorus* DSM19280 used as a starter in the preparation of gluten-free quinoa bread proved to extend the mold free shelf-life [80] The protection of post-harvest crops and cereals can be performed by dipping food in the active culture or cell suspension as shown by Pantelides et al. (2015) [70] with wounded grape berries and Perez et al. (2016) [131] with lemons, for biocontrol of *B. cinerea* and *P. italicum*, respectively. As for spraying, pulverization of lactic acid bacteria strain cell suspensions over wounded and non-wounded apples protected the fruits from *P. expansum* colonization [116].

## 5.2. Constraints

As previously stated, due to ever increasing societal demands for preservative-free foods, the use of antifungal cultures for biopreservation has triggered a strong interest in the scientific community. However, although numerous studies have been reported in the literature, only few commercial solutions are available to date (Table 2). This is due to several constraints that may impair the commercialization of candidate antifungal cultures.



**Table 2.** Examples of bioprotective cultures and fermentates used in processed food and postharvest fruits available in the market.

Product Name	Application Field	Properties	Composition	Manufacturer
Holdbac YM-B or YM-C	fermented food and white cheeses	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	DuPont Danisco
Holdbac YM-XPM	fermented dairy and mild acidic yogurt	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DuPont Danisco
Holdbac YM-XPB	all types of cheeses	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DuPont Danisco
FreshQ 1 and FreshQ 4	cottage cheese	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> and <i>Lactobacillus paracasei</i>	CHR Hansen
FreshQ 2	cottage cheese	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CHR Hansen
FreshQ 5	cottage cheese	protection against yeasts and molds	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CHR Hansen
Natamax	fruit juices, wine, surface of dry-ripened food, dairy, and bakery products	protection against yeasts and molds	Natamycin produced by <i>Streptomyces natalensis</i>	DuPont Danisco
MicroGard	sauces, salad dressings, prepared meals, cured meat, pastas, bakery and dairy products, hash brown potatoes	protection against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, yeasts, and molds	Fermentate ( <i>skim milk or dextrose</i> ) of <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	DuPont Danisco
Hi Shield P	bakery products, salad dressings, and general used in food industry	protection against molds, yeasts ( <i>Pichia anomala</i> ), and bacteria ( <i>Bacillus subtilis</i> ); increase sour taste; and reduce salt content (flavor improver and enhancer)	Fermentate (corn) of lactic acid bacteria and yeasts	HI-FOOD S.p.A.
Inhibit FOG, Inhibit 2800, Inhibit 1900CW, Inhibit 3600 and Inhibit 2100NF	bakery products, cheeses, meats, salad dressings, condiments, dips, spreads, and meats	protection against molds, yeasts, and Gram-negative bacteria	Fermentates (dextrose, wheat, wheat flour, whey, brown rice) of <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Mezzoni Foods
Biosafe 10LP	cherries, pome fruits, citrus, and potatoes	protection against <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Mucor piriformis</i> , <i>Fusarium sambucinum</i> , <i>Helminthosporium solani</i> , and <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Nu Farm Inc. USA
Aspire	citrus and pome fruit	protection against molds ( <i>P. expansum</i> and <i>Botrytis cinerea</i> )	<i>Candida oleophila</i>	Ecogen Inc. USA
Befresh	fresh fermented milk products	control the growth of yeast and molds	<i>Lactobacillus paracasei</i> and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> ,	Handary
Candifruit	pome fruit	protection against <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , and <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Candida sake</i>	Sipcam-Inaagri, SA (Valencia, Spain)
Boni-Protect	pome fruit	protection against <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Monilinia fructigena</i> , <i>Penicillium expansum</i> , and <i>Pezizula malicortici</i>	<i>Aureobasidium pullulan</i>	BioFerm GmbH, Germany
Shemer	citrus fruit, stone fruits, and berries	protection against <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , and <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Metschnikowia fructicola</i>	Bayer Cropscience, Israel
Pantovital	citrus and pome fruit	protection against <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Penicillium italicum</i> , and <i>Rhizopus stolonifer</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	BioDURCAL S.L.
YieldPlus	citrus, apple, and pear fruit	not detailed	<i>Cryptococcus albidus</i>	Anchor Bio-Technologies, Cape Town, South Africa
Nexy	pome fruit	protection against <i>Botrytis cinerea</i> and <i>Penicillium expansum</i>	<i>Candida oleophila</i>	BioNext sprl, France
Serenade	grapes, legumes, pome fruits, and peanuts	protection against fungi causing powdery mildew, late blight brown rot, fireblight	<i>Bacillus subtilis</i>	Agra Quees Inc.

The first constraint concerns the gap between an observed activity in a culture medium (the *in vitro* effect) and the actual activity in the final matrix (*in situ* effect). Several studies have described that numerous microorganisms can show interesting results in *in vitro* screening conditions but that the actual number drastically decreases when tested in the target food matrices. For example, Delavenne et al. (2013) [78] tested 11 bacteria exhibiting important antifungal activity *in vitro* and only 1 strain, belonging to the *L. harbinensis* species, proved to be active in yogurt. One way to get around this problem is to use semi-synthetic media that can closely mimic food composition. However, as shown by Le Lay et al. (2016) [63] the use of a wheat based medium, although more effective than MRS for antifungal activity expression, did not completely represent the complexity of bakery products and therefore, the number of efficient antifungal strains was still far smaller when tested on sweet bread and pound cake. The observed differences are obviously linked to the complexity of the food or raw material matrices. They are characterized by different abiotic and biotic factors that can impact the growth and metabolism of the antifungal cultures or the bioavailability and bioactivity of antifungal compounds. The fungal spoiler load, the antifungal agent load or concentration, and the treatment moment will also impact efficiency. The interactions between fungal spoilers, food matrices, and antifungal agents are illustrated in Figure 1. Therefore, it is crucial to test the actual antifungal efficiency of potential bioprotective strains on the final product intended for use (challenge-tests).

Direct testing on the food matrix also enables the study of another important constraint linked to the direct addition of bacteria into a given food matrix. Indeed, this method directly provides information related to its impact on the organoleptic qualities of the product. According to its metabolism, an antifungal culture may exert a positive, neutral, or negative impact. Some examples are as follows, heterofermentative antifungal microorganisms may lead to CO<sub>2</sub> production directly affecting the product's aspect (bubble or air-pocket formation) or the packaging (blown packages), while other microbial candidates may exhibit intense enzymatic activities (i.e., proteolytic, amylolytic, or lipolytic) directly affecting product texture and overall aspect. Finally, other antifungal strains may produce aroma compounds leading to off-flavor defects. In this context, antifungal culture selection should aim towards organoleptic neutrality. This can be achieved by the use of sensory evaluation methods (i.e., triangle test, rapid methods for sensory profiling) to define and quantify a potential organoleptic impact in the final product. Notably, the quantity of antifungal agent to be added for efficient activity may be incompatible from an organoleptic but also a cost point of view.

The safety of the selected cultures or their CFS is another key aspect beyond these first two constraints linked to antifungal culture efficiencies and product quality issues. Safety assessment, including any regulatory considerations that need to be addressed, has now become a key step during strain selection for biotechnological use in general. In this sense, the European Union developed the Qualified Presumption of Safety (QPS) approach as a means to assess the safety of a broad range of biological agents with intended uses as sources of food and feed additives, enzymes, and plant protection products [209] and can more generally be considered as a premarket evaluation of microorganisms used in food and feed production [210] to ensure their safe use. In the United States, a similar 'Generally Recognized as Safe' (GRAS) status exists for food and substances used in food [211]. This status implies that a given GRAS substance has been efficiently shown to be safe under the conditions intended for its use. In both cases, regularly updated lists of QPS recommended biological agents or GRAS food substances are provided by the corresponding regulatory bodies (EFSA and FDA, respectively). In the case of bioprotective cultures, fermentates, or CFS, the goal is to intentionally and safely add them to a food matrix for their bioprotective properties while ensuring consumer safety. In this context, it is necessary to follow a rigorous safety assessment procedure, taking multiple criteria into account and a model has recently been proposed for LAB and propionibacteria safety evaluation by Coton et al. [212]. First of all, according to the strain intended for direct use or the strain used to produce the fermentates/CFS, the following criteria may be considered (i) overall body of knowledge including history and intended end use; (ii) well-defined taxonomy with identification at the species level; and (iii) any potential safety hazards including pathogenicity factors, unwanted



antibiotic resistance profiles (especially acquired resistances via horizontal gene transfer events that can potentially lead to further dissemination of this trait), and undesirable compound formation including biogenic amines, allergens, or toxins [209–215]. In the case of the most commonly considered bacterial groups for industrial applications (i.e., LAB and propionibacteria), many members of these groups already have a long history of safe use in foods and/or may already have a GRAS or QPS status. For such cultures, the safety criteria that need to be included during evaluation can be reduced to the current body of knowledge and intended end use, well-defined taxonomy (although in some cases, this may include very recently described species), antibiotic resistance profiles, and biogenic amine production (no known toxins or virulence factors have been described so far). Biogenic amines produced by LAB species in fermented foods, including dairy products, have been well reviewed in the literature (see [216–218]). Their production has been described as a strain-dependent trait for many species [219,220] which emphasizes the need to include this feature during safety assessment. By following this safety assessment procedure, a given culture or corresponding fermentate/CFS intended to be used as a bioprotective agent may be excluded for safe use if multi-resistant antibiotic profiles are identified (in particular, any acquired resistances and/or the presence of the corresponding biosynthesis genes and mobile elements in the genome) or if any undesirable compounds such as biogenic amines (especially tyramine, histamine, putrescine, or cadaverine) potentially known to have a negative physiological effect on sensitive consumers [218,221,222] and/or if the corresponding biosynthesis genes are identified. In the case of other bacterial groups (i.e., *Bacillus*) or fungal strains (yeasts or molds), safety assessment should also include determining whether the strain produces other undesirable compounds (especially toxins by bacteria or mycotoxins by molds). If detected, this would exclude their use in industrial applications.

Other constraints/criteria that must be considered before marketing a candidate bioprotective culture—or its corresponding fermentate/CFS—are related to strain selection, propagation, and preparation (i.e., selling format). As mentioned above, only few commercially available bioprotective cultures are on the market and this is likely due to the fact that not all criteria have been thoroughly studied or satisfied. Indeed, multiple requirements must be met, on top of the constraints mentioned above, knowing that any given bioprotective agent will be intentionally added to the food matrix at different steps during food processing and bioprotective activities must be conserved during shelf life. Preliminary tests to evaluate propagation to high population, microbial stability, and cell viability after preparation (in the selling format) and addition into the food matrix are required and bioprotective activity must also be maintained during the storage period [29,87,223,224]. This is an essential step as stability and/or activity may be altered according to how the protective culture is prepared. Different techniques can be used to prepare dry or liquid formulations, such as freeze-drying or spray drying techniques to produce active dry powder and metabolite(s) purification procedures. Dry formulations have been shown to be more advantageous for many reasons including longer shelf life, easier storage under non-refrigerated conditions, and ease of distribution [223,225]. In all cases, the impact of preparation procedures on the efficiency of protective cultures/fermentates/CFS should be determined. The most important criteria is to ensure that adequate shelf life is retained to ensure efficient use as a bioprotective agent in the food matrix. Notably, previous studies have shown that environmental conditions encountered in foods can have either positive or negative effects on bacterial antimicrobial activities [226–230] which again emphasizes the need for thorough in situ evaluation of candidate protective cultures before commercial use.

Finally, another constraint can be at the regulation level as, in some countries, the regulation definition of these antifungal agents (starter, ingredient, technological auxiliary, or even additive) can be raised. However, as discussed previously, the main antifungal agents correspond to microorganisms (or product of their metabolism) with a long history of use and GRAS or QPS status, thus guarantying an expected safety of use, provided that all mentioned safety aspects have been covered.



## 6. Conclusions

The increasing societal demand for less processed and more natural food products—while conserving those products' quality, safety, and shelf-life—has raised the question of chemical preservative replacement. In this context, bacteria and fungi as well as their metabolites are natural alternatives of interest for use in food as bioprotective tools to fight fungal spoilage and to answer consumer demands and legislation. From an applied point of view, the difference between the number of studies and the number of available microbial cultures indicates that efforts are needed to facilitate their application in food commodities. One of the main aspects concerns the crucial role of in situ studies using adapted fungal targets during antifungal activity screening or confirmation processes. Also, safety assessment, organoleptic neutrality, and activity stability of the bioprotective cultures need to be evaluated prior to marketing. From a cognitive point of view, while antifungal compounds have been widely studied, and have generally been shown to act synergistically, there is still a lack of knowledge concerning the overall picture as to what molecules are involved and their action mechanism(s). The combination of pertinent biochemical analytic tools and omics methods should enable us to decipher antifungal action mechanisms, potentially identifying new levers for antifungal activity. Finally, if finding natural antifungal agents is a key factor, it can only be considered in good practices and within the HACCP context as one of the hurdle technologies to prevent fungal spoilage.

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

## References

1. Gustavsson, J.; Cederberg, C.; Sonesson, U. *Global Food Losses and Food Waste: Extent, Causes and Prevention*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2011; ISBN 978-92-5-107205-9.
2. FAO. Save Food: Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction—Key Findings. Available online: <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/> (accessed on 2 May 2017).
3. Kitinoja, L.; Saran, S.; Roy, S.K.; Kader, A.A. Postharvest technology for developing countries: Challenges and opportunities in research, outreach and advocacy. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 597–603. [CrossRef] [PubMed]
4. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*; Springer: Boston, MA, USA, 2009; ISBN 978-0-387-92206-5.
5. Sanzani, S.M.; Reverberi, M.; Geisen, R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *122*, 95–105. [CrossRef]
6. Krupinsky, J.M.; Bailey, K.L.; McMullen, M.P.; Gossen, B.D.; Turkington, T.K. Managing plant disease risk in diversified cropping systems. *Agron. J.* **2002**, *94*, 198–209. [CrossRef]
7. Rojas-Graü, M.A.; Oms-Oliu, G.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. The use of packaging techniques to maintain freshness in fresh-cut fruits and vegetables: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 875–889. [CrossRef]
8. Verma, L.R.; Joshi, D.V.K. *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables: General Concepts and Principles*; Indus Publishing: Lahore, Pakistan, 2000; ISBN 978-81-7387-108-5.
9. Dijksterhuis, J.; Houbraken, J.; Samson, R.A. 2 Fungal spoilage of crops and food. In *Agricultural Applications*; Kempken, F., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; pp. 35–56, ISBN 978-3-642-36821-9.
10. Fellows, P.J. *Food Processing Technology: Principles and Practice*, 3rd ed.; Woodhead Publishing: Oxford, UK; Boca Raton, FL, USA, 2009; ISBN 978-1-84569-216-2.
11. Silva, M.; Lidon, F. Food preservatives—An overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric.* **2016**, *1*. [CrossRef]
12. Stark, J.; Tan, H.S. Natamycin. In *Food Preservatives*; Springer: New York, NY, USA, 2003; pp. 179–195.
13. Sharma, A.; Diwevedi, V.D.; Singh, S.; Pawar, K.K.; Jerman, M.; Singh, L.B.; Singh, S.; Srivastawav, D. Biological control and its important in agriculture. *Int. J. Biotechnol. Bioeng. Res.* **2013**, *4*, 175–180.
14. Oliveira, P.M.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol.* **2014**, *37*, 78–95. [CrossRef] [PubMed]

15. Kabaluk, J.T.; Svircev, A.M.; Goettel, M.S.; Woo, S.G. The Use and Regulation of Microbial Pesticides in Representative Jurisdictions Worldwide. Available online: [http://www.iobc-global.org/download/Microbial\\_Regulation\\_Book\\_Kabaluk\\_et\\_al\\_2010.pdf](http://www.iobc-global.org/download/Microbial_Regulation_Book_Kabaluk_et_al_2010.pdf) (accessed on August 2010).
16. Lacroix, C. *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2010; ISBN 0-85709-052-6.
17. Robinson-Boyer, L.; Jeger, M.J.; Xu, X.-M.; Jeffries, P. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Sci. Technol.* **2009**, *19*, 1051–1065. [[CrossRef](#)]
18. Spadaro, D.; Droby, S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *47*, 39–49. [[CrossRef](#)]
19. Deising, H.B.; Reimann, S.; Pascholati, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 286–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Piper, P.W. Resistance of yeasts to weak organic acid food Preservatives. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2011; Volume 77, pp. 97–113, ISBN 978-0-12-387044-5.
21. Atarés, L.; Chiralt, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 51–62. [[CrossRef](#)]
22. Pandey, A.K.; Kumar, P.; Singh, P.; Tripathi, N.N.; Bajpai, V.K. Essential Oils: Sources of Antimicrobials and Food Preservatives. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reyes-Jurado, F.; Franco-Vega, A.; Ramirez-Corona, N.; Palou, E.; Lopez-Malo, A. Essential Oils: Antimicrobial Activities, Extraction Methods, and Their Modeling. *Food Eng. Rev.* **2015**, *7*, 275–297. [[CrossRef](#)]
24. Crowley, S.; Mahony, J.; van Sinderen, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* **2013**, *33*, 93–109. [[CrossRef](#)]
25. Dalié, D.K.D.; Deschamps, A.M.; Richard-Forget, F. Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **2010**, *21*, 370–380. [[CrossRef](#)]
26. Delgado, J.; Owens, R.A.; Doyle, S.; Asensio, M.A.; Núñez, F. Manuscript title: Antifungal proteins from moulds: Analytical tools and potential application to dry-ripened foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 6991–7000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Elsser-Gravesen, D.; Elsser-Gravesen, A. Biopreservatives. In *Biotechnology of Food and Feed Additives*; Zorn, H., Czermak, P., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2013; Volume 143, pp. 29–49, ISBN 978-3-662-43760-5.
28. Leroy, F.; De Vuyst, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 67–78. [[CrossRef](#)]
29. Liu, J.; Sui, Y.; Wisniewski, M.; Droby, S.; Liu, Y. Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 153–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Stiles, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1996**, *70*, 331–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sharma, R.R.; Singh, D.; Singh, R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control* **2009**, *50*, 205–221. [[CrossRef](#)]
32. Punja, Z.K.; Utkhede, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 400–407. [[CrossRef](#)]
33. Gajbhiye, M.H.; Kapadnis, B.P. Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Sci. Technol.* **2016**, *26*, 1451–1470. [[CrossRef](#)]
34. Nguyen, P.-A.; Strub, C.; Fontana, A.; Schorr-Galindo, S. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biol. Control* **2017**, *104*, 10–27. [[CrossRef](#)]
35. Buron, N.; Coton, M.; Legendre, P.; Ledauphin, J.; Kientz-Bouchart, V.; Guichard, H.; Barillier, D.; Coton, E. Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 159–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Romano, A.; Perello, M.C.; de Revel, G.; Lonvaud-Funel, A. Growth and volatile compound production by *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* in red wine. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 1577–1585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. La Guerche, S.; Dauphin, B.; Pons, M.; Blancard, D.; Darriet, P. Characterization of Some Mushroom and Earthy Off-Odors Microbially Induced by the Development of Rot on Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9193–9200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



38. Rousseaux, S.; Diguta, C.F.; Radoi-Matei, F.; Alexandre, H.; Guilloux-Bénatier, M. Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. *Food Microbiol.* **2014**, *38*, 104–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Kabisch, J.; Erl-Höning, C.; Wenning, M.; Böhnlein, C.; Gareis, M.; Pichner, R. Spoilage of vacuum-packed beef by the yeast *Kazachstania psychrophila*. *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Spanoghe, M.; Godoy Jara, M.; Rivière, J.; Lanterbecq, D.; Gadenne, M.; Marique, T. Development and application of a quantitative real-time PCR assay for rapid detection of the multifaceted yeast *Kazachstania servazzii* in food. *Food Microbiol.* **2017**, *62*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Wrent, P.; Rivas, E.-M.; de Prado, E.; Peinado, J.; de Silóniz, M.-I. Assessment of the Factors Contributing to the Growth or Spoilage of *Meyerozyma guilliermondii* in Organic Yogurt: Comparison of Methods for Strain Differentiation. *Microorganisms* **2015**, *3*, 428–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Groenewald, M.; Boekhout, T.; Neuvéglise, C.; Gaillardin, C.; van Dijck, P.W.M.; Wyss, M. *Yarrowia lipolytica*: Safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *40*, 187–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Park, D.L.; Njapau, H.; Boutrif, E. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept. *Food Nutr. Agric.* **1999**, *23*, 49–54.
44. Sellamani, M.; Kalagatur, N.K.; Siddaiah, C.; Mudili, V.; Krishna, K.; Natarajan, G.; Putcha, V.L.R. Antifungal and Zearalenone Inhibitory Activity of *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Dairy Products on *Fusarium graminearum*. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Van Egmond, H.P.; Schothorst, R.C.; Jonker, M.A. Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 147–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ostry, V. *Alternaria* mycotoxins: An overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* **2008**, *1*, 175–188. [[CrossRef](#)]
47. Smith, M.-C.; Madec, S.; Coton, E.; Hymery, N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in Vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins* **2016**, *8*, 94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Fleet, G.H. Yeasts in foods and beverages: Impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 170–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Garnier, L.; Valence, F.; Pawtowski, A.; Auhustsinava-Galerie, L.; Frotté, N.; Baroncelli, R.; Deniel, F.; Coton, E.; Mounier, J. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Lozano-Ojalvo, D.; Rodríguez, A.; Cordero, M.; Bernáldez, V.; Reyes-Prieto, M.; Córdoba, J.J. Characterisation and detection of spoilage mould responsible for black spot in dry-cured fermented sausages. *Meat Sci.* **2015**, *100*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Nilsson, R.H.; Kristiansson, E.; Ryberg, M.; Hallenberg, N.; Larsson, K.H. Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. *Evol. Bioinform.* **2008**, *4*, 193–201.
52. Sholberg, P.L.; Conway, W.S. Postharvest pathology. In *The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks, USDA-ARS Agriculture Handbook*; U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service: Washington, DC, USA, 2004.
53. Gill, C.O.; Lowry, P.D.; Di Menna, M.E. A Note on the Identities of Organisms Causing Black Spot Spoilage of Meat. *J. Appl. Bacteriol.* **1981**, *51*, 183–187. [[CrossRef](#)]
54. Rawat, S. Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian J. Plant Sci. Res.* **2015**, *5*, 47–56.
55. Stevenson, A.; Cray, J.A.; Williams, J.P.; Santos, R.; Sahay, R.; Neuenkirchen, N.; McClure, C.D.; Grant, I.R.; Houghton, J.D.; Quinn, J.P. Others is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME J.* **2015**, *9*, 1333–1351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Wolter, H.; Laing, E.; Viljoen, B.C. Isolation and identification of yeasts associated with intermediate moisture meats. *Food Technol. Biotechnol.* **2000**, *38*, 69–76.
57. Dakal, T.C.; Solieri, L.; Giudici, P. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *185*, 140–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Leong, S.L.; Pettersson, O.V.; Rice, T.; Hocking, A.D.; Schnürer, J. The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus*—Growth and competition at various water activities. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 57–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Wheeler, K.A.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I.; Anggawati, A.M. Fungi associated with Indonesian dried fish. *Food Microbiol.* **1986**, *3*, 351–357. [[CrossRef](#)]
60. Stevenson, A.; Hamill, P.G.; O’Kane, C.J.; Kminek, G.; Rummel, J.D.; Voytek, M.A.; Dijksterhuis, J.; Hallsworth, J.E. *Aspergillus penicillioides* differentiation and cell division at 0.585 water activity: Fungal cell division at 0.585 water activity. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 687–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Zimmermann, M.; Miorelli, S.; Massaguer, P.R.; Aragão, G.M.F. Growth of *Byssoschlamys nivea* in pineapple juice under the effect of water activity and ascospore age. *Braz. J. Microbiol.* **2011**, *42*, 203–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Dos Santos, J.L.P.; Bernardi, A.O.; Pozza Morassi, L.L.; Silva, B.S.; Copetti, M.V.; Sant’Ana, A.S. Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. *Food Res. Int.* **2016**, *87*, 103–108. [[CrossRef](#)]
63. Le Lay, C.; Mounier, J.; Vasseur, V.; Weill, A.; Le Blay, G.; Barbier, G.; Coton, E. In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control* **2016**, *60*, 247–255. [[CrossRef](#)]
64. Hocking, A.D. Spoilage Problems: Problems caused by fungi. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014; pp. 471–481, ISBN 978-0-12-384733-1.
65. Gaggia, F.; Di Gioia, D.; Baffoni, L.; Biavati, B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends Food Sci. Technol.* **2011**, *22*, S58–S66. [[CrossRef](#)]
66. Wang, Y.-T.; Xue, Y.-R.; Liu, C.-H. A Brief Review of Bioactive Metabolites Derived from Deep-Sea Fungi. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4594–4616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Vero, S.; Garmendia, G.; González, M.B.; Bentancur, O.; Wisniewski, M. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 189–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Cortés-Zavaleta, O.; López-Malo, A.; Hernández-Mendoza, A.; García, H.S. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *173*, 30–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Russo, P.; Arena, M.P.; Fiocco, D.; Capozzi, V.; Drider, D.; Spano, G. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *247*, 48–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Pantelides, I.S.; Christou, O.; Tsolakidou, M.-D.; Tsalts, D.; Ioannou, N. Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biol. Control* **2015**, *88*, 46–53. [[CrossRef](#)]
71. Parafati, L.; Vitale, A.; Restuccia, C.; Cirvilleri, G. Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiol.* **2015**, *47*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ibrahim, M.; Kaushik, N.; Sowemimo, A.; Chhipa, H.; Koekemoer, T.; van de Venter, M.; Odukoya, O.A. Antifungal and antiproliferative activities of endophytic fungi isolated from the leaves of *Markhamia tomentosa*. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 590–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Tokpah, D.P.; Li, H.; Wang, L.; Liu, X.; Mulbah, Q.S.; Liu, H. An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice. *Biol. Control* **2016**, *103*, 21–29. [[CrossRef](#)]
74. Inglin, R.C.; Stevens, M.J.A.; Meile, L.; Lacroix, C.; Meile, L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *114*, 26–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Delavenne, E.; Mounier, J.; Déniel, F.; Barbier, G.; Le Blay, G. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *155*, 185–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Stiles, J.; Penkar, S.; Plocková, M.; Chumchalová, J.; Bullerman, L.B. Antifungal Activity of Sodium Acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Prot.* **2002**, *65*, 1188–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Lind, H.; Sjögren, J.; Gohil, S.; Kenne, L.; Schnürer, J.; Broberg, A. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **2007**, *271*, 310–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Delavenne, E.; Ismail, R.; Pawtowski, A.; Mounier, J.; Barbier, G.; Le Blay, G. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* **2013**, *30*, 206–213. [[CrossRef](#)]



79. Garnier, L.; Leyva Salas, M.; Pinon, N.; Wiernasz, N.; Patowski, A.; Coton, E.; Mounier, J.; Valence, F. High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. 2017, manuscript in preparation.
80. Axel, C.; Röcker, B.; Brosnan, B.; Zannini, E.; Furey, A.; Coffey, A.; Arendt, E.K. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol.* **2015**, *47*, 36–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Bian, X.; Muhammad, Z.; Evivie, S.E.; Luo, G.-W.; Xu, M.; Huo, G.-C. Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control* **2016**, *66*, 183–189. [[CrossRef](#)]
82. Nagaraja, H.; Chennappa, G.; Rakesh, S.; Naik, M.K.; Amaresh, Y.S.; Sreenivasa, M.Y. Antifungal activity of *Azotobacter nigricans* against trichothecene-producing *Fusarium* species associated with cereals. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1197–1204. [[CrossRef](#)]
83. Axel, C.; Brosnan, B.; Zannini, E.; Peyer, L.C.; Furey, A.; Coffey, A.; Arendt, E.K. Antifungal activities of three different *Lactobacillus* species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 1701–1711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kilani-Feki, O.; Khedher, S.B.; Dammak, M.; Kamoun, A.; Jabnoun-Khiareddine, H.; Daami-Remadi, M.; Tounsi, S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biol. Control* **2016**, *95*, 73–82. [[CrossRef](#)]
85. Li, W.; Zhang, H.; Li, P.; Apaliya, M.T.; Yang, Q.; Peng, Y.; Zhang, X. Biocontrol of postharvest green mold of oranges by *Hanseniaspora uvarum* Y3 in combination with phosphatidylcholine. *Biol. Control* **2016**, *103*, 30–38. [[CrossRef](#)]
86. Ma, H.; Sun, X.; Wang, M.; Gai, Y.; Chung, K.-R.; Li, H. The citrus postharvest pathogen *Penicillium digitatum* depends on the PdMpkB kinase for developmental and virulence functions. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *236*, 167–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Delavenne, E.; Cliquet, S.; Trunet, C.; Barbier, G.; Mounier, J.; Le Blay, G. Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhammosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiol.* **2015**, *45*, 10–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Li, H.; Liu, L.; Zhang, S.; Uluko, H.; Cui, W.; Lv, J. Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control* **2013**, *34*, 675–680. [[CrossRef](#)]
89. Lynch, K.M.; Pawlowska, A.M.; Brosnan, B.; Coffey, A.; Zannini, E.; Furey, A.; McSweeney, P.L.H.; Waters, D.M.; Arendt, E.K. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* **2014**, *34*, 167–173. [[CrossRef](#)]
90. Axel, C.; Brosnan, B.; Zannini, E.; Furey, A.; Coffey, A.; Arendt, E.K. Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Bullerman, L.B.; Giesova, M.; Hassan, Y.; Deibert, D.; Ryu, D. Antifungal activity of sourdough bread cultures. In *Advances in Food Mycology*; Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2006; Volume 571, pp. 307–316, ISBN 978-0-387-28385-2.
92. Coda, R.; Cassone, A.; Rizzello, C.G.; Nionelli, L.; Cardinali, G.; Gobbetti, M. Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3484–3492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Corsetti, A.; Gobbetti, M.; Rossi, J.; Damiani, P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *50*, 253–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Oliveira, P.; Brosnan, B.; Jacob, F.; Furey, A.; Coffey, A.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part II: Substrate impact and mycotoxin reduction. *Food Control* **2015**, *51*, 444–452. [[CrossRef](#)]
95. Sangmanee, P.; Hongpattarakere, T. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* **2014**, *40*, 224–233. [[CrossRef](#)]



96. Cray, J.A.; Bell, A.N.W.; Bhaganna, P.; Mswaka, A.Y.; Timson, D.J.; Hallsworth, J.E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? The biology of habitat dominance. *Microb. Biotechnol.* **2013**, *6*, 453–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Di Biase, M.; Lavermicocca, P.; Lonigro, S.L.; Valerio, F. *Lactobacillus brevis*-based bioingredient inhibits *Aspergillus niger* growth on pan bread. *Ital. J. Agron.* **2014**, *9*, 146. [[CrossRef](#)]
98. Ryu, E.H.; Yang, E.J.; Woo, E.R.; Chang, H.C. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiol.* **2014**, *41*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Gerez, C.L.; Fornaguera, M.J.; Obregozo, M.D.; Font de Valdez, G.; Torino, M.I. Antifungal starter culture for packed bread: Influence of two storage conditions. *Rev. Argent. Microbiol.* **2015**, *47*, 118–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Saladino, F.; Luz, C.; Manyes, L.; Fernández-Franzón, M.; Meca, G. In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control* **2016**, *67*, 273–277. [[CrossRef](#)]
101. Aunsbjerg, S.D.; Honoré, A.H.; Marcussen, J.; Ebrahimi, P.; Vogensen, F.K.; Benfeldt, C.; Skov, T.; Knøchel, S. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *194*, 46–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Gómez-Torres, N.; Ávila, M.; Delgado, D.; Garde, S. Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *232*, 103–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Cheong, E.Y.L.; Sandhu, A.; Jayabalan, J.; Kieu Le, T.T.; Nhiep, N.T.; My Ho, H.T.; Zwielehner, J.; Bansal, N.; Turner, M.S. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* **2014**, *46*, 91–97. [[CrossRef](#)]
104. Fernandez, B.; Vimont, A.; Desfossés-Foucault, É.; Daga, M.; Arora, G.; Fliss, I. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control* **2017**, *78*, 350–356. [[CrossRef](#)]
105. Axel, C.; Zannini, E.; Arendt, E.K.; Waters, D.M.; Czerny, M. Quantification of cyclic dipeptides from cultures of *Lactobacillus brevis* R2Δ by HRGC/MS using stable isotope dilution assay. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 2433–2444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Peyer, L.C.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *54*, 17–25. [[CrossRef](#)]
107. Peyer, L.C.; De Kruijf, M.; O'Mahony, J.; De Colli, L.; Danaher, M.; Zarnkow, M.; Jacob, F.; Arendt, E.K. *Lactobacillus brevis* R2Δ as starter culture to improve biological and technological qualities of barley malt. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
108. Ngang, J.-J.E.; Yadang, G.; Kamdem, S.L.S.; Kouebou, C.P.; Fanche, S.A.Y.; Kougan, D.L.T.; Tsoungui, A.; Etoa, F.-X. Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Sci. Technol.* **2015**, *25*, 245–259. [[CrossRef](#)]
109. Adedokun, E.O.; Rather, I.A.; Bajpai, V.K.; Park, Y.-H. Biocontrol efficacy of *Lactobacillus fermentum* YML014 against food spoilage moulds using the tomato puree model. *Front. Life Sci.* **2016**, *9*, 64–68. [[CrossRef](#)]
110. Varsha, K.K.; Devendra, L.; Shilpa, G.; Priya, S.; Pandey, A.; Nampoothiri, K.M. 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *211*, 44–50. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Gupta, R.; Srivastava, S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. *Food Microbiol.* **2014**, *42*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Ahmad Rather, I.; Seo, B.J.; Rejish Kumar, V.J.; Choi, U.-H.; Choi, K.-H.; Lim, J.H.; Park, Y.-H. Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett. Appl. Microbiol.* **2013**, *57*, 69–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Gamba, R.R.; Caro, C.A.; Martínez, O.L.; Moretti, A.F.; Giannuzzi, L.; De Antoni, G.L.; León Peláez, A. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *235*, 85–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Ghosh, R.; Barman, S.; Mukhopadhyay, A.; Mandal, N.C. Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria. *Biol. Control* **2015**, *83*, 29–36. [[CrossRef](#)]

115. Lipinska, L.; Klewicki, R.; Klewicka, E.; Kolodziejczyk, K.; Sojka, M.; Nowak, A. Antifungal Activity of *Lactobacillus* sp Bacteria in the Presence of Xylitol and Galactosyl-Xylitol. *Biomed. Res. Int.* **2016**, 5897486. [[CrossRef](#)]
116. Matei, G.M.; Matei, S.; Matei, A.; Cornea, C.P.; Draghici, E.M.; Jerca, I.O. Bioprotection of fresh food products against blue mold using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Romanian Biotechnol. Lett.* **2016**, *21*, 11201–11208.
117. Zhang, N.; Liu, J.; Li, J.; Chen, C.; Zhang, H.; Wang, H.-K.; Lu, F.-P. Characteristics and Application in Food Preservatives of *Lactobacillus plantarum* TK9 Isolated from Naturally Fermented Congee. *Int. J. Food Eng.* **2016**, *12*, 377–384. [[CrossRef](#)]
118. Kumar, S.N.; Sreekala, S.R.; Chandrasekaran, D.; Nambisan, B.; Anto, R.J. Biocontrol of *Aspergillus* Species on Peanut Kernels by Antifungal Diketopiperazine Producing *Bacillus cereus* Associated with Entomopathogenic Nematode. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Gajbhiye, M.H.; Sathe, S.J.; Marathe, R.J.; Deshmukh, R.B. Antifungal *Bacillus subtilis* AFB22 from pomegranate with potential to control fruit rot. *Res. J. Biotechnol.* **2013**, *8*, 26–35.
120. Zhang, C.H.; Li, Y.; Liu, P.; Liu, M.J. Identification of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains with high suppression to the key fruit pathogens of Chinese jujube. *Biocontrol Sci. Technol.* **2015**, *25*, 573–582. [[CrossRef](#)]
121. Kim, Y.S.; Balaraju, K.; Jeon, Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2016**, *17*, 931–940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Calvo, H.; Marco, P.; Blanco, D.; Oria, R.; Venturini, M.E. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol.* **2017**, *63*, 101–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Zhang, Z.; Chen, J.; Li, B.; He, C.; Chen, Y.; Tian, S. Influence of Oxidative Stress on Biocontrol Activity of *Cryptococcus laurentii* against Blue Mold on Peach Fruit. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Gotor-Vila, A.; Teixidó, N.; Di Francesco, A.; Usall, J.; Ugolini, L.; Torres, R.; Mari, M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* **2017**, *64*, 219–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Passera, A.; Venturini, G.; Battelli, G.; Casati, P.; Penaca, F.; Quaglino, F.; Bianco, P.A. Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiol. Res.* **2017**, *198*, 16–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Wei, Y.; Mao, S.; Tu, K. Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry. *Biol. Control* **2014**, *73*, 68–74. [[CrossRef](#)]
127. Qin, X.; Xiao, H.; Xue, C.; Yu, Z.; Yang, R.; Cai, Z.; Si, L. Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biol. Technol.* **2015**, *100*, 160–167. [[CrossRef](#)]
128. Campos-Martínez, A.; Velázquez-del Valle, M.G.; Flores-Moctezuma, H.E.; Suárez-Rodríguez, R.; Ramírez-Trujillo, J.A.; Hernández-Lauzardo, A.N. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. *Crop Prot.* **2016**, *89*, 101–104. [[CrossRef](#)]
129. Zhou, Y.; Zhang, L.; Zeng, K. Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biol. Control* **2016**, *96*, 39–47. [[CrossRef](#)]
130. Ferraz, L.P.; da Cunha, T.; da Silva, A.C.; Kupper, K.C. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol. Res.* **2016**, *188–189*, 72–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Perez, M.F.; Contreras, L.; Garnica, N.M.; Fernández-Zenoff, M.V.; Farías, M.E.; Sepulveda, M.; Ramallo, J.; Dib, J.R. Native Killer Yeasts as Biocontrol Agents of Postharvest Fungal Diseases in Lemons. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Grzegorzczak, M.; Żarowska, B.; Restuccia, C.; Cirvilleri, G. Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol.* **2017**, *61*, 93–101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Zhimo, V.Y.; Dilip, D.; Sten, J.; Ravat, V.K.; Bhutia, D.D.; Panja, B.; Saha, J. Antagonistic Yeasts for Biocontrol of the Banana Postharvest Anthracnose Pathogen *Colletotrichum musae*. *J. Phytopathol.* **2017**, *165*, 35–43. [[CrossRef](#)]



134. Yang, Q.; Wang, H.; Zhang, H.; Zhang, X.; Apaliya, M.T.; Zheng, X.; Mahunu, G.K. Effect of *Yarrowia lipolytica* on postharvest decay of grapes caused by *Talaromyces rugulosus* and the protein expression profile of *T. rugulosus*. *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *126*, 15–22. [[CrossRef](#)]
135. Andrade, M.J.; Thorsen, L.; Rodríguez, A.; Córdoba, J.J.; Jespersen, L. Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *170*, 70–77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Núñez, F.; Lara, M.S.; Peromingo, B.; Delgado, J.; Sánchez-Montero, L.; Andrade, M.J. Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* **2015**, *46*, 114–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Bernáldez, V.; Córdoba, J.J.; Rodríguez, M.; Cordero, M.; Polo, L.; Rodríguez, A. Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry-fermented sausage “salchichón”. *Food Control* **2013**, *32*, 69–76. [[CrossRef](#)]
138. Alía, A.; Andrade, M.J.; Rodríguez, A.; Reyes-Prieto, M.; Bernáldez, V.; Córdoba, J.J. Identification and control of moulds responsible for black spot spoilage in dry-cured ham. *Meat Sci.* **2016**, *122*, 16–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Gong, C.; Liu, Y.; Liu, S.; Cheng, M.; Zhang, Y.; Wang, R.; Chen, H.; Li, J.; Chen, X.; Wang, A. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2017**, *123*, 83–93. [[CrossRef](#)]
140. Schnürer, J.; Magnusson, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* **2005**, *16*, 70–78. [[CrossRef](#)]
141. Scholz, C.F.P.; Kilian, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 4422–4432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Crowley, S.; Mahony, J.; van Sinderen, D. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus plantarum* isolates and their application as bioprotectants in refrigerated foods. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 1417–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Dal Bello, F.; Clarke, C.I.; Ryan, L.A.M.; Ulmer, H.; Schober, T.J.; Ström, K.; Sjögren, J.; van Sinderen, D.; Schnürer, J.; Arendt, E.K. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* **2007**, *45*, 309–318. [[CrossRef](#)]
144. Zhang, X.; Zhang, S.; Shi, Y.; Shen, F.; Wang, H. A new high phenyl lactic acid-yielding *Lactobacillus plantarum* IMAU10124 and a comparative analysis of lactate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *356*, 89–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Muhialdin, B.J.; Hassan, Z.; Bakar, F.A.; Saari, N. Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* **2016**, *59*, 27–30. [[CrossRef](#)]
146. Sagdic, O.; Ozturk, I.; Yapar, N.; Yetim, H. Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit drink. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 537–545. [[CrossRef](#)]
147. Garofalo, C.; Zannini, E.; Aquilanti, L.; Silvestri, G.; Fierro, O.; Picariello, G.; Clementi, F. Selection of Sourdough Lactobacilli with Antifungal Activity for Use as Biopreservatives in Bakery Products. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7719–7728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Arendt, E.K.; Dal Bello, F.; Ryan, L. Increasing the Shelf Life of Bakery and Patisserie Products by Using the Antifungal *Lactobacillus Amylovorus* DSM 19280. US Patent WO200,9141,427 A2, 26 November 2009.
149. Hemme, D.; Foucaud-Scheunemann, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 467–494. [[CrossRef](#)]
150. Kalschne, D.L.; Womer, R.; Mattana, A.; Sarmiento, C.M.P.; Colla, L.M.; Colla, E. Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in in “sliced vacuum-packed cooked ham”. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 173–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Sadeghi, A.; Raeisi, M.; Ebrahimi, M.; Sadeghi, B. Antifungal Activity of *Pediococcus pentosaceus* Isolated from Whole Barley Sourdough. *J. Food Qual. Hazards Control* **2016**, *3*, 30–36.
152. Oliveira, P.M.; Brosnan, B.; Furey, A.; Coffey, A.; Zannini, E.; Arendt, E.K. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control* **2015**, *51*, 433–443. [[CrossRef](#)]

153. Stackebrandt, E.; Cummins, C.S.; Johnson, J.L. Family Propionibacteriaceae: The genus *Propionibacterium*. In *The Prokaryotes*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2006; pp. 400–418, ISBN 978-0-387-25493-7.
154. Falardeau, J.; Wise, C.; Novitsky, L.; Avis, T.J. Ecological and Mechanistic Insights into the Direct and Indirect Antimicrobial Properties of *Bacillus subtilis* Lipopeptides on Plant Pathogens. *J. Chem. Ecol.* **2013**, *39*, 869–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Pretorius, D.; van Rooyen, J.; Clarke, K.G. Enhanced production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnol.* **2015**, *32*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Li, X.; Zhang, Y.; Wei, Z.; Guan, Z.; Cai, Y.; Liao, X. Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Muccilli, S.; Restuccia, C. Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms* **2015**, *3*, 588–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Hara, S.; Iimura, Y.; Otsuka, K. Breeding of Useful Killer Wine Yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* **1980**, *31*, 28–33.
159. Janisiewicz, W.J.; Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2002**, *40*, 411–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Hatoum, R.; Labrie, S.; Fliss, I. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Chanchaichaovivat, A.; Panijpan, B.; Ruenwongsa, P. Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biol. Control* **2008**, *47*, 207–215. [[CrossRef](#)]
162. Zhang, X.-Y.; Zhang, Y.; Xu, X.-Y.; Qi, S.-H. Diverse Deep-Sea Fungi from the South China Sea and Their Antimicrobial Activity. *Curr. Microbiol.* **2013**, *67*, 525–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Wang, Y.; Yu, T.; Li, Y.; Cai, D.; Liu, X.; Lu, H.; Zheng, X. Postharvest biocontrol of *Alternaria alternata* in Chinese winter jujube by *Rhodosporidium paludigenum*. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1492–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Banjara, N.; Suhr, M.J.; Hallen-Adams, H.E. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Curr. Microbiol.* **2015**, *70*, 792–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Hammes, W.P.; Knauf, H.J. Starters in the processing of meat products. *Meat Sci.* **1994**, *36*, 155–168. [[CrossRef](#)]
166. Delgado, J.; Acosta, R.; Rodríguez-Martín, A.; Bermúdez, E.; Núñez, F.; Asensio, M.A. Growth inhibition and stability of PgAFP from *Penicillium chrysogenum* against fungi common on dry-ripened meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *205*, 23–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Delgado, J.; Owens, R.A.; Doyle, S.; Asensio, M.A.; Núñez, F. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 8701–8715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Cray, J.A.; Bhaganna, P.; Singhal, R.S.; Patil, S.V.; Saha, D.; Chakraborty, R.; Timson, D.J.; Hallsworth, J.E. Modern fungicides and antifungal compounds VII. In *Proceedings of the 17th International Reinhardtsbrunn Symposium, April 21–25, 2013, Friedrichroda, Germany*; DPG Spectrum Phytomedizin; DPG-Verl: Braunschweig, Germany, 2014; ISBN 978-3-941261-13-6.
169. Thierry, A.; Deutsch, S.-M.; Falentin, H.; Dalmaso, M.; Cousin, F.J.; Jan, G. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *149*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Dagnas, S.; Gauvry, E.; Onno, B.; Membré, J.-M. Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. *J. Food Prot.* **2015**, *78*, 1689–1698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Axelsson, L.T.; Chung, T.C.; Dobrogosz, W.J.; Lindgren, S.E. Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* **1989**, *2*, 131–136. [[CrossRef](#)]
172. Black, B.A.; Zannini, E.; Curtis, J.M.; Ganzle, M.G. Antifungal Hydroxy Fatty Acids Produced during Sourdough Fermentation: Microbial and Enzymatic Pathways, and Antifungal Activity in Bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 1866–1873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Broberg, A.; Jacobsson, K.; Strom, K.; Schnurer, J. Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5547–5552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Li, H.; Liu, L.; Zhang, S.; Cui, W.; Lv, J. Identification of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Curr. Microbiol.* **2012**, *65*, 156–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



175. Mieszkin, S.; Hymery, N.; Debaets, S.; Coton, E.; Le Blay, G.; Valence, F.; Mounier, J. Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Strom, K.; Sjogren, J.; Broberg, A.; Schnurer, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4322–4327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Valerio, F.; Di Biase, M.; Lattanzio, V.M.T.; Lavermicocca, P. Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *222*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Yang, E.J.; Chang, H.C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* **2010**, *139*, 56–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Le Lay, C.; Coton, E.; Le Blay, G.; Chobert, J.-M.; Haertlé, T.; Choiset, Y.; Van Long, N.N.; Meslet-Cladière, L.; Mounier, J. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Paik, H.D.; Glatz, B.A. Purification and partial amino acid sequence of propionin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii* P127. *Le Lait* **1995**, *75*, 367–377. [[CrossRef](#)]
181. Schwenninger, S.M.; Lacroix, C.; Truttman, S.; Jans, C.; Spöndli, C.; Bigler, L.; Meile, L. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 2481–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Theron, M.M.; Lues, J.F.R. *Organic Acids and Food Preservation*; CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2011; ISBN 978-1-4200-7842-8.
183. Stratford, M.; Nebe-von-Caron, G.; Steels, H.; Novodvorska, M.; Ueckert, J.; Archer, D.B. Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *161*, 164–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Cray, J.A.; Russell, J.T.; Timson, D.J.; Singhal, R.S.; Hallsworth, J.E. A universal measure of chaotropicity and kosmotropicity: A universal measure of chao- and kosmotropicity. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 287–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Cray, J.A.; Stevenson, A.; Ball, P.; Bankar, S.B.; Eleutherio, E.C.; Ezeji, T.C.; Singhal, R.S.; Thevelein, J.M.; Timson, D.J.; Hallsworth, J.E. Chaotropicity: A key factor in product tolerance of biofuel-producing microorganisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *33*, 228–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Brosnan, B.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Furey, A. Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2983–2995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Brosnan, B.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Furey, A. The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures. *Talanta* **2014**, *129*, 364–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Brosnan, B.; Coffey, A.; Arendt, E.K.; Furey, A. A comprehensive investigation into sample extraction and method validation for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria using HPLC-UV/DAD. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 5331–5344. [[CrossRef](#)]
189. Crowley, S.; Mahony, J.; Morrissey, J.P.; van Sinderen, D. Transcriptomic and morphological profiling of *Aspergillus fumigatus* Af293 in response to antifungal activity produced by *Lactobacillus plantarum* 16. *Microbiology* **2013**, *159*, 2014–2024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Coda, R.; Rizzello, C.G.; Di Cagno, R.; Trani, A.; Cardinali, G.; Gobbetti, M. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol.* **2013**, *33*, 243–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Delgado, J.; Peromingo, B.; Núñez, F.; Asensio, M.A. Use of molds and their antifungal proteins for biocontrol of toxigenic molds on dry-ripened cheese and meats. *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *11*, 40–45. [[CrossRef](#)]
192. Haidar, R.; Fermaud, M.; Calvo-Garrido, C.; Roudet, J.; Deschamps, A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria. *Phytopathol. Mediterr.* **2016**, *55*, 301–322. [[CrossRef](#)]
193. Ongena, M.; Jacques, P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 115–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Rautenbach, M.; Troskie, A.M.; Vosloo, J.A. Antifungal peptides: To be or not to be membrane active. *Biochimie* **2016**, *130*, 132–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



195. Selitrennikoff, C.P. Antifungal Proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 2883–2894. [CrossRef] [PubMed]
196. Sumi, C.D.; Yang, B.W.; Yeo, I.-C.; Hahm, Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics. *Can. J. Microbiol.* **2015**, *61*, 93–103. [CrossRef] [PubMed]
197. Tan, Z.; Lin, B.; Zhang, R. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *SpringerPlus* **2013**, *2*, 543. [CrossRef] [PubMed]
198. Di Francesco, A.; Martini, C.; Mari, M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: How many mechanisms of action? *Eur. J. Plant Pathol.* **2016**, *145*, 711–717. [CrossRef]
199. Rouissi, W.; Ugolini, L.; Martini, C.; Lazzeri, L.; Mari, M. Control of Postharvest Fungal Pathogens by Antifungal Compounds from *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* **2013**, *76*, 1879–1886. [CrossRef] [PubMed]
200. Li, H.; Zhang, S.; Lu, J.; Liu, L.; Uluko, H.; Pang, X.; Sun, Y.; Xue, H.; Zhao, L.; Kong, F.; et al. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control* **2014**, *43*, 57–64. [CrossRef]
201. Nally, M.C.; Pesce, V.M.; Maturano, Y.P.; Rodriguez Assaf, L.A.; Toro, M.E.; Castellanos de Figueroa, L.I.; Vazquez, F. Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *204*, 91–100. [CrossRef] [PubMed]
202. Hua, S.S.T.; Beck, J.J.; Sarreal, S.B.L.; Gee, W. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Res.* **2014**, *30*, 71–78. [CrossRef] [PubMed]
203. Rahman, M. *Bacillus* spp.: A promising biocontrol agent of root, foliar, and postharvest diseases of plants. In *Bacilli and Agrobiotechnology*; Islam, M.T., Rahman, M., Pandey, P., Jha, C.K., Aeron, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016; pp. 113–141, ISBN 978-3-319-44408-6.
204. Li, C.; Wang, J.; Luo, C.; Ding, W.; Cox, D.G. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28*, 616–621. [CrossRef] [PubMed]
205. Klewicka, E. Antifungal activity of lactic acid bacteria of genus *Lactobacillus* sp in the presence of polyols. *Acta Aliment.* **2007**, *36*, 495–499. [CrossRef]
206. Serrazanetti, D.I.; Guerzoni, M.E.; Corsetti, A.; Vogel, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 700–711. [CrossRef] [PubMed]
207. Qin, G.Z.; Tian, S.P.; Xu, Y.; Wan, Y.K. Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2003**, *62*, 147–154. [CrossRef]
208. Geremew, T.; Kebede, A.; Andualem, B. The role of spices and lactic acid bacteria as antimicrobial agent to extend the shelf life of metata ayib (traditional Ethiopian spiced fermented cottage cheese). *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5661–5670. [CrossRef] [PubMed]
209. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA J.* **2016**, *14*. [CrossRef]
210. Bourdichon, F.; Casaregola, S.; Farrokh, C.; Frisvad, J.C.; Gerds, M.L.; Hammes, W.P.; Harnett, J.; Huys, G.; Laulund, S.; Ouwehand, A.; et al. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *154*, 87–97. [CrossRef] [PubMed]
211. FDA Generally Recognized as Safe (GRAS). Available online: <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/> (accessed on 9 April 2017).
212. Coton, M.; Lebreton, M.; Leyva Salas, M.; Navarro, M.; Patowsky, A.; Le Blay, G.; Valence, F.; Coton, E.; Mounier, J. Safety risk assessment of potential antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria. 2017, in preparation.
213. Gasser, F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur* **1994**, *92*, 45–67.
214. Mogensen, G.; Salminen, S.; O'Brien, J.; Ouwehand, A.; Holzapfel, W.; Shortt, C.; Fonden, R.; Miller, G.; Donohue, D.; Playne, M. Food microorganisms: Health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bull. Int. Dairy Fed.* **2002**, *377*, 4–9.
215. Vankerckhoven, V.; Huys, G.; Vancanneyt, M.; Vael, C.; Klare, I.; Romond, M.-B.; Entenza, J.M.; Moreillon, P.; Wind, R.D.; Knol, J.; et al. Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: Recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 102–114. [CrossRef]

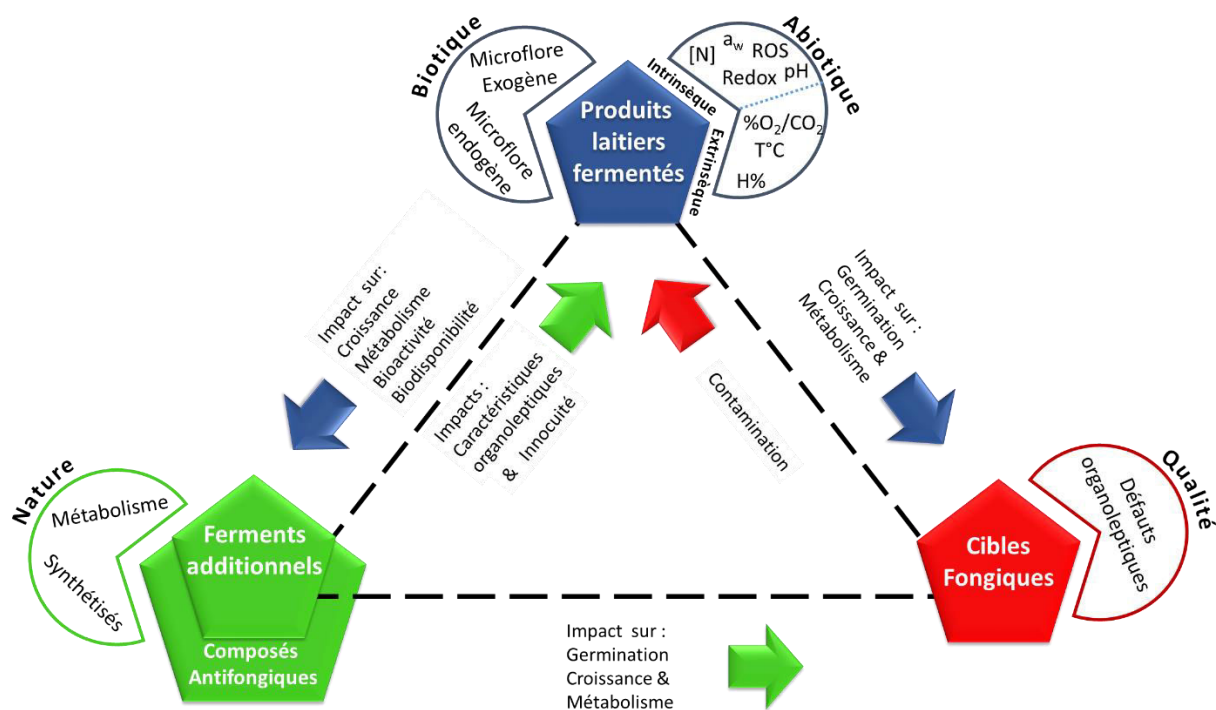


216. Ladero, V.; Fernández, M.; Calles-Enríquez, M.; Sánchez-Llana, E.; Cañedo, E.; Martín, M.C.; Alvarez, M.A. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* **2012**, *30*, 132–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
217. Martín, J.F.; Coton, M. Blue cheese. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 275–303, ISBN 978-0-12-802309-9.
218. Spano, G.; Russo, P.; Lonvaud-Funel, A.; Lucas, P.; Alexandre, H.; Grandvalet, C.; Coton, E.; Coton, M.; Barnavon, L.; Bach, B.; et al. Biogenic amines in fermented foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, S95–S100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
219. Coton, E.; Coton, M. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 52–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
220. Marcobal, Á.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C.; Muñoz, R.; Moreno-Arribas, M.V. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. *J. Food Prot.* **2006**, *69*, 397–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Ladero, V.; Calles-Enríquez, M.; Fernández, M.; Alvarez, A.M. Toxicological effects of dietary biogenic amines. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2010**, *6*, 145–156. [[CrossRef](#)]
222. Sillasantos, M.H. Biogenic amines: Their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **1996**, *29*, 213–231. [[CrossRef](#)]
223. Melin, P.; Hakansson, S.; Eberhard, T.H.; Schnurer, J. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Melin, P.; Sundh, I.; Hakansson, S.; Schnurer, J. Biological preservation of plant derived animal feed with antifungal microorganisms: Safety and formulation aspects. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1147–1154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Li, B.Q.; Tian, S.P. Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 854–861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Gálvez, A.; Abriouel, H.; López, R.L.; Omar, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *120*, 51–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
227. Pfeiler, E.A.; Klaenhammer, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 546–553. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Rouse, S.; Harnett, D.; Vaughan, A.; Van Sinderen, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J. Appl. Microbiol.* **2008**, *104*, 915–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
229. Schillinger, U.; Villarreal, J.V. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* **2010**, *21*, 107–111. [[CrossRef](#)]
230. Zhang, Y.-Q.; Gamarra, S.; Garcia-Effron, G.; Park, S.; Perlin, D.S.; Rao, R. Requirement for Ergosterol in V-ATPase Function Underlies Antifungal Activity of Azole Drugs. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Depuis la publication de cet article de synthèse en juillet 2017, près de 30 articles se sont intéressés à la recherche de nouvelles souches de bactéries lactiques à activité antifongique, dont 40% incluaient une étude de l'activité antifongique des souches étudiées *in situ*. Ces applications concernaient principalement des produits de boulangerie (Barman et al., 2017; Bustos et al., 2018; Nionelli et al., 2018; Quattrini et al., 2018; Russo et al., 2017), quelques produits laitiers fermentés, des céréales (Bartkiene et al., 2018; Cosentino et al., 2018; Juodeikiene et al., 2018; Lačanin et al., 2017; Sriwattanachai et al., 2018) et la viande (Castro et al., 2017; da Silva Sabo et al., 2017). Le Tableau 9 présente les études concernant les produits laitiers, dont seulement une a exploré l'impact des cultures bioprotectrices sur les caractéristiques organoleptiques (Cosentino et al., 2018).

Dans l'article présenté, les interactions entre les 3 acteurs dans un contexte de bioprotection a été schématisé d'un point de vue général. Dans la Figure 13, le diagramme de l'article a été adapté au contexte plus spécifique de la bioprotection des produits laitiers fermentés par l'ajout de bactéries lactiques comme ferments additionnels à activité antifongique et qui a fait l'objet de ma thèse.



**Figure 13. Diagramme représentant les interactions possibles entre les produits laitiers fermentés, les contaminants fongiques et les cultures antifongiques en tant que ferments additionnels dans un contexte de bioprotection. ROS : espèce d'oxygène réactif, [N] : teneur en nutriment, H% : hygrométrie.**

**Tableau 9. Bactéries lactiques bioprotectrices ajoutées en tant que ferment additionnel à activité antifongique dans des produits laitiers (données de la littérature sur la période 2014-2018)**

Nom des souches antifongiques (nombre de souches efficaces <i>in situ</i> /nombre de souches testées)	Tests <i>In situ</i>	Biotope d'origine des souches antifongiques	Cibles fongiques inhibées	Référence
<i>Lactobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1Np , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> K.C8.3.1I et <i>Lactobacillus paracasei</i> K.C8.3.1Hc1 (3/11)	yaourt	lait de vache et chèvre	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> and <i>Yarrowia lipolytica</i>	(Delavenne et al., 2013a)
<i>Lactobacillus casei</i> AST18 (1/1)	yaourt	produits laitiers chinois	<i>Penicillium</i> sp. nov. DCS 1541,	(Li et al., 2014a)
<i>Lactobacillus paracasei</i> DCS302	yaourt	Non détaillé	<i>Penicillium solitum</i> DCS 302	(Aunsbjerg et al., 2015)
<i>Lactobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1Np (1/2)	yaourt	lait de vache	<i>Yarrowia lipolytica</i>	(Delavenne et al., 2015)
<i>Lactobacillus reuteri</i> INIA P57	fromage à pâte pressée	fèces de porc	Non-indiqué	(Gómez-Torres et al., 2016)
<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 19280 (1/1)	fromage Cheddar	céréales	<i>Penicillium expansum</i> FST 4.22 et champignons environnementaux	(Lynch et al., 2014)
12 souches de <i>Lactobacillus plantarum</i> (12/897)	cottage	herbes fraîches, fruits et légumes	<i>Penicillium commune</i>	(Cheong et al., 2014)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> A238, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> A119 (2/5) Combinaison de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> A238 avec <i>Bifidum animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A026, et de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> A119 avec <i>Bifidum animalis</i> subsp. <i>lactis</i> A026	cottage	non-détaillé	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(Fernandez et al., 2017)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 4/16868, 1/14537, C1col15, et <i>Lactobacillus brevis</i> DSM 32516 (4/22)	fromage caciotta	lait cru, fromages et saucisses	<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC 9179 et <i>Aspergillus flavus</i> ATCC 46283	(Cosentino et al., 2018)
<i>Lactobacillus paracasei</i> SYR90, <i>Lactobacillus plantarum</i> OVI9 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BIOIII28 (3/89 et <i>Pediococcus</i> spp. (0/23)	yaourt	viande et produits laitiers fermentés	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> et <i>Penicillium brevicompactum</i>	(Lačanin et al., 2017)

Des avancées très significatives dans le domaine des bactéries lactique antifongiques ont été réalisées au cours des dernières années. Cependant, il existe certaines limitations et manques de connaissance. Bien qu'il y ait beaucoup de publications récentes sur les applications antifongiques, seul un petit nombre de ces études ont considéré la qualité du produit final, en intégrant des évaluations sensorielles. L'évaluation sensorielle est une condition préalable à l'application antifongique des bactéries lactiques dans les aliments, car les composés antifongiques produits peuvent altérer leurs propriétés organoleptiques. Il est également intéressant de noter que très peu de cultures commerciales sont disponibles sur le marché, peut-être parce que l'activité antifongique d'une souche donnée dépend de nombreux paramètres physico-chimiques, du processus de production alimentaire et de la capacité des souches à produire les composés in situ dans le produit alimentaire. Les questions d'innocuité sont également des facteurs importants qui, jusqu'à présent, n'ont pas été pris en compte pour toutes les souches antifongiques, alors que l'évaluation de l'innocuité devrait être systématique lors de la caractérisation d'une souche antifongique. Les efforts futurs devraient également porter sur l'élargissement des connaissances concernant la nature des composés antifongiques produits.



## **Objectifs de la thèse**

Dans ce contexte, notre objectif principal a été de caractériser l'activité antifongique des cultures antifongiques applicables en tant que ferment de bioprotection dans des produits laitiers.

### ***Stratégie***

Dans cet objectif, la première étape a été de sélectionner des souches utilisables comme ferments additionnels et de les associer pour maximiser l'activité antifongique contre des cibles fongiques choisies. La seconde étape a consisté à évaluer leur applicabilité dans les produits laitiers. Enfin, nous avons déterminé les composés antifongiques produits par ces cultures potentiellement supports de cette activité. Pour ce faire, nous avons effectué différentes études récapitulées dans la Figure 1, pour répondre à un certain nombre de questionnements scientifiques :

**Q1:** Quelles sont les souches présentant une activité antifongique en tant que ferment additionnel ?

**Q2:** Y-a-t-il un intérêt à combiner des souches efficaces ?

**Q3:** Quelle est l'efficacité et l'applicabilité des cultures antifongiques à l'échelle pilote ?

**Q4:** Quels sont les composés potentiellement supports de l'activité antifongiques observée ?

Dans la première partie de la thèse, pour sélectionner des souches efficaces dans des produits laitiers de composition différente, préparés avec différents diagrammes technologiques (température et temps d'incubation notamment) nous avons criblé, pour leur activité antifongique, un ensemble de souches de bactéries lactiques et propioniques présélectionnées. Ces souches ont été testées comme ferments additionnels dans deux modèles laitiers (modèle fromage et yaourt) (Q1). Ensuite, pour déterminer si les combinaisons des souches augmentaient l'activité antifongique de souches issues du criblage, nous avons criblé l'activité antifongique des combinaisons des souches dans ces deux modèles laitiers. Ces résultats nous ont permis de sélectionner 3 combinaisons binaires de lactobacilles présentant des activités antifongiques intéressantes (Q2). Avant les essais à échelle pilote, pour vérifier l'innocuité de ces combinaisons, les souches conformant les combinaisons ont été étudiées pour évaluer leur capacité à produire des amines biogènes et antibiorésistance. Nous avons ensuite évalué, pour les 2 combinaisons retenues, leur efficacité leur applicabilité, c'est-à-dire l'absence d'impact négatif de ces cultures sur la cinétique d'acidification du produit et sur ses caractéristiques sensorielles dans deux produits laitiers fabriqués à l'échelle pilote (crème fraîche et fromage à

pâte pressée à croûte morgée) (Q3). Pour chaque produit laitier, l'efficacité des combinaisons a été testée via des challenge tests contre 2 ou 3 cibles fongiques choisies selon le produit considéré ainsi que via des tests d'usage contre des contaminants fongiques « naturels » pour simuler des conditions chez le consommateur.

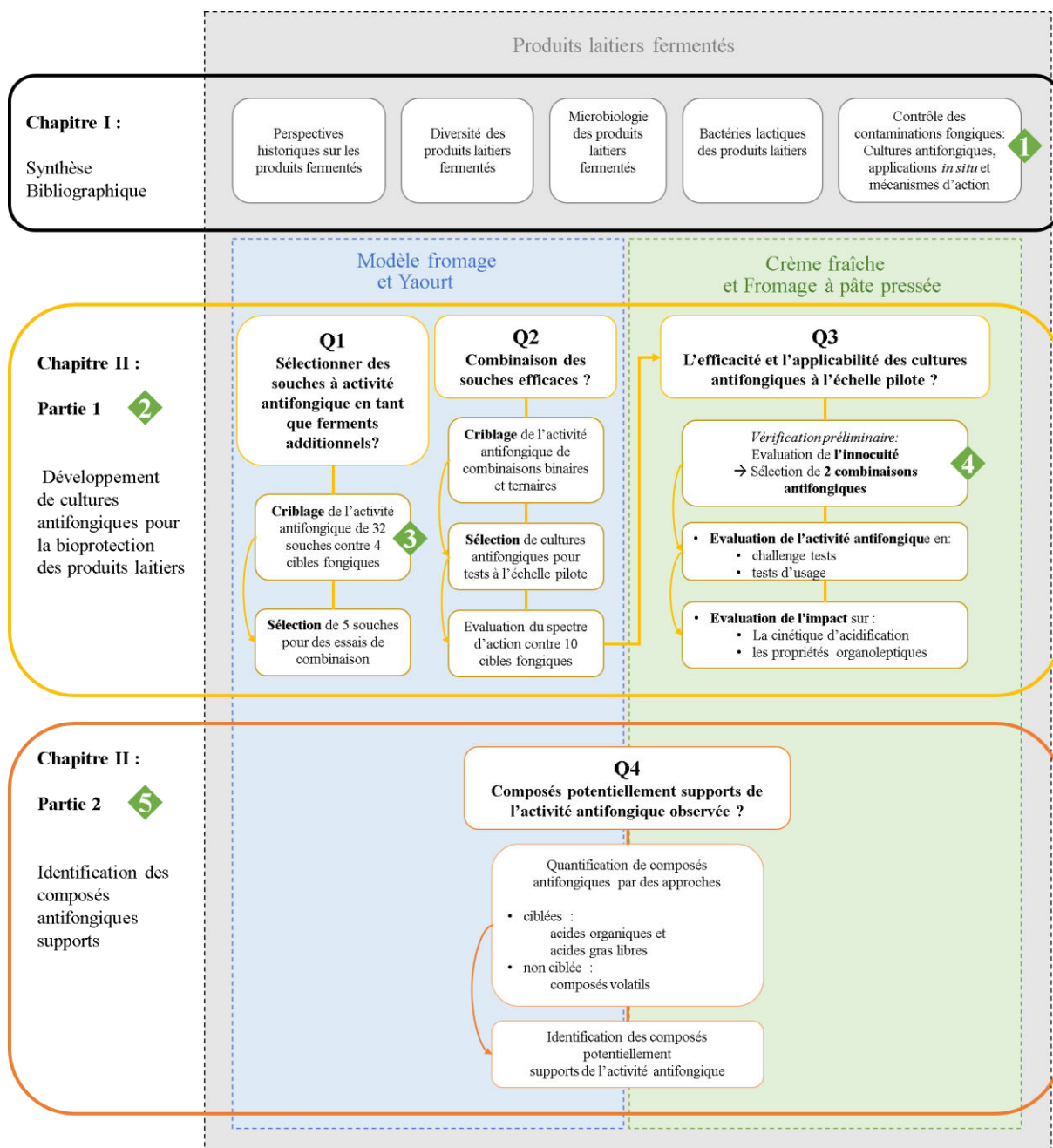
Dans une deuxième partie de la thèse, nous avons cherché à identifier les composés potentiellement impliqués dans l'activité antifongique des combinaisons sélectionnées, dans les 4 produits laitiers précédemment étudiés (yaourt, modèle fromage, crème fraîche et fromage à pâte pressée) (Q4). Différentes méthodes ciblées ont été mises en œuvre pour identifier et/ou quantifier le plus grand nombre de molécules connues pour leurs propriétés antifongiques : HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) avec détection par UV et réfractométrie pour les acides organiques, LC-Q-TOF-MS (*Liquid Chromatography-Quadrupole-Time Of Flight-Mass Spectrometry*) et GC-FID (*Gas Chromatography*) pour les acides organiques et les acides gras; Une méthode non ciblée, HS-GC-MS (*Head Space trap- Gas Chromatography mass spectrometry*), a été utilisée pour détecter les composés volatils.

En parallèle des approches expérimentales, une synthèse bibliographique a été réalisée et a fait l'objet de l'article 1. Elle montre comment l'activité antifongique résulte des interactions entre un aliment, un agent antifongique et un contaminant fongique.

Ce travail de thèse concerne les interactions entre les produits laitiers (aliment) et des cultures antifongiques utilisées comme ferments additionnels de bioprotection (agent antifongique). En ce qui concerne les contaminants fongiques, dans ce travail de thèse, ils n'ont été considérés que comme un moyen d'évaluer l'activité antifongique des cultures et de sélectionner des micro-organismes d'intérêt.

Le troisième chapitre de ce manuscrit, intitulé « Discussion générale », discute les résultats les plus marquants de cette thèse, évalue leur impact sur la bioprotection des produits laitiers et décrit les perspectives pour des travaux futurs.

Enfin, la dernière partie, intitulée « Valorisation du travail de thèse » met en avant les communications affichées et orales effectuées au cours de ces trois années de thèse.



**Figure 14. Récapitulatif du contenu de la synthèse bibliographique du Chapitre I et des différentes étapes des travaux de thèse présentés en 2 parties dans le Chapitre II.** Les ◆ verts signalent les travaux ayant fait l'objet d'articles scientifiques inclus dans ce manuscrit : L'article 1 se situe en amont des aspects expérimentaux et correspond à une synthèse bibliographique large concernant les agents microbiens antifongiques utilisés pour la bioprotection des aliments, l'article 2 couvre l'essentiel des travaux de la Partie 1 de cette thèse, l'article 3 décrit la méthode de criblage à haut débit en modèle laitier développée, l'article 4 porte sur l'évaluation de l'innocuité de souches issues du criblage, et l'article 5 sur la Partie 2 de cette thèse déterminant les composés antifongiques potentiellement supports de l'activité antifongique.



---

## **Chapitre II. Résultats**

---

# **Partie 1. Développement de cultures antifongiques pour la bioprotection des produits laitiers**

- **Contexte**

Ces dernières années, la demande des consommateurs pour plus de naturalité des produits alimentaires et l'évolution de la réglementation a conduit à développer des solutions alternatives comme la bioprotection. En particulier, de nombreux travaux de recherche ont exploré le potentiel de certains micro-organismes à inhiber les contaminations fongiques dans le but de développer des cultures bioprotectrices. Les bactéries lactiques et propioniques capables de se développer dans les produits laitiers sont par conséquent des bonnes candidates pour la bioprotection des produits laitiers. L'activité antifongique diffère entre espèces mais aussi entre souches d'une même espèce et selon la cible fongique considérée, il est donc important de disposer d'une vaste collection de souches de bactéries lactiques et propioniques, et de cibles fongiques pour pouvoir étudier leur potentiel antifongique. Il est important de noter que si de nombreuses études ont rapporté l'existence de souches à activité antifongique, le nombre de cultures pour la bioprotection des produits laitiers contre les contaminations fongiques disponibles est restreint. Les raisons possibles de ce différentiel correspondent, entre autres critères détaillés dans l'article de synthèse bibliographique présenté dans le chapitre précédent, à i) l'écart d'activité antifongique observée entre conditions *in vitro* et *in situ*, ii) la viabilité des souches dans le produit en tant que levain, iii) l'innocuité des souches et iv) les impacts indésirables au niveau technologique et organoleptique dans le produit. Les cultures commerciales disponibles listées dans le Tableau 2 (Article 1) incluent 3 cultures bioprotectrices antifongiques pour la bioprotection des produits laitiers qui combinent chacune 2 espèces de bactéries lactiques et/ou propioniques. En effet, les quelques études réalisées sur l'intérêt potentiel d'associer des souches de bactéries pour la bioprotection de produits laitiers et d'autres aliments montrent que, dans certains cas, il y a une amélioration de l'activité antifongique en comparaison avec les cultures pures de souches constituant la combinaison.

- **Questionnement scientifique**

Cette première partie de la thèse visait à sélectionner des cultures à activité antifongique efficaces et applicables comme ferments additionnels dans des produits laitiers.

- ***Stratégie de recherche***

En tenant compte des critères de sélection des souches à étudier, l'effet d'association de souches d'intérêt et les différentes contraintes décrites pour répondre à l'objectif de cette partie, nous avons déterminé quelles étaient les bactéries présentant une activité antifongique dans un milieu laitier (Q1), s'il y avait un intérêt à associer des souches pour augmenter l'activité antifongique et le spectre d'action (Q2), et quels étaient l'efficacité et l'impact des cultures antifongiques sur des produits réels (Q3). Afin d'éviter l'écart connu d'efficacité entre milieux synthétiques et aliments, l'ensemble des approches a été réalisé dans des matrices laitières.

Pour ce faire, dans la première partie de ce travail, nous avons évalué le potentiel antifongique de 32 souches bactériennes, l'effet des ferments technologiques et l'intérêt de combiner des souches dans les matrices laitières. Pour évaluer rapidement l'activité antifongique, nous avons utilisé une méthode de criblage haut-débit dans une matrice mimant le fromage, appelée dans cette thèse « modèle fromage » et une matrice « yaourt ». La méthode haut-débit en matrice fromage a fait l'objet de l'Article 3 présentée en annexe de cette partie. L'activité antifongique des souches a été évaluée contre 4 cibles fongiques isolées de produits laitiers contaminés (*Mucor racemosus* UBOCC-A-116002, *Penicillium commune* UBOCC-A-116003, *Galactomyces geotrichum* UBOCC-A-216001 et *Yarrowia lipolytica* UBOCC-A-216006) et comparée à deux cultures bioprotectrices commerciales. Cette première étape *in vitro* et une vérification préliminaire de l'innocuité des souches (ayant également fait l'objet d'une valorisation sous forme d'une publication présentée en annexe de cette partie - **Article 4**-) ont permis de sélectionner des combinaisons de souches pour valider leur activité antifongique *in situ*, à l'échelle pilote, par le biais de challenge-tests et de tests d'usage pour deux produits laitiers, à savoir la crème fraîche et une pâte pressée à croûte morgée. De plus, leur impact sur les qualités organoleptiques des produits laitiers a été évalué.

Les résultats de ces travaux pour la sélection de cultures à activité antifongique efficaces et applicables comme ferments additionnels de bioprotection dans des produits laitiers font l'objet d'un article (**Article 2**) accepté dans le journal « *Frontiers in Microbiology / section Food Microbiology* ». Cet article est présenté ci-après sous sa forme publiée.



## Article 2

### **Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications**



# Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications

Marcia Leyva Salas<sup>1,2</sup>, Anne Thierry<sup>2</sup>, Mathilde Lemaître<sup>1</sup>, Gilles Garric<sup>2</sup>, Marielle Harel-Oger<sup>2</sup>, Manon Chatel<sup>2</sup>, Sébastien Lê<sup>3</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Florence Valence<sup>2</sup> and Emmanuel Coton<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Francesca Patrignani,  
Università degli Studi di Bologna, Italy

### Reviewed by:

Giulia Tabanelli,  
Università degli Studi di Bologna, Italy  
Carmen Wachter,  
Universidad Nacional Autónoma de  
México, Mexico

### \*Correspondence:

Emmanuel Coton  
emmanuel.coton@univ-brest.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 20 April 2018

**Accepted:** 17 July 2018

**Published:** 07 August 2018

### Citation:

Leyva Salas M, Thierry A, Lemaître M, Garric G, Harel-Oger M, Chatel M, Lê S, Mounier J, Valence F and Coton E (2018) Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Front. Microbiol.* 9:1787. doi: 10.3389/fmicb.2018.01787

<sup>1</sup> Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France, <sup>2</sup> UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France, <sup>3</sup> Applied Mathematics Department, Agrocampus Ouest, Rennes, France

Consumer's demand for naturally preserved food products is growing and the use of bioprotective cultures is an alternative to chemical preservatives or a complementary tool to hurdle technologies to avoid or delay fungal spoilage of dairy products. To develop antifungal cultures for the dairy product biopreservation, experiments were conducted both *in vitro* and *in situ*. Firstly, the antifungal activity of 32 strains of lactic acid bacteria (LAB) and propionibacteria was screened alone, and then on combinations based on 5 selected lactobacilli strains. This screening was performed in yogurt and cheese models against four major spoilage fungi previously isolated from contaminated dairy products (*Penicillium commune*, *Mucor racemosus*, *Galactomyces geotrichum*, and *Yarrowia lipolytica*). Selected combinations were then tested as adjunct cultures in sour cream and semi-hard cheeses produced at a pilot scale to evaluate their antifungal activity during challenge tests against selected fungal targets (*P. commune*, *M. racemosus*, and *Rhodotorula mucilaginosa*) and shelf life tests; and their impact on product organoleptic properties. The screening step allowed selecting two binary combinations, A1 and A3 composed of *Lactobacillus plantarum* L244 and either *Lactobacillus harbinensis* L172 or *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA1113, respectively. *In situ* assays showed that the A1 combination delayed the growth of *P. commune*, *M. racemosus* and *R. mucilaginosa* for 2–24 days on sour cream depending of the antifungal culture inoculum, without effect on organoleptic properties at low inoculum ( $10^6$  colony-forming units (CFU)/mL). Moreover, the A1 and A3 combinations also delayed the growth of *P. commune* in semi-hard cheese for 1–6 days and 1 day, respectively. Antifungal cultures neither impacted the growth of starter cultures in both sour cream and cheese nor the products' pH, although post acidification was observed in sour cream supplemented with these combinations at

the highest concentrations ( $2.10^7$  CFU/mL). The combination of both *in vitro* and *in situ* screening assays allowed developing 2 antifungal combinations exhibiting significant antifungal activity and providing future prospects for use as bioprotective cultures in dairy products.

**Keywords:** biopreservation, dairy products, propionibacteria, *Lactobacillus harbinensis*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*

## INTRODUCTION

Food spoilage by fungi (molds or yeasts) is responsible for considerable food waste and economical losses. Among food products, fermented dairy products can be affected by fungal spoilers resistant to low pH and able to grow at low storage temperatures ( $<10^\circ\text{C}$ ). These contaminants exhibit proteolytic and lipolytic capacities, and consume the dairy product main sugars and organic acids (lactic and citric acids), thus impacting the product organoleptic qualities (Pitt and Hocking, 2009). Fungal spoilers can affect the product aspect (presence of thallus or yeast colonies, gas production), texture, odor, and flavor (Ledenbach and Marshall, 2009; Pitt and Hocking, 2009). In this context, the main fungal genera encountered in contaminated dairy products and production environments correspond to *Penicillium*, *Mucor*, and *Cladosporium* for molds, and *Candida*, *Meyerozyma*, and *Yarrowia* for yeasts (Pitt and Hocking, 2009; Garnier et al., 2016).

Preclusion of fungal spoilage in food currently relies on prevention methods (e.g., implementation of Hazard Analysis Critical Point -HACCP-), hurdle technologies (e.g., heat treatments, water removal, modified atmosphere packaging, salting, fermentation) and the use of chemical preservatives, including benzoate, propionate, sorbate, nitrate, and sulfites (Silva and Lidon, 2016). For fungal control in dairy products, potassium sorbate and natamycin (E235), a microbial food preservative produced by *Streptomyces natalensis* belonging to the group of polyene macrolide antimicrobials, are the main preservatives used. Natamycin is approved by most countries for use as a cheese surface treatment while its addition into other foods and the permitted applications differ per country/region (Stark and Tan, 2003). Agri-food industries rely mainly on chemical preservatives to control microbial contaminant growth and extend the product shelf life, but a strong societal demand for less processed and preservative-free food has emerged, and additive regulations are constantly evolving to limit their use (Fuselli et al., 2012). The latter aspects, combined with the necessity to produce food products complying with high safety and quality standards, have led to the search for alternatives to the use of chemical preservatives. Among the explored natural alternatives, biopreservation, corresponding to use of microorganisms and/or their antimicrobial metabolites (Stiles, 1996), has recently attract much interest.

In the dairy product context, lactic acid bacteria (LAB) and propionibacteria (PAB), which are naturally present or used as cultures in these matrices, play a key role in the

fermentation process. Fermentation is a “natural” preservation technique that improves food safety, nutritional value and specific organoleptic features (e.g., eye formation in Swiss-type cheeses by propionibacteria) (Bourdichon et al., 2012; Fröhlich-Wyder et al., 2017). Bacterial fermentation induces acidification, due to the production of organic acids (e.g., lactic, acetic, or propionic acids), which play a role in fermented food biopreservation (Batish et al., 1997; Leroy and De Vuyst, 2004). These organic acids as well as other metabolites such as phenyllactic, hydroxyphenyllactic, benzoic acids, fatty acids, volatile compounds (e.g., diacetyl, acetoin), cyclic dipeptides, hydrogen peroxide, reuterin, and/or proteinaceous compounds have exhibited an antifungal activity (Crowley et al., 2013; Leyva Salas et al., 2017). The use of LAB and PAB to reduce levels or fully replace antifungal chemical preservatives is clearly an alternative of interest as these microorganisms are recognized as safe (as confirmed by their Qualified Presumption of Safety -QPS- or Generally Recognize As Safe -GRAS- status), are known to have a long history of safe use and obviously exhibit antifungal properties (Bourdichon et al., 2012). In this context, several studies of LAB and PAB as bioprotective cultures with antifungal activity have been reported during the last years in various dairy products (yogurt, semi-hard ewe milk cheese, cottage cheese, and cheddar cheese; Delavenne et al., 2013, 2015; Li et al., 2013; Cheong et al., 2014; Lynch et al., 2014; Aunbjerg et al., 2015; Gómez-Torres et al., 2016; Fernandez et al., 2017). Noteworthy, despite the number of reported studies, only a few number of antifungal cultures are available on the market due to several constraints before commercialization of a strain of interest (e.g., gap between *in vitro* and *in situ* activity, undesirable organoleptic impacts on the products, safety evaluation and cell viability) (Leyva Salas et al., 2017).

The aim of this study was to develop bioprotective cultures with antifungal activity suitable for use in the dairy industry as adjunct cultures. To do so, a scale-up approach, going from antifungal activity screening in dairy models to pilot scale applications in actual dairy products, was performed. Several aspects were considered in order to get close to actual dairy industry conditions: (i) antifungal activity screening of 32 strains compatible with a use as adjunct cultures, (ii) use of two dairy models for the *in vitro* tests, (iii) antifungal activity test against fungal targets isolated from contaminated dairy products, (iv) assessment of the antifungal activity of bioprotective cultures at a pilot scale in two dairy products, and (v) evaluation of the impact of the antifungal bioprotective cultures on the starter cultures as well as the pH and organoleptic traits of the final products.



## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms and Culture Conditions

LAB (23 strains) and PAB (9 strains) (Table 1) were obtained from the Université de Bretagne Occidentale (UBOCC, France) and CIRM-BIA (INRA, France) culture collections. They all corresponded to strains that were previously shown to exhibit antifungal activity, either directly (Delavenne et al., 2012) or indirectly (use of fermentates, i.e., ingredients produced by the fermentation of a dairy matrices) (Garnier et al., 2018). These strains, presenting diversity at the species (19 *Lactobacillus*, 4 *Leuconostoc*, and 9 *Propionibacterium*) and intraspecific level, were selected based on their compatibility with dairy technology. Moreover, three strains isolated on de Man-Rogosa-Sharpie (MRS) agar from commercial bioprotective cultures were used as reference antifungal strains in yogurt, cheese model and sour cream. They corresponded to *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA1759 and *Lactobacillus paracasei* CIRM-BIA1761 isolated from the commercial culture CC1, while *Lactobacillus plantarum* CIRM-BIA1758 was isolated from the commercial culture CC2. Culture X1 corresponded to a 1:1 combination of the *L. paracasei* CIRM-BIA1759 and *L. rhamnosus* CIRM-BIA1761 strains, while X2 corresponded to *L. plantarum* CIRM-BIA1758 alone. For semi-hard cheese production, a commercial culture CC3 (consisting of the same species and purchased from the same supplier that CC1) was directly applied as recommended by the supplier. All strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in MRS broth (BD Difco laboratories, Sparks, MD, USA) supplemented with glycerol (20%) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Before inoculation as adjunct cultures, strains were cultivated twice in MRS broth for LAB and in yeast extract lactate (YEL) medium for PAB at  $30^{\circ}\text{C}$  for 24 and 48 h, respectively. Culture concentration was then adjusted to the target concentrations with sodium chloride peptone broth (Merck, Darmstadt, Germany). After centrifugation, the cells were resuspended in sterile skimmed milk. Various LAB commercial starters (i.e., used for their technological properties) were used for screening tests and pilot scale experiments. They corresponded to MA016 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *L. lactis* subsp. *lactis*, Elimeca, Thoissey, France); MM100 (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, Choozit, Danisco, Sassenage, France); MD88 (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, Choozit, Danisco, Sassenage, France); MY800 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Choozit, Danisco, Sassenage, France) and PAL YOG 1-30D (*S. thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Standa, Caen, France).

The 10 fungal targets used, 4 filamentous molds and 6 yeasts, were from the UBOCC collection (Plouzané, France). They corresponded to *Candida parapsilosis* UBOCC-A-216002, *Galactomyces geotrichum* UBOCC-A-216001, *Meyerozyma guilliermondii* UBOCC-A-216003, *Mucor racemosus* UBOCC-A-116002, *Penicillium commune* UBOCC-A-116003, *Penicillium bialowiezense* UBOCC-A-117365, *Didymella pinodella* UBOCC-A-116004, *Yarrowia lipolytica* UBOCC-A-216006, *Rhodotorula mucilaginosa* UBOCC-A-216004 and *Trichosporon asahii*

UBOCC-A-216005. Filamentous fungi were cultivated and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  as a spore or cell suspension in sterile glycerol as previously described (Delavenne et al., 2012), and yeasts were pre-cultivated in potato dextrose broth (PDB, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). Spore or cell concentrations in suspension were determined using a haemocytometer (Malassez, Preciss, Paris, France) and adjusted with sodium chloride peptone broth to  $5.10^3$  spores or cells/mL.

### Antifungal Activity Screening of Bacterial Strains

Antifungal activity was screened using the high-throughput method developed by Garnier et al. (2018) on two dairy matrices: the same cheese-mimicking matrix used by the latter authors and a yogurt. The cheese-mimicking matrix (hereafter named model cheese) was prepared from a heat-treated salted 0.7% (w/w) ultrafiltered milk retentate, kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use. The model cheese was defrosted at  $48^{\circ}\text{C}$  for 3 min, then 10 mL/L of a pH indicator (sterile solution of Litmus 50 g/L),  $10^6$  colony forming unit (CFU)/mL of commercial starters (either MA016, MM100 or MD88) and 1.5 mL/L of 5X diluted and filtered ( $0.22\ \mu\text{m}$ ) chymosin rennet (Maxiren 180, DSM Food Specialties, The Netherlands) were added to the thawed model cheese. After vigorous homogenization for 1 min, it was distributed into 24-well plates (2 mL/well), cell suspensions in milk of the tested strains were added or not (positive and negative fungal growth control wells) at 10% v/v at a final concentration of  $10^5$  and  $10^7$  CFU/mL (2 wells per concentration and 1 strain by column) and plates were incubated for 1 h at  $30^{\circ}\text{C}$  then for 3 days at  $20^{\circ}\text{C}$  with a final pH of  $4.8 \pm 0.1$ . The screening method was also adapted to yogurt. To do so, yogurt was prepared from semi-skimmed milk (Candia, France) supplemented with skimmed milk powder at 4% (Carrefour, France). After heat treatment for 30 min at  $85^{\circ}\text{C}$ , milk was rapidly cooled to  $45^{\circ}\text{C}$  before adding 0.1 g/L of the lyophilized starter culture (either MY800 or PAL YOG 1-30D) and pH indicator. After homogenization, the preparation was distributed into 24-well plates (2 mL/well) and the antifungal strain suspensions were added under the same conditions as for the model cheese. Plates were then incubated at  $42^{\circ}\text{C}$  during 4 or 6 h (for starters MY800 and PAL-YOG-1-30D, respectively) until pH  $4.97 \pm 0.03$  was reached. For the two dairy models, at the end of fermentation, exudate was removed and 50 spores/cells of either *M. racemosus*, *P. commune*, *Y. lipolytica*, or *G. geotrichum* were spotted at the center of each well (1 fungi tested/plate) except for the positive control wells. Antifungal activity was assessed by visually evaluating fungal growth in comparison with the negative control, after incubation for up to 8 days at 12 and  $10^{\circ}\text{C}$  (for cheese and yogurt plates, respectively). Antifungal activity scoring was done using a qualitative system presented in Figure 1 and by recording the days of total inhibition until fungal growth was visible. Moreover, a global score was calculated for each tested culture at a given inoculum. This global score corresponded to the sum of a numeric equivalent of the antifungal score (0, equivalent to -, corresponded to no inhibition and 3, equivalent to +++).





**FIGURE 1** | Example of the antifungal inhibition scoring in yogurt against *P. commune*. Control, yogurt with no antifungal culture; +++, total inhibition; ++, slight inhibition; +, very low inhibition; -, no inhibition.

corresponded to total inhibition) divided by the total number of tested fungal targets.

A first antifungal activity screening was performed for the 32 selected strains in the two dairy models with only one commercial starter per model (MY800 and MA016 for yogurt and cheese, respectively). In a second step, the impact of the commercial starters on the observed antifungal activity of 12 strains was evaluated using 3 other commercial starters. Then, 5 strains of interest were selected to be evaluated in combinations.

## Evaluation of the Antifungal Activity of Strain Combinations

Ten binary and three ternary combinations, based on a selection of 5 strains, were tested using the same screening method on yogurt and model cheese with only one starter for each model, and compared to the individual strains to evaluate combination effects. Combinations of interest were then tested for antifungal activity at four inoculum levels ranging from  $10^6$  to  $2 \cdot 10^7$  CFU/mL in the two models in the presence of different commercial starters. Then, to evaluate the action spectrum of the selected antifungal combinations and pure cultures, six supplementary fungal targets, namely *D. pinodella*, *C. parapsilosis*, *M. guilliermondii*, *P. bialowiezense*, *R. mucilaginosa*, and *T. asahii*, were studied in yogurt and cheese models.

## Antifungal Activity in Pilot Scale Conditions

Antifungal activity of the selected combinations was then determined in two types of dairy products, sour cream and semi-hard cheese, produced at a pilot scale at the Dairy Platform of INRA Rennes, France.

### Challenge-Tests in Sour Cream

Sour cream (final fat 35%) was produced from 25 L of pasteurized (20 s at 75°C), skimmed and standardized cow milk (50°C, 35% fat). Skimmed milk was then homogenized (65°C, 50 bars, and then 5 bars) and inoculated with a commercial starter (MM100) at 3 U/100 L, the selected antifungal combinations (either  $10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$  or  $2 \cdot 10^7$  CFU/mL) or the X1 combination ( $10^6$  CFU/mL) before packaging in 100 g plastic tubs with mobile lids. After overnight incubation (22 h at 23°C), sour cream samples were challenged. For positive controls, instead of the bioprotective cultures, potassium sorbate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added at 0.08% after acidification and mixed using a sterile spatula. Negative control corresponded to the sour cream containing only the technological starter. For challenge-tests, 50 fungal spores of either *P. commune* UBOCC-A-116003 or

*M. racemosus* UBOCC-A-116002 were inoculated on the sour cream surface and incubated at 10°C. Fungal growth was then visually evaluated daily during 4 weeks. For a third fungal target, *R. mucilaginosa* UBOCC-A-216004, cream tubs were inoculated at 2 CFU/g and mixed with a sterile spatula. Yeast growth was evaluated by enumeration on YEGC medium, containing 20 g/L of glucose (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 5 g/L of yeast extract (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.5 g/L of chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) after incubation for 7 days at 10°C. A number of non-challenged cream tubs were stored at 4°C for bacterial control, pH control, shelf life test and sensory analyses.

### Challenge-Tests in Semi-hard Cheese

Two replicate cheese trials were undertaken on two separate weeks. For each trial, four vats of cheese were produced, one for each antifungal combination and one control cheese without antifungal culture. Cheese were manufactured as follows. Cow milk was pasteurized at 72°C for 20 s, standardized to 30 g fat/kg milk, added with 36 mg Ca per kg (20 mL per 100 kg milk of a 500 g /L  $\text{CaCl}_2$  solution), then cooled to 4°C and stored overnight. Prior to cheese making, the milk was pumped into 30 L cylindrical jacketed stainless steel cheese vats, with variable speed cutting and stirring (Frominox, Assat, France) and warmed to 33°C. The MA016 commercial starter, previously suspended in UHT semi-skimmed milk and let to rehydrate for 1 h at 20°C, was added to the cheese milk at 0.5 U/100 kg (i.e.,  $\sim 10^6$  CFU/mL). Antifungal cultures were added at  $5 \cdot 10^6$  CFU/mL (each strain at  $2.5 \cdot 10^6$  CFU/mL for the A1 and A3 combinations, and the commercial culture CC3). After around 30 min pre-ripening at 33°C (pH 6.57–6.59), 0.25 mL/kg of animal rennet (520 mg/L chymosin, Carlina 145/80, Dupont Danisco, Dangé, Saint Romain, France) diluted in deionized water was added. After coagulation (34–37 min), curd was cut to the size of corn grains, washed with warm water, cooked for 20 min at 35°C, and drained. Curd was pre-pressed at 60 kPa for 30 min, molded (700 g curd per mold), and pressed at 300 kPa for 30 min followed by 600 kPa for 90 min. The obtained cheeses remained in the mold overnight, the temperature decreased from  $\sim 25$  to  $\sim 20^\circ\text{C}$ . At demolding, cheeses had a pH of  $5.11 \pm 0.04$  and contained  $51.41 \pm 1.13\%$  dry matter (pH of  $5.14 \pm 0.03$  and  $5.09 \pm 0.04$  and dry matter of  $50.79 \pm 0.75$ , and  $52.11 \pm 1.02$ , for cheese trials 1 and 2, respectively) and 45% fat in dry matter. Cheeses were salted by immersion at 20°C for 4 h in a sterile brine containing 33% (m/m) NaCl, 36 mg/L Ca, pH 5.2, and were let to dry overnight at room temperature (20–25°C) under a laminar flow hood. The external part of cheeses (3 mm thickness) was then sterilely discarded and their surface smeared with a smear preparation containing the commercial cultures *Debaryomyces hansenii* CHOOZIT DH, *Kluyveromyces lactis* CHOOZIT KL71, and *Brevibacterium linens* CHOOZIT SR3, (Danisco, Dangé Saint-Romain, France) at 0.01% w/w each in a sterile 0.1% NaCl solution, pH 5.2. Cheeses were then dried for 1 h at room temperature under laminar flow hood and then transferred to ripening chambers (12°C). After 1 day in the ripening chambers, the upper cheese surface was inoculated with three spots of 50 spores of either *P. commune*



or *M. racemosus* as fungal targets. For positive controls, instead of bioprotective cultures, natamycin (LCP natose, Laboratoires Humeau, France) was applied by spray over the upper surface of the cheese at a final concentration of 0.5 mg/dm<sup>2</sup> before spore inoculation. Some cheeses without spore inoculation were also included for microbial, biochemical analyses, shelf life tests and sensory evaluations. All cheeses were ripened for four weeks at 12°C and 96% relative humidity (1 chamber per fungal target). Cheeses were sampled aseptically for pH measurement, microbial analyses of starters and antifungal cultures over a period of 4 weeks at 1 week intervals.

## Bacterial Growth and Physicochemical Parameters

To evaluate the growth of antifungal strains and their potential impact on the commercial lactic starters, bacterial populations were enumerated before and after fermentation as well as during storage (once a week). To do so, sour cream (1 g) samples were diluted in sodium chloride peptone broth and semi-hard cheese (10 g) samples were blended in sterile bags with 2% trisodium citrate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) using a stomacher (Merck Eurolab, Strasbourg, France). Antifungal combinations were cultivated on LAMVAB agar (Hartemink et al., 1997) and incubated under anaerobic conditions (Anaerocult A; Merck, Darmstadt, Germany) at 30°C for 5 days. MM100 and MA016 starters were cultivated on M17 agar (Difco Laboratories, USA) supplemented with 0.5% lactose and incubated for 24 h at 30°C in aerobic conditions.

## Shelf Life Tests

Shelf life tests were performed to evaluate the antifungal activity exerted by the selected associations in the produced sour cream and semi-hard cheeses (free from fungal targets), in a naturally contaminated environment. For sour cream, after 2 weeks of storage at 4°C, 200 g of each condition were spread out in ten 100 mm Petri dishes. The plates were then exposed for 20 min in a lunch room (INRA, STLO), then sealed with plastic paraffin film and incubated at 10°C. Concerning semi-hard cheeses, 3 weeks ripened semi-hard cheeses of each condition were sliced (60 mm x 50 mm x 8 mm). The obtained slices were then exposed for 20 min in ten 60-mm Petri dishes. Plates were then sealed and incubated at 12°C. In both cases, fungal growth at the surface was visually evaluated after 10 days. Fungal contaminants were isolated on M2Lev agar (20 g/L malt extract, 3 g/L yeast extract and 15 g/L agar, 5 mg/l penicillin, 5 mg/l streptomycin). Isolates were then characterized at the genus level using phenotypic methods including macro- and microscopic observations (Pitt and Hocking, 2009) and for species identification, specific taxonomical markers were targeted. DNA regions of isolated yeasts and molds were amplified, sequenced and identified as detailed by Garnier et al. (2016).

## Sensory Analyses

The impact of antifungal cultures on the sensorial properties of the produced sour creams and semi-hard cheeses was evaluated using a sorting task by a panel of 27–30 untrained judges. Sour cream samples were stored at 4°C for 15 days before sensory

evaluation and 10 g of each sample was presented in disposable cups. Semi-hard cheeses were evaluated after 4 weeks ripening. Cheese rind was first brushed and wiped to harmonize the aspect of the samples and presented as 15 g (50 × 40 × 8 mm) slices. Samples were left for ~30 min at room temperature before being served, coded using a random 3-digit code and presented in a different, counterbalanced order for each judge. Control sour cream and cheese (with no antifungal culture) were presented in duplicate, leading to a total of 10 and 5 samples per session, respectively, for cream and cheese. Panelists were instructed to group together the samples perceived as the most similar, taking into account the characteristics they considered as important to differentiate the products. Once groups were made, panelists had to associate specific descriptors (**Supplementary Table 1**) to each group. Data were analyzed as recommended by Lê and Worch (2014) in the R free software using the *FactorMineR* package by generating a contingency table (*descfreq* function) that calculated the number of occurrences of each descriptor in the different samples ( $p < 0.2$ ). Then, a correspondence analysis (CA) was performed from the contingency table and plotted with confidence ellipse (functions *plot.CA* and *ellipseCA*).

## RESULTS

### Antifungal Activity Screening

Among the 32 screened strains (**Table 1**), lactobacilli showed higher antifungal activities than leuconostocs and propionibacteria. All strains except *Propionibacterium acidipropionici* CIRM-BIA928 showed antifungal activity against at least 1 fungal target in model cheese or yogurt. The antifungal activity varied between strains for all tested species. *P. commune* was the most inhibited fungal target followed by *M. racemosus*, while the *G. geotrichum* and *Y. lipolytica* yeasts were the most resistant as they were only inhibited by 1 *Leuconostoc* and 6 lactobacilli strains, with a very low (+) or slight (++) antifungal activity.

Antifungal strains showed a specific antifungal activity in each dairy model. The global score, i.e., the mean score of the 4 fungal targets tested, showed that 25 strains exhibited a higher or similar antifungal activity in cheese compared to yogurt, while it was the reverse for 6 strains (5 *L. rhamnosus* and 1 *L. plantarum*). *P. acidipropionici* CIRM-BIA928, *Propionibacterium jensenii* CIRM-BIA1774, and *P. thoeni* CIRM-BIA1763 were the only propionibacteria strain that exhibited antifungal activity in both models. In yogurt, 6 *Propionibacterium* and 1 *Leuconostoc* strains showed no antifungal activity. Antifungal activity for all strains was markedly higher when inoculated at 10<sup>7</sup> compared to 10<sup>5</sup> CFU/mL. At 10<sup>5</sup> CFU/mL, all strains exhibited very low (+) or no inhibition in yogurt while 7 lactobacilli, 1 leuconostoc strains and the reference cultures X1 and X2 showed a slight (++) to total (+++) inhibition in model cheese.

From the first screening (S1), 15 LAB strains (12 lactobacilli and 3 leuconostocs noted with a \* in **Table 1**) showed a high global score from 1.25 to 2.75 at least in one model. Among propionibacteria, the highest global score 0.75 was observed for 3 strains including *P. acidipropionici* CIRM-BIA1664 and CIRM-BIA1763, and *P. jensenii* CIRM-BIA1785. Among the strains

**TABLE 1 |** Antifungal activity of 32 strains and commercial reference cultures against 4 fungal targets in yogurt and cheese model.

Bioprotective culture	<i>P. commune</i>			<i>M. racemosus</i>			<i>G. geotrichum</i>			<i>Y. lipolytica</i>			Global score			
	A. Inoc	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2
<b>**L. harbinensis</b> L172	S1 10 <sup>5</sup>	-	+	nt	+	++	nt	+	+	nt	-	+	nt	0.25	1.25	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	+++2	+++4	nt	++	+++2	+++1	-	+	+	-	+	+	0.25	1.25	1.00
	S1 10 <sup>7</sup>	+++2	+++4	+++3	++	+++2	+++2	-	++	++	+	++	++	1.50	2.50	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	+++2	+++4	+++3	++	+++2	+++2	-	++	++	+	++	+++2	1.50	2.50	2.75
<b>**L. plantarum</b> L244	S1 10 <sup>5</sup>	-	++	++	-	+	nt	-	+	nt	-	+	nt	0.00	1.00	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	-	+++4	+++	+	++	++	-	+	+	-	+	+	0.25	1.00	1.50
	S1 10 <sup>7</sup>	+	+++4	+++3	++	++	++	-	++	++	-	++	++	0.25	1.75	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	+++3	+++3	++	++	++	+	++	++	-	++	+++2	1.25	2.25	2.25
<b>*L. plantarum</b> CIRM-BIA1108	S1 10 <sup>5</sup>	+	+++4	nt	nt	+++6	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	+	+	++	+	+	+	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.50	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	+++5	+	++	+	+	+	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.50	0.75
	S2 10 <sup>7</sup>	+++2	+	++	++	+++1	++	+	-	nt	-	-	nt	1.50	1.00	1.00
<i>L. casei</i> L1	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.00	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	+++2	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.75	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	+++2	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.75	nt
<i>L. casei</i> L193	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	+++2	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.75	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
<i>L. casei</i> L117	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	+++2	+++4	nt	+	+++1	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	++	+++3	++	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.50	0.75
	S2 10 <sup>7</sup>	++	++	+++3	+++2	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	1.50	1.25	1.50
<b>*L. casei</b> L194	S1 10 <sup>5</sup>	+	+++4	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	++	+++3	++	++	++	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	+++4	+++3	++	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	+++4	+++3	+++2	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.50	0.75
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA913	S1 10 <sup>5</sup>	+	+++4	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	+++4	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	1.25	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	+	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	+	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.25	nt
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA930	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	+++2	+++4	+++3	++	+++1	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	++	+++3	+++2	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	++	+++3	+++2	+++2	++	-	-	nt	-	-	nt	1.00	1.00	nt
<b>*L. rhamnosus</b> CIRM-BIA1107	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	+	+	+	+	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.00	0.50
	S2 10 <sup>5</sup>	++	++	++	++	++	++	-	-	nt	-	-	nt	1.50	0.25	1.00
	S1 10 <sup>7</sup>	+	++	++	++	++	++	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.00	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	+	++	++	++	++	++	-	-	nt	-	-	nt	1.50	0.25	0.50
<b>**L. rhamnosus</b> CIRM-BIA1112	S1 10 <sup>5</sup>	+	+++3	+++3	+++1	++	++	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	+++3	+++3	+++1	++	++	-	-	nt	-	-	nt	1.50	1.25	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	+	++	++	+++1	++	++	-	-	nt	-	-	nt	1.00	1.00	1.50
	S2 10 <sup>7</sup>	+	++	++	+++1	++	++	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt
<b>**L. rhamnosus</b> CIRM-BIA1113	S1 10 <sup>5</sup>	+	+++3	+++4	+++1	++	++	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.00	1.00
	S2 10 <sup>5</sup>	+++3	+++3	+++2	+++2	+++2	+++2	-	-	nt	-	-	nt	1.25	1.75	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	+++3	+++3	+++2	+++2	+++2	+++2	-	-	nt	-	-	nt	1.75	1.50	1.75
	S2 10 <sup>7</sup>	+++3	+++3	+++2	+++2	+++2	+++2	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
<b>*L. rhamnosus</b> CIRM-BIA1952	S1 10 <sup>5</sup>	+	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	S1 10 <sup>7</sup>	++	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	1.00	0.50	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	++	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt
<b>*L. reuteri</b> CIRM-BIA522	S1 10 <sup>5</sup>	-	+	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	-	+	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.00	0.25
	S1 10 <sup>7</sup>	-	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	1.25	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	-	++	nt	nt	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	0.25	1.00
<b>**L. brevis</b> L128	S1 10 <sup>5</sup>	-	++	+	+	++	+	-	-	nt	-	-	nt	0.00	1.25	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	++	+++4	+++3	+++3	+++3	+++3	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.75	0.75
	S1 10 <sup>7</sup>	++	+++4	+++3	+++3	+++3	+++3	-	-	nt	-	-	nt	0.50	2.00	nt
	S2 10 <sup>7</sup>	+	+++3	+++3	+++3	+++3	+++3	-	-	nt	-	-	nt	0.75	1.75	2.25
<b>*L. buchneri</b> L233	S1 10 <sup>5</sup>	-	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt
	S2 10 <sup>5</sup>	-	++	nt	nt	+	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.50	1.25	nt

(Continued)



TABLE 1 | Continued

Bioprotective culture	A. Inoc		P. commune		M. racemosus		G. geotrichum		Y. lipolytica		Global score				
	S1	S2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	Yogurt	Cheese 1	Cheese 2	
Leuconostoc	*L. mesenteroides L126	S1 10 <sup>8</sup>	-	++	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
		S1 10 <sup>7</sup>	+	++	nt	-	+++/3	nt	-	-	nt	0.50	1.25	nt	
	L. mes. dextranicum CIRM-BIA1176	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
		S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+++/4	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt
	*L. mes. dextranicum CIRM-BIA1187	S2 10 <sup>8</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	0.00	1.25	nt
		S2 10 <sup>7</sup>	+	+++	+++/3	+++/2	+	+++/4	+	+	+	+	0.25	2.00	nt
	S2 10 <sup>6</sup>	+	+++	+++/2	+	+++	+	+	+	+	0.50	1.00	1.50	+	
L. citreum CIRM-BIA1456	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S2 10 <sup>8</sup>	-	-	-	nt	-	-	nt	-	-	nt	0.25	0.00	0.00	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	++	nt	nt	+	+++/4	nt	-	-	nt	0.00	1.50	nt	
	S2 10 <sup>7</sup>	-	-	++	+	+	+	+	+	+	+	0.25	0.50	1.00	
		S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.25	0.00	nt
		S1 10 <sup>5</sup>	-	+	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.25	0.00	nt
P. jensenii CIRM-BIA1774	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.25	0.00	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt	
P. thoeni CIRM-BIA1786	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.50	0.50	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.50	0.50	nt	
P. acidipropionici CIRM-BIA928	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.50	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt	
P. acidipropionici CIRM-BIA1425	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.25	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
P. acidipropionici CIRM-BIA1427	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
*P. acidipropionici CIRM-BIA1664	S1 10 <sup>8</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.50	0.50	nt	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.00	nt	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.25	0.00	0.50	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	-	nt	nt	-	+	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
*P. acidipropionici CIRM-BIA1763	S2 10 <sup>8</sup>	-	-	+	+	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.00	0.50	
	S2 10 <sup>7</sup>	-	-	+	+	-	-	nt	-	-	nt	0.00	0.75	nt	
	S2 10 <sup>6</sup>	-	-	+	+	-	-	nt	-	-	nt	1.00	0.25	0.75	
	S2 10 <sup>5</sup>	+	+++/1	nt	nt	+	+	+	+	+	+	0.50	1.25	nt	
	S2 10 <sup>4</sup>	+++/4	+++/4	+++/3	+	+	+	+	+	+	+	0.25	1.00	1.25	
	S2 10 <sup>3</sup>	+++/3	+++/5	+++/6	+++/2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	2.00	2.00	1.75	
Commercial X1	S1 10 <sup>8</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	0.00	1.00	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	0.25	1.00	1.25	
	S1 10 <sup>6</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	1.75	1.50	nt	
	S1 10 <sup>5</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	2.00	2.00	1.75	
	S1 10 <sup>4</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	0.00	1.00	nt	
	S1 10 <sup>3</sup>	-	++	+	+	-	+	nt	-	-	nt	0.25	0.75	1.00	
Commercial X2	S1 10 <sup>8</sup>	-	+++	+++/2	+++	+	+++	+++	+	+	+	0.50	1.50	nt	
	S1 10 <sup>7</sup>	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	0.50	1.50	nt	
	S2 10 <sup>8</sup>	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	1.25	1.75	1.50	
	S2 10 <sup>7</sup>	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	1.25	1.75	1.50	
	S2 10 <sup>6</sup>	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	1.25	1.75	1.50	
	S2 10 <sup>5</sup>	-	+++	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+	1.25	1.75	1.50	

L., *Lactobacillus* or *Leuconostoc*; P., *Propionibacterium*. X1 and X2, antifungal reference cultures (for details see the Materials and Methods section). Antifungal activity from the different assays (A): S1, first screening of 32 strains; S2, Second screening of 12 preselected strains. Inoc. inoculum CFU/mL.

\*Strains with high global score; \*\*5 selected strains for combinations. Antifungal activity in the dairy products: Yogurt, Cheese 1 and 2 with commercial starters MY800, MA16 and MD88, respectively. Nt, not tested.

Score of antifungal activity as follows: -, no inhibition; +, very low inhibition; ++, slight inhibition; +++x, total inhibition during (x) days to visible growth compared to the negative control.

Antifungal activity when total inhibition: ++++/1; ++++/2; ++++/3; ++++/4; ++++/5; and ++++/6.

Global score is the mean of antifungal score (for details see the Materials and Methods section).

Global score: 0, no inhibition; 0.25 to 0.5, very low to slight inhibition; 0.75 to 1.75, total inhibition at least for 1 target; 2.00 to 2.75, total inhibition at least of 2 targets; and 3, total inhibition of all fungal targets.

exhibiting the highest antifungal activity, 12 were selected for the second screening. Reference cultures X1 and X2 showed high global scores ranging from 1.25 to 2, and X1 inhibited *P. commune* and *M. racemosus* 3–4 days more than X2.

The second screening (S2) showed little variations of the antifungal activity with the different commercial starters, indicating that starters did not impact the antifungal activity of the 12 strains (Table 1).

Based on the screening data (Table 1), 5 lactobacilli strains (noted with \*\* in Table 1) were selected based on their antifungal activity equal or higher than that of the reference cultures and/or their activity spectrum in at least one dairy model. The selected strains were *Lactobacillus harbinensis* L172, which showed the highest global scores in both models, *L. brevis* L128 and *L. plantarum* L244, which showed the highest global scores in model cheese, and *L. plantarum* CIRM-BIA1113 and CIRM-BIA1112, which showed the broadest activity spectra.

### Antifungal Activity of Strain Combinations Combination Test

Based on the 5 selected strains, the 10 possible binary and 3 ternary strain combinations were evaluated in the yogurt and cheese models. Ternary combinations were configured to test the effect of combining the high antifungal activity of *L. harbinensis* L172, *L. brevis* L128, and *L. plantarum* L244 with 1 of the 2 *L. rhamnosus* strains that showed antifungal activity against the resistant *G. geotrichum* and *Y. lipolytica* fungi. However, these ternary combinations did not show any antifungal activity improvement compared to the corresponding pure cultures and binary associations (data not shown). Four binary combinations, A1, A2, A3, and A4, showed the highest antifungal activity among the 13 tested combinations (data not shown). The four binary combinations involved 4 strains, in particular *L. plantarum* L244 used in 3 combinations, and *L. harbinensis* L172 and *L. brevis* L128, used in 2 combinations.

In yogurt, A1 and A2 combinations showed the highest inhibition time (4 days) on *P. commune* growth in the third screening. The inhibition obtained with the A3 and A4 combinations, 2 or 3 days for *P. commune*, was similar to pure cultures having the highest antifungal activity (i.e., *L. plantarum* L244 and *L. harbinensis* L172). Combination A4 showed the highest antifungal activity against *G. geotrichum* in yogurt with an inhibition for 1 day vs. no or low inhibition and no or slight inhibition for the other combinations.

In cheese model, combinations A1, A2, and A3 showed a broad spectrum, with a high inhibition of 1–4 days of *P. commune* and *M. racemosus*, and a slight to total inhibition of *G. geotrichum* and *Y. lipolytica*. Regarding inhibition of *P. commune*, the number of inhibition days induced by A1, A2, A3, and A4 were similar to that of the strains that showed the highest inhibition in pure cultures. A1 and A2 combinations showed inhibition of 1 day of *G. geotrichum*, while A2 was the only combination inhibiting *Y. lipolytica* growth for the same duration.

Before pilot scale applications, a safety evaluation of the strains composing the different combinations was performed. In this context, biogenic amine production and antibiotics resistance were studied. Combinations A2 and A4 were excluded because

of the risk of biogenic amine production by *L. brevis* L128, which possesses both the *tyrDC* and *agDi* genes, as recently demonstrated (Coton et al., 2018). These genes, encoding for a tyrosine decarboxylase and an agmatine deiminase, are associated with potential production of tyramine and putrescine, respectively. Therefore, only the A1 and A3 combinations were then kept for following experiments.

### Determination of the Optimal Inoculum for Antifungal Activity and Action Spectrum

The minimal inoculum allowing high antifungal activity was assessed using 3 intermediate levels of inoculation for combinations A1 and A3, selected from the previously obtained results.

In yogurt, the highest antifungal activity was always observed when strains were inoculated at the highest level, i.e.,  $2.10^7$  CFU/mL (Table 2). In contrast, in cheese, inoculum could be lower depending on the target ( $10^7$  CFU/mL and even  $2.10^6$  CFU/mL in some cases). Combinations A1 and A3 showed little variations of antifungal activity with the different tested commercial starters (data not shown).

As for the antifungal activity spectrum, the six additional fungal targets (*P. bialowiezense*, *P. pinodella*, *R. mucilaginosa*, *M. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, and *T. asahii*) were more sensitive than the initial 4 fungal targets. In particular, the time to visible growth reached at least 1 day and more than 15 days in many cases (Table 2). It should be noted that *T. asahii* did not grow in yogurt therefore the inhibition against this target could not be established in this model. Combination A1 showed the widest spectrum and led to the highest inhibition time in both models against the six additional fungal targets with a global score of 3 in yogurt and cheese, and was associated with 2–15 days of inhibition (Table 2). At the two levels of inoculum ( $10^7$  and  $2.10^7$  CFU/mL) in yogurt, the A3 combination totally inhibited at least 6 of the 9 tested fungi, for a duration ranging from 2 to 8 days. The A3 combinations showed a similar spectrum than that of A1. Nevertheless, A1 did not inhibit *R. mucilaginosa* (yogurt), and only and slightly inhibited *M. guilliermondii* and *R. mucilaginosa* (cheese). Combination A3 showed a slight inhibition of *R. mucilaginosa* and *C. parapsilosis* in yogurt.

The activity spectrum of A1 and A3 was compared to the corresponding pure cultures, against 10 fungal targets in cheese model and 9 in yogurt, at  $10^7$  and  $2.10^7$  UFC/mL (Line S6 from Table 2). In half of the cases, the time to visible growth increased by 1–11 days for the combinations compared to the corresponding pure cultures. In 64% of cases, it did not differ from the strain showing the highest activity in pure culture, and in 4% of cases, it decreased.

### In Situ Application of Antifungal Combinations in Sour Cream and Semi-hard Cheese

These pilot scale applications consisted in evaluating the ability of two selected combinations, A1 and A3, to inhibit fungi in challenge and shelf life tests in sour cream and semi-hard cheese.



**TABLE 2 |** Antifungal activity of 3 selected strains and their binary combinations (A1 and A3) in yogurt and cheese model against 10 fungal targets.

Bioprotective culture	Assay	Inoc	Penicillium commune		Mucor racemosus		Galactomyces geotrichum		Yarrowia lipolytica		Penicillium hahweizenae		Meyerozyma guilliermondii		Rhodotorula mucilaginosa		Candida parapsilosis		Diplomella pinodella		Trichosporon asahii		Global Score (9-10 targets)		
			Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt	Cheese	Yogurt
<i>L. harbinensis</i> L172	S6	10 <sup>7</sup>	+++5	+++2	+++2	+++2	++	+++1	+++1	+++1	+++15	++	+++15	+++3	+++9	+++2	+++15	+++1	+++15	+++15	ng	+++15	3.0	2.5	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++7	+++3	+++3	+++2	++	+++1	+++1	+++15	+++15	++	+++15	+++4	+++15	+++2	+++15	+++3	+++15	+++15	ng	+++15	3.0	2.5	
	S6	10 <sup>7</sup>	+++4	+++2	+++2	+++2	++	+++1	+++1	+++8	+++8	++	+++15	+++2	+++9	+++1	+++15	+++6	+++15	+++5	ng	+++15	2.6	2.1	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++6	+++2	+++2	+++1	+	+++1	+++1	+++8	+++8	++	+++15	+++2	+++9	+++1	+++15	+++15	+++15	+++10	ng	+++15	2.7	2.3	
	S6	10 <sup>7</sup>	+++4	+++2	+++2	+++1	+	+++1	+++1	+++8	+++8	++	+++15	+++2	+++9	+++1	+++15	+++15	+++3	+++3	ng	+++15	2.2	2.5	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++6	+++2	+++2	+++1	+	+++1	+++1	+++8	+++8	++	+++15	+++2	+++9	+++1	+++15	+++15	+++10	+++10	ng	+++15	2.3	2.6	
A1	S3	2.10 <sup>5</sup>	-	nt	-	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.0	nt	
	S4	10 <sup>6</sup>	+	+++2	-	+++1	-	+	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.3	1.5	
	S4	2.10 <sup>6</sup>	+++1	+++3	-	+++1	++	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.8	2.0	
	S6	10 <sup>7</sup>	+++5	+++3	+++2	+++2	+++3	++	+++1	+++1	+++15	+++11	+++15	+++7	+++9	+++3	+++15	+++1	+++15	+++15	ng	+++15	3.0	2.9	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++7	+++4	+++3	+++3	+++3	++	+++1	+++1	+++15	+++11	+++15	+++7	+++9	+++3	+++15	+++3	+++3	+++3	ng	+++15	3.0	2.9	
	S3	2.10 <sup>5</sup>	-	nt	-	nt	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.0	nt	
A3	S4	10 <sup>6</sup>	+	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.6	
	S4	2.10 <sup>6</sup>	+++1	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.7	
	S6	10 <sup>7</sup>	+++4	+++2	+++2	+++3	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.6	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++6	+++3	+++3	+++3	+++3	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.7
	S3	10 <sup>5</sup>	+	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.7	
	S4	10 <sup>6</sup>	+	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.7	2.7	
Commercial X1	S4	2.10 <sup>6</sup>	+++1	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.1	2.3	
	S6	10 <sup>7</sup>	+++3	+++3	+	+++1	++	+++3	+++1	+++8	+++8	++	+++7	+++4	+++15	+++1	+++15	+++3	+++3	+++5	ng	+++15	2.1	2.3	
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++5	+++4	+++4	+++4	+++4	++	+++3	+++1	+++6	+++6	++	+++1	+++5	+++4	+++2	+++3	+++3	+++3	ng	+++15	2.4	2.4	
	S3	10 <sup>5</sup>	-	nt	-	nt	nt	nt	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00	nt	
	S4	10 <sup>6</sup>	-	+	-	-	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	0.00	0.3	
	S5	5.10 <sup>6</sup>	-	++	-	+	+	+++2	+	+	+++2	+	+	+	+++2	+	+++2	+++1	+++1	+++4	ng	+++4	0.9	2.0	
Commercial X2	S6	10 <sup>7</sup>	+++1	+++1	-	+++1	-	+++1	+++1	+++2	+++2	++	+++2	+++2	+++1	+++1	+++1	+++1	+++5	ng	+++2	1.4	2.4		
	S6	2.10 <sup>7</sup>	+++1	+++1	-	+++1	-	+++1	+++1	+++2	+++2	++	+++2	+++2	+++1	+++1	+++1	+++1	+++5	ng	+++2	1.7	2.5		

*L.*, *Lactobacillus*; A1, *Lactobacillus harbinensis* L172 and *L. plantarum* L244; A3, *L. plantarum* L244 and *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113; X1 and X2, antifungal reference cultures (for details see the Materials and Methods section). Antifungal activity obtained in the different assays: S3, Third screening of 5 selected strains in 13 combinations; S4, Fourth screening of the selected combinations for determination of optimal inoculum; S5, Fifth screening of combinations against 10 fungal targets; and S6, Sixth screening of A1, A3 and their pure cultures against 10 fungal targets. *Inoculum* in CFU/mL.

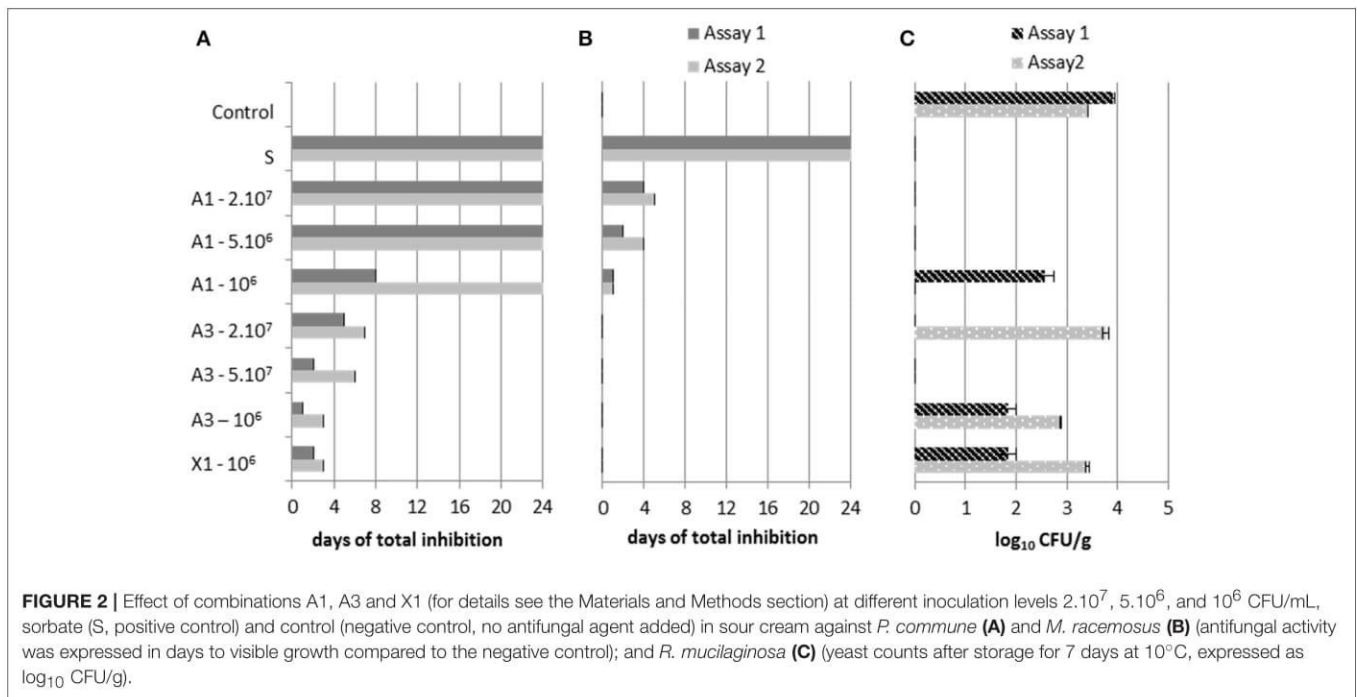
Antifungal activity in the dairy products: Yogurt and Cheese with commercial starter MY800 and MA016, respectively. NI, not tested.

Score of antifungal activity as follows: -, no inhibition; +, very low inhibition; ++, slight inhibition; +++x, total inhibition during (x) days to visible growth compared to the negative control.

Antifungal activity when total inhibition: ++++1; ++++2; ++++3; ++++4; ++++5; ++++6 to ++++11; and ++++15.

Global score: mean of antifungal score (for details see the Materials and Methods section).

Global score: 0, no inhibition; 0.25 to 0.5, very low to slight inhibition; 0.75 to 1.75, total inhibition at least for 1 target; 2.00 to 2.75, total inhibition at least of 5 targets; and 3, total inhibition of all fungal targets (9 or 10).



**FIGURE 2** | Effect of combinations A1, A3 and X1 (for details see the Materials and Methods section) at different inoculation levels 2.10<sup>7</sup>, 5.10<sup>6</sup>, and 10<sup>6</sup> CFU/mL, sorbate (S, positive control) and control (negative control, no antifungal agent added) in sour cream against *P. commune* (A) and *M. racemosus* (B) (antifungal activity was expressed in days to visible growth compared to the negative control); and *R. mucilaginosa* (C) (yeast counts after storage for 7 days at 10°C, expressed as log<sub>10</sub> CFU/g).

### Challenge-Tests

Inoculation of the fungal targets was performed to simulate a post-processing contamination. Potassium sorbate and natamycin were used as chemical additive reference (positive controls) for sour cream and semi-hard cheese, respectively.

In sour cream, the fungal target *P. commune* was the most inhibited, followed by *R. mucilaginosa* and *M. racemosus*, which were inhibited during a maximal time of 7 days compared to 24 days for *P. commune* (Figure 2). The A1 combination showed higher inhibition of the 3 targets compared to A3 and the reference culture X1, and an equal inhibition to that of sorbate (24 days) against *P. commune*, although some variability was observed. A1 antifungal activity led to 1 to 24 days inhibition of *M. racemosus* and *P. commune* (Figures 2A,B). In sour cream containing A1 at the 3 inoculum levels, *R. mucilaginosa* was not detectable (<1 cell/g) after 7 days (Figure 2C). At the 3 tested concentrations, A3 slightly inhibited (++) *M. racemosus* (data not shown) and totally inhibited *P. commune* for 1–7 days (Figure 2A). In one of sour cream assays, A3 only inhibited *R. mucilaginosa* at a 5.10<sup>6</sup> CFU/mL inoculum level (Figure 2C). X1 inoculated at 10<sup>6</sup> CFU/mL showed a similar antifungal activity to that of A3 inoculated at the same concentration. Some variability in antifungal activity was observed between replicates. This was especially true for inhibition of *P. commune* and *R. mucilaginosa* by the A1 combination at the lowest inoculation level.

In semi-hard cheeses, in the second assay, *M. racemosus* was totally inhibited for 1 day by A3 (Figure 3) and slightly inhibited (++) by A1 (data not shown). The fungal target *P. commune* was more inhibited by A1 and the commercial culture CC3, 1 to 6 days depending on the assay (Figure 3A). Antifungal activity of bioprotective cultures and natamycin varied between assays.

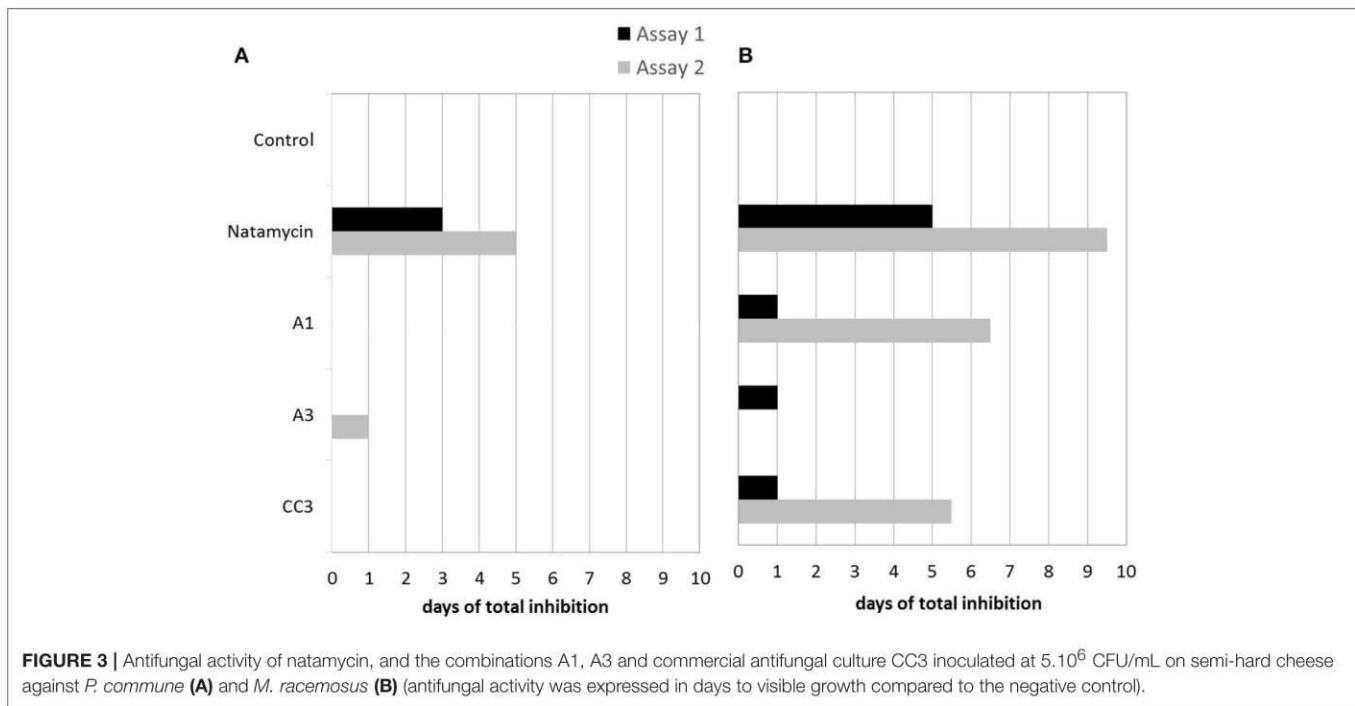
### Shelf Life Tests

Shelf life tests were performed on sour cream and semi-hard cheese to evaluate the growth of naturally contaminating fungi and to get closer to actual food post-contamination in particular in terms of inoculum (~1 spore in natural contamination vs. 50 spores as used as a worst case scenario in the previous experiments). For negative control sour creams (without potassium sorbate or antifungal culture), 100% of samples were contaminated. In contrast, for all the other treatments, no contamination of cream samples was observed with exception of the sour cream inoculated with A3 at 5.10<sup>6</sup> CFU/mL, which presented 10% of contaminated samples (Figure 4). The natural fungal contaminants found on contaminated sour cream with A3 were identified as *Cladosporium allicinum* and *Exophiala xenobiotica*, while the fungal contaminants found in control sour cream included the 2 later mentioned fungi and 6 other species, namely *Penicillium crustosum*, *Penicillium glabrum*, *Cladosporium cladosporioides*, *D. hansenii*, *Bulleromyces albus*, and *Sporidiobolus metaroseus*. In semi-hard cheese, it is worth noting that after 4 weeks in non-sterile ripening chambers at 12°C, the cheese surface was colonized in all assays with molds, therefore fungal growth was evaluated on the slice surface after 10 days of incubation post-slicing. The totality of negative control cheeses samples were contaminated, whereas samples of A1, A3 and commercial culture CC3 supplemented cheeses were notably less contaminated as shown on Figure 5. The fungal contaminant on cheese slices was identified as *Penicillium crustosum*.

### Microbial Enumeration and pH

Antifungal populations were evaluated by enumeration of the total lactobacilli in sour cream and semi-hard cheese in order to verify their viability at inoculation time, their growth and





survival at different stages of manufacture and storage. Samples containing A1 and A3 presented two types of lactobacilli colonies with similar number on the plates, corresponding to the two inoculated strains constituting the antifungal combinations.

The determined populations of antifungal cultures in cream and cheese milk were in agreement with the targeted inoculum concentrations and showed similar changes during the process regardless of the considered antifungal culture. A1 and A3 combination populations were stable or even increased during cheese ripening with maximal values of  $\sim 8.5 \log_{10}$  CFU/g (Figure 6).

There was no significant difference of pH during acidification between sour cream with and without antifungal cultures. Nevertheless, after 4 weeks of storage at  $10^\circ\text{C}$ , the pH of cream inoculated at  $2 \cdot 10^7$  CFU/mL with both A1 and A3 combinations was lower (0.2 pH units less) than that of control creams. In semi-hard cheese, antifungal cultures did not impact pH neither during manufacture nor during ripening.

Starter culture populations in sour cream and semi-hard cheeses with antifungal cultures did not differ, during the fermentation and 4 weeks of storage/ripening, from those of the control samples (data not shown). No NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria) was detected on LAMVAB on the control products. Bacterial population slightly varied during storage/ripening or sour cream and semi-hard cheese. In all products, starter culture population decreased in both products from the second weeks of storage. Concerning antifungal cultures, A1, A3 and X1 population increased during the first week of storage in sour cream. In semi-hard cheese, A1 and A3 population slightly increased during the 4 ripening weeks (data not shown).

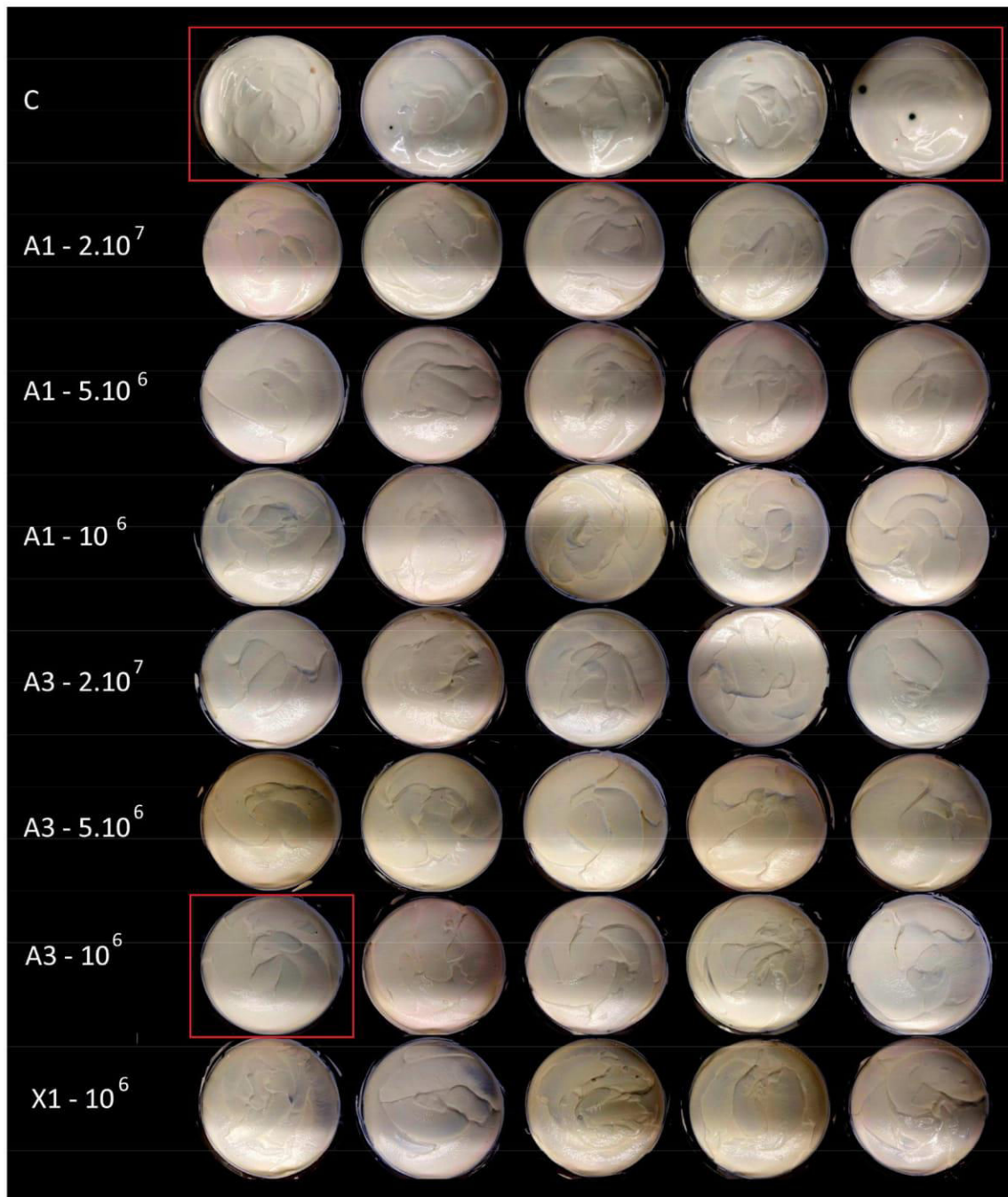
### Sensory Analyses

The CA map built from sensory evaluation data of sour cream showed that the samples were mainly separated on dimension 1 and cream with sorbate was separated from all other samples on dimension 2 (Figure 7A). The negative side of dimension 1 in the map contained 6 out of the 7 creams with antifungal cultures including the reference culture X1, characterized by their more acidic flavor (Table 3). Only the cream with A1 at  $10^6$  CFU/mL was perceived similar to the control samples and characterized by a “mild flavor.”

For cheeses, the CA map separates control cheeses from the other cheese samples on dimension 2 and the cheese containing the A1 culture on dimension 2. Control cheeses were characterized as tasteless, whereas cheese with CC3 was described as slightly acidic and with a different texture, and cheese A1 associated with a more bitter and acidic flavor (Figure 7B, Table 4).

### DISCUSSION

In the first part of this work, the antifungal activity of 32 strains for potential use as adjunct antifungal cultures was evaluated using a high-throughput screening method in two dairy models against 4 fungal targets, namely *P. commune*, *M. racemosus*, *G. geotrichum*, and *Y. lipolytica*. As shown in several studies, the choice of the screening media is a crucial step because the number of potential antifungal agents can be drastically reduced between a screening step performed in synthetic media and *in situ* tests in actual food products. For example, Delavenne et al. (2013) indicated that from 11 antifungal LAB active *in vitro*, only 1 showed a very strong antifungal activity in yogurt. Similarly, Le

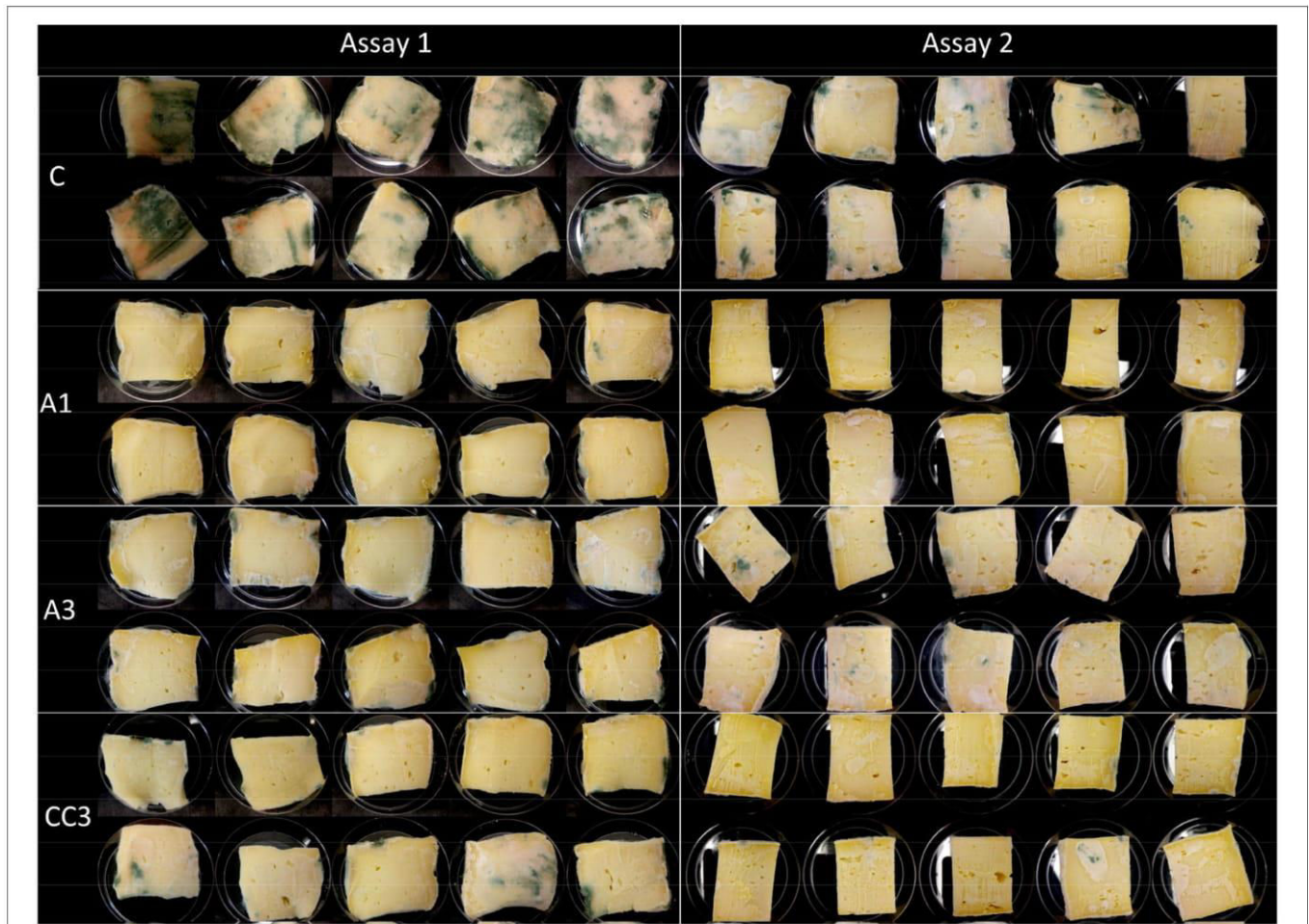


**FIGURE 4 |** Photographs showing sour cream surfaces exposed to natural contamination by environmental fungi followed by incubation for 10 days at 10°C. Cream with no antifungal agent (C), and antifungal cultures A1, A3, and X1 (X1 = reference culture, for details see the Materials and Methods section). Inoculation levels are expressed in CFU/mL and contaminated samples are highlighted in red.

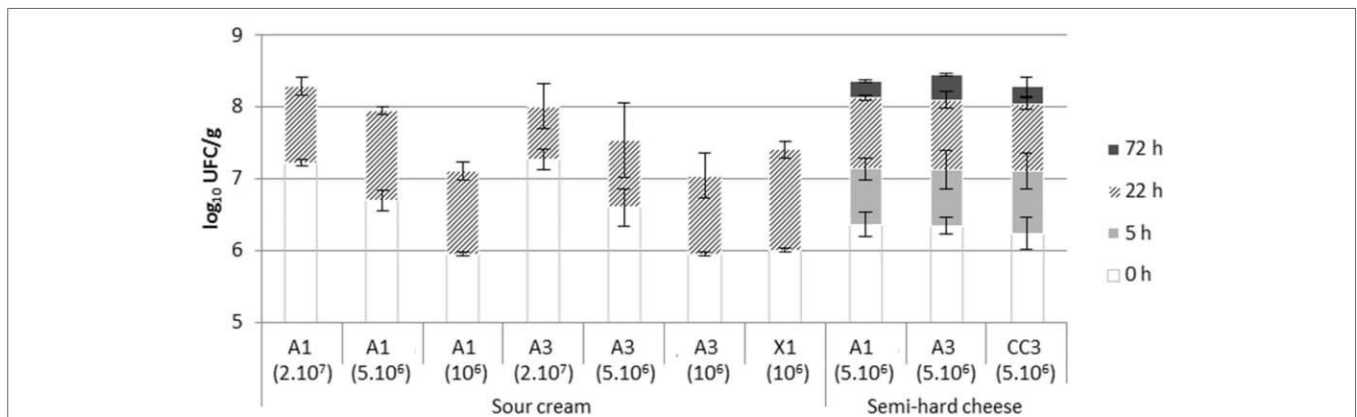
Lay et al. (2016b) showed that the number of LAB active in bakery products was significantly lower than that observed on MRS and WFH media. In order to avoid this bottleneck, in this study, two media closely related to actual dairy products were chosen, a cheese-mimicking model previously developed by Garnier et al. (2018) and yogurt adapted to high-throughput screening in this

study. They were both relevant to the final purpose of developing antifungal cultures compatible with various dairy technologies. The use of this screening method allowed preparing more than 5,000 miniaturized yogurts and model cheeses required to test the antifungal candidates, in the presence of different commercial starters, against up to 10 fungal targets. A difference





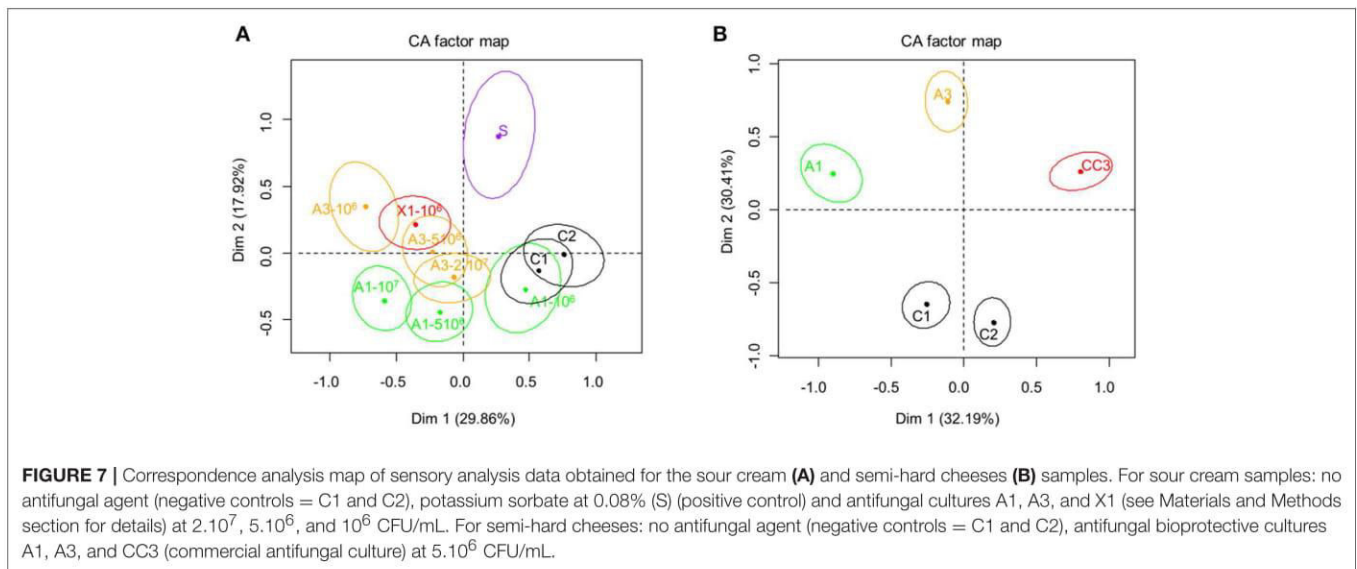
**FIGURE 5 |** Photographs showing semi-hard cheese slices exposed to natural contamination by environmental fungi followed by incubation for 10 days at 10°C. Cheeses with no antifungal agent (Control) and antifungal cultures A1, A3, and CC3 (commercial antifungal culture) at  $5 \cdot 10^6$  CFU/mL.



**FIGURE 6 |** Populations of antifungal bacteria (A1, A3, X1, or CC3, see Materials and Methods section for details) inoculated at  $2 \cdot 10^7$ ,  $5 \cdot 10^6$ , and  $10^6$  CFU/mL in sour cream and semi-hard cheese at inoculation time (0 h) and at the end of fermentation (22 h) and, for cheese only, after curd press (5 h) and smear treatment (72 h).

of antifungal activity was observed between the two dairy models, thus demonstrating the importance of matrix (composition) and production condition (time of incubation, temperature).

No significant impact of the 5 commercial starters tested in yogurt and cheese models was observed on the antifungal activity. This suggested low interaction (metabiosis) between the starter



cultures and the antifungal adjunct cultures. The choice of fungal targets is also crucial as they should be representative of contaminants in terms of occurrence and biodiversity. In this study, fungal target strains were selected from contaminated dairy products (Garnier et al., 2016) among species known as frequent contaminants in dairy products (Pitt and Hocking, 2009). Noteworthy, in the present study, the 4 fungal targets used for the screening steps were more resistant, in particular *G. geotrichum* and *Y. lipolytica*, than the 6 additional fungi used during the activity spectrum evaluation. In agreement with our observations, the two latter species were reported to be more resistant to chemical preservatives than other fungal species, e.g., for *G. geotrichum* and *Y. lipolytica* strains, the minimal inhibitory concentration of potassium sorbate at pH 5 in PDA was 1 g/L in contrast to 0.3 g/L for *P. commune* (Garnier et al., 2016). Similarly, the antifungal activity of LAB strains against cereal and bakery fungal contaminants was reported to differ for all the tested fungal targets (Inglis et al., 2015; Le Lay et al., 2016b; Russo et al., 2017).

The tested *Lactobacillus* strains globally showed the highest antifungal activity in one or both of the dairy models, compared to *Leuconostoc* and *Propionibacterium* strains, even if the activity was strain-dependent within the species, as expected. Many *Lactobacillus* species have been previously reported to exhibit antifungal activity in dairy products. For example, in yogurt, several authors showed that various strains belonging to the *L. harbinensis*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* or *L. casei* species were active against *Penicillium* spp., but also, for some of them, against *D. hansenii*, *K. lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *R. mucilaginosa*, and *Y. lipolytica* (Delavenne et al., 2013, 2015; Li et al., 2013; Aunsbjerg et al., 2015). In cottage and cheddar cheese, different studies showed that *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* and *L. rhamnosus* strains showed antifungal activity against *Penicillium* spp. (Cheong et al., 2014; Lynch et al., 2014; Fernandez et al., 2017). Assessment of the antifungal activity of 13 LAB strains toward 3 ochratoxin A-producing fungi in synthetic

media showed that *L. plantarum* B4496, *L. brevis* 207 and 3 other LAB strains inhibited the tested fungal targets (Ngang et al., 2015). The lower antifungal activities observed for *Leuconostoc* and *Propionibacterium* strains, despite their reported capacity to produce antifungal organic acids, could result from their inability to reach high populations under the screening conditions (i.e., incubation for 4–6 h at 42°C in yogurt and for 72 h at 20°C in cheese). *Leuconostoc* spp. optimally grow at temperatures ranging between 20 and 30°C (Martley and Crow, 1993; Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004). This aspect may explain the low antifungal activity of *Leuconostoc* strains observed in the present study in yogurt. Concerning *Propionibacterium* spp., their slow growth rate can explain their low activity observed. The generation time of *P. freudenreichii* is around 5–9 h under optimal conditions, i.e., in a complex laboratory medium at 30°C (Thierry et al., 2002), and 15–30 h in cheese and cheese juice at 24°C (Salvat-Brunaud et al., 1997). Antibiosis, via the production of antifungal molecules, and pH decrease are the main factors contributing to LAB and PAB antifungal activity in foods (Leyva Salas et al., 2017). The production of antifungal compounds (e.g., lactic, acetic, succinic, propionic, formic, and butyric acids) by lactobacilli and pediococci strains was shown to vary significantly depending on the medium (Özcelik et al., 2016). There are only few studies concerning the antifungal activity of *Leuconostoc* compared to those concerning *Lactobacillus* spp. and most of them were performed *in vitro*. For example, two *L. citreum* strains were shown to inhibit fungal contaminants of bakery products (Valerio et al., 2009; Baek et al., 2012; Le Lay et al., 2016b).

The binary combinations A1 and A3 showed the same broad spectrum as their constituting strains grown in pure cultures. They increased the time to visible growth of fungal targets in one third of cases (inhibition tested for 2 combinations, at 2 inoculations levels against 10 fungal targets in two dairy models). Some previous studies performed in different media also reported an improvement of the antifungal activity of binary combinations of strains, compared to pure cultures. This was



**TABLE 3** | Descriptors cited at a significantly ( $p < 0.2$ ) higher frequency between sour creams (assay 1).

Sample	Inoc.	Descriptors	Intern %	p-value	
Control 1	–	Tasteless	7.8	0.04	
		Odorless	6.3	0.06	
		Mild flavor	12.5	0.11	
Control 2	–	Mild flavor	13.4	0.05	
A1	2.10 <sup>7</sup>	Acidic	23.4	0.03	
		After-taste	3.1	0.16	
	5.10 <sup>6</sup>	Lactic	6.2	0.14	
		10 <sup>6</sup>	Lactic	15.2	0.02
A3	2.10 <sup>7</sup>	Nutty after-taste	3.0	0.17	
		Slightly acidic	6.0	0.18	
	5.10 <sup>6</sup>	Balanced	3.2	0.10	
		10 <sup>6</sup>	Very acidic	11.5	0.04
		Pungent	11.5	0.09	
X1	10 <sup>6</sup>	Acidic	21.3	0.10	
		Pronounced flavor	1.6	0.19	
		Mild flavor	3.3	0.15	
		Sour cream	1.6	0.19	
S	–	Acidic	19.7	0.20	
		Sweet	3.1	0.02	
		Different after-taste	3.1	0.10	
		Different taste	3.1	0.16	
		Cheese flavor	1.6	0.20	

Control 1 and 2, same sample, sour creams with no antifungal culture. A1, A3, and X1, sour cream inoculated with the antifungal cultures A1, A3, and X1 (X1 = reference culture, for details see the Materials and Methods section), S, Sour cream with no antifungal culture and 0.08% of potassium sorbate, Inoc., Inoculum of the antifungal culture (CFU/mL), Intern %, Percent of frequency for each descriptor inside the group. Descriptors were translated from french to english, for more details go to **Supplementary Table 1**.

the case for example for combinations of *L. paracasei* subsp. *paracasei* SM20 and *P. jensenii* SM11 *in vitro* (Schwenninger and Meile, 2004), *P. thoenii* P-127 and either *L. rhamnosus* B-445 or *L. plantarum* DSA 20174 in Kareish cheese (El-Shafei et al., 2008), and *L. rhamnosus* A238 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A026 in cottage cheese (Fernandez et al., 2017). The WO2012136830A1 patent applicable to yogurt reported that binary combinations (*L. paracasei* CHCC12777 and *L. rhamnosus* CHCC12697 or *L. paracasei* CHCC12777 and *L. rhamnosus* CHCC14226) were more effective than either of the strains alone (Hornbaek et al., 2014). We hypothesized that the improvement of the antifungal activity of binary combinations consisting of *L. plantarum* L244 combined with either *L. harbinensis* L172 (A1), or *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 (A3) observed in this study was due to a higher quantity and diversity of the antifungal compounds produced compared to single strains, because it is known that antifungal compounds act in synergism and that *Lactobacillus* spp. produce various antifungal compounds (Crowley et al., 2013; Aunsbjerg et al., 2015; Le Lay et al., 2016a). Despite the fact that the A1 and A3 combinations most generally did not improve the antifungal activity to a great extent compared to the corresponding strains, we expect that using a combination of strains rather than a single

**TABLE 4** | Descriptors cited at a significantly ( $p < 0.2$ ) higher frequency between semi-hard cheese inoculated with antifungal combinations A1, A3 and commercial antifungal culture CC3 at 5.10<sup>6</sup> CFU/mL and the non-inoculated control semi-hard cheeses (Control 1 and 2).

Sample	Descriptors	Intern %	p-value
Control 1	Tasteless	14.05	0.07
Control 2	Tasteless	16.36	0.01
	Not melting	1.82	0.16
A1	Some holes	1.69	0.07
	Bitter taste	1.69	0.07
	Pungent	5.08	0.09
	Odorless	2.54	0.10
	Acidic	4.24	0.15
A3	No significantly different descriptors		
CC3	Smooth texture	1.89	0.03
	Slightly acidic	4.40	0.05
	No holes	1.26	0.13
	Melting	1.26	0.13
	Firm texture	2.52	0.14

Control 1 and 2, same semi-hard cheese sample with no antifungal culture. A1, A3, and CC3, semi-hard cheese inoculated with antifungal cultures A1, A3, and CC3 (CC3, commercial antifungal culture). Intern%, Percent of frequency for each descriptor inside the group. Descriptors were translated from french to english, for more details go to **Supplementary Table 1**.

strain would increase the technological flexibility and the chance to see at least one of the strain expressing its antifungal activity in a diversity of conditions.

The *in vitro* screening and the challenge-tests performed in the present study are a worst case contamination scenario because 50 fungal spores were inoculated due to practical constraints, far above a natural contamination generally due to 1–2 contaminant spores. Moreover, cream was incubated at 10°C instead of 4°C as usually recommended for storage. Taken together, these aspects suggest that the antifungal activity could be even higher in real conditions, as strongly suggested by the shelf life test results. In sour cream, A1 and A3 combinations showed a bioprotective activity against natural fungal contaminants at all tested inoculum levels even the lowest (10<sup>6</sup> CFU/mL). This demonstrated the robustness of the strategy applied in this work. There are only few reports comparing the antifungal activity of bioprotective cultures in both challenge-test and natural contamination in real products (shelf life test). A study on the antifungal activity of 2 *L. amylovorus* strains used as adjunct cultures in miniature Cheddar cheese showed that the 10<sup>3</sup> spores inoculated of *P. expansum* were inhibited for 1–4 days, while the airborne contaminants were inhibited for 6 days (Lynch et al., 2014). Some studies showed the effectiveness of LAB *in situ* against natural contaminants, e.g., *L. amylovarus* DSM1928 active in wheat, gluten-free and quinoa bread (Axel et al., 2015, 2016a,b), a semi-liquid bio-preserver (SL778) developed from *L. plantarum* CRL 778 in bread (Gerez et al., 2015), and fermentates of *P. jensenii* and *L. rhamnosus* in sour cream and semi-hard cheeses (Ganier et al. submitted).



Some of the constraints related to the potential use of bioprotective cultures (Leyva Salas et al., 2017) were also considered in this study, including safety, sensory and economic constraints (level of inoculation). From *in vitro* tests in dairy products to the scale up in sour cream and semi-hard cheese work, we designed the study to reduce the gap often observed between the antifungal activity *in vitro* and *in situ*. Concerning the safety of the strains to be used as adjunct cultures, although lactobacilli are not known as pathogens, it is necessary to follow a rigorous safety assessment procedure, taking multiple criteria into account. Recently, biogenic production and antibiotic resistance pattern was studied in some of the strains used in this study (Coton et al., 2018). In the latter study, *L. brevis* L128 was identified as a biogenic amine-producer, which precludes its use as a potential bioprotective culture, and led us to exclude the A2 and A4 combinations including this strain, despite its high antifungal activity. Beyond the latter activity, it is crucial to evaluate the impact of the adjunct cultures on the sensory properties of the treated dairy products. The sensory proximity of the creams with the reference culture X1 and the creams with A1 and A3 suggests that the selected combinations could also be used without a marked adverse impact on cream sensory properties. Concerning the more acid flavor reported by the judges in the creams containing A1 and A3, it could be linked to a post-acidification increase compared to the products without adjuncts. Similarly, some commercial antifungal cultures used as antifungal in dairy products are known to increase post-acidification, especially when the products are stored at ambient temperatures (Nielsen et al., 2017). Despite organoleptic differences and post-acidification at high inoculum levels, the dairy products containing the antifungal combinations were still acceptable by the judges.

The minimal efficient inoculum concentration is important from an economic point of view. An initial concentration of  $10^7$  CFU/mL (i.e.,  $5.10^6$  CFU/mL of each strain) was efficient in both models from this work. In another study in yogurt, it was demonstrated that an inoculum level of  $10^5$  CFU/mL of *L. harbinensis* K.V9.3.1Np was necessary to get an antifungal activity, but  $5.10^6$  CFU/mL was required for a total inhibition (Delavenne et al., 2015). To explain the variation in the antifungal activity of A1 observed in sour cream at the lowest inoculation level,  $10^6$  CFU/mL, we can hypothesize that a minimal limit of population at the moment of contamination is required to express an inhibitory effect. A similar phenomena was reported in yogurt as to inhibit *Y. lipolytica* by *L. harbinensis*

K.V9.3.1Np,  $2.5-3.10^6$  CFU/g of *L. harbinensis* were necessary at the moment of contamination (Delavenne et al., 2015). The authors suggested an all-or-nothing mechanism (no inhibition below organic acid MICs and total inhibition above), and a quorum sensing regulatory mechanism as in bacteriocin-production by LAB. The fact that, for a same antifungal culture, a variable antifungal activity occurred between semi-hard cheese assays also suggests a role of biotic and abiotic factors resulting from interactions between the food, the antifungal cultures and the fungal contaminants (Leyva Salas et al., 2017). The potential influencing factors include the dry matter content in cheeses, ripening chamber humidity, interactions between the smear and the fungi, and non-sterility of the ripening chambers.

This study presents an effective approach from *in vitro* screening to *in situ* application to develop antifungal combinations with high antifungal activity and broad spectrum, by covering different aspects that limit the entrance of bioprotective cultures to the market. The two selected binary combinations (i.e., A1 and A3) are good candidates for the antifungal biopreservation of dairy products.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

EC, AT, JM, FV, and MLS designed the experiments. MLS and ML performed *in vitro* experiments. GG, MH-O, MC, and MLS performed scale pilot experiments. SL contributed to the conception and data analysis of the sensory evaluations. MLS, AT, and EC wrote the manuscript. EC, AT, JM, and FV supervised the project. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Conseils Régionaux de Bretagne and des Pays de la Loire, France (grants N°13008651 and N°2014-01081, respectively) in the framework of the PROFIL interregional project under the scientific coordination of INRA (J. Leonil) and managed by the Bretagne Biotechnologie Alimentaire (BBA) industrial association.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01787/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Aunsbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., et al. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 46–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2016a). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol.* 239, 86–94. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., et al. (2016b). Antifungal activities of three different *Lactobacillus* species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1701–1711. doi: 10.1007/s00253-015-7051-x
- Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., et al. (2015). Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol.* 47, 36–44. doi: 10.1016/j.fm.2014.10.005
- Baek, E., Kim, H., Choi, H., Yoon, S., and Kim, J. (2012). Antifungal activity of *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*



- in rice cakes. *J. Microbiol.* 50, 842–848. doi: 10.1007/s12275-012-2153-y
- Batish, V. K., Roy, U., Lal, R., and Grower, S. (1997). Antifungal attributes of lactic acid bacteria - a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 209–225. doi: 10.3109/07388559709146614
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
- Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., et al. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46, 91–97. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.011
- Coton, M., Lebreton, M., Leyva Salas, M., Garnier, L., Navarri, M., Pawtowski, A., et al. (2018). Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. *Int. Dairy J.* 85, 21–26. doi: 10.1016/j.idairyj.2018.05.001
- Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi: 10.1016/j.tifs.2013.07.004
- Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J., and Le Blay, G. (2013). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* 30, 206–213. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.06.043
- Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., and Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 185–190. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003
- El-Shafei, K., Mam, A. E. G., Dabiza, N., Sharaf, O. M., and Effat, B. A. (2008). A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* P-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in Kareish cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58, 433–441. Available online at: <https://journal.pan.olsztyn.pl/fd.php?f=1095>
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., and Fliss, I. (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control* 78, 350–356. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.007
- Fröhlich-Wyder, M. T., Bisig, W., Guggisberg, D., Jakob, E., Turgay, M., and Wechsler, D. (2017). “Cheeses with propionic acid fermentation,” in *Cheese* (Bern: Elsevier), 889–910.
- Fuselli, F., Guarino, C., La Mantia, A., Longo, L., Faberi, A., and Marianella, R. M. (2012). Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 906, 9–18. doi: 10.1016/j.jchromb.2012.07.035
- Garnier, L., Leyva Salas, M., Pinon, N., Wiernasz, N., Pawtowski, A., Coton, E., et al. (2018). Technical note: high-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *J. Dairy Sci.* 101, 4971–4976. doi: 10.3168/jds.2017-13518
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., et al. (2016). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 191–197. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026
- Gerez, C. L., Fornaguera, M. J., Obregozo, M. D., Font de Valdez, G., and Torino, M. I. (2015). Antifungal starter culture for packed bread: influence of two storage conditions. *Rev. Argent. Microbiol.* 47, 118–124. doi: 10.1016/j.ram.2015.02.002
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., and Garde, S. (2016). Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 103–110. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031
- Hartemink, R., Domenech, V. R., and Rombouts, F. M. (1997). LAMVAB—a new selective medium for the isolation of Lactobacilli from faeces. *J. Microbiol. Methods* 29, 77–84. doi: 10.1016/S0167-7012(97)00025-0
- Hemme, D., and Foucaud-Scheunemann, C. (2004). Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14, 467–494. doi: 10.1016/j.idairyj.2003.10.005
- Hornbaek, T., Lisberg, M., and Diemer, S. K. (2014). *Synergistic Antimicrobial Effect*. U.S. Patent Application No. 14/110,388 1. U.S. Patent and Trademark Office.
- Inglin, R. C., Stevens, M. J. A., Meile, L., Lacroix, C., and Meile, L. (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114, 26–29. doi: 10.1016/j.mimet.2015.04.011
- Ledenbach, L. H., and Marshall, R. T. (2009). “Microbiological spoilage of dairy products,” in *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, eds W. H. Sperber, and M. P. Doyle (New York, NY: Springer), 41–67.
- Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J. M., Haertlé, T., Choiset, Y., et al. (2016a). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 239, 79–85. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., et al. (2016b). *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control* 60, 247–255. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.034
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.004
- Lê, S., and Worch, T. (2014). *Analyzing Sensory Data with R, 1st Edn*. Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC Press.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms* 5:E37. doi: 10.3390/microorganisms5030037
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., and Lv, J. (2013). Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control* 34, 675–680. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.023
- Lynch, K. M., Pawlowska, A. M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., et al. (2014). Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 34, 167–173. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.07.017
- Martley, F. G., and Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3, 461–483. doi: 10.1016/0958-6946(93)90027-W
- Ngang, J. J. E., Yadang, G., Kamdem, S. L. S., Kouebou, C. P., Fanche, S. A. Y., Kougan, D. L. T., et al. (2015). Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin A producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Sci. Technol.* 25, 245–259. doi: 10.1080/09583157.2014.969195
- Nielsen, C. L. M., Hornbaek, T., Rasmussen, P., and Poulsen, L. (2017). *Lactobacillus fermentum* Bacteria Inhibiting Post-acidification. World Intellectual Property Organization Patent Application No. WO2017037052A1. U.S. Patent and Trademark Office.
- Özcelik, S., Kuley, E., and Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT Food Sci. Technol.* 73, 536–542. doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.066
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: Springer.
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., and Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: a promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 48–54. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027
- Salvat-Brunaud, D., Thierry, A., and Maubois, J. L. (1997). Development of a medium simulating emmental juice for propionibacteria growth. *J. Dairy Res.* 64, 573–580. doi: 10.1017/S0022029997002410

- Schwenninger, S. M., and Meile, L. (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 229–237. doi: 10.1078/072320204322881853
- Silva, M., and Lidon, F. (2016). Food preservatives - an overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric.* 28, 366–373. doi: 10.9755/ejfa.2016-04-351
- Stark, J., and Tan, H. S. (2003). "Natamycin," in *Food Preservatives*, eds N. J. Russell and G. W. Gould (Boston, MA: Springer), 179–195.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345. doi: 10.1007/BF00395940
- Thierry, A., Maillard, M. B., and Yvon, M. (2002). Conversion of L-Leucine to isovaleric acid by *Propionibacterium freudenreichii* TL 34 and ITGP23. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 608–615. doi: 10.1128/AEM.68.2.608-615.2002
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S., and Lavermicocca, P. (2009). Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 438–448. doi: 10.1016/j.syapm.2009.01.004

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer GT and handling Editor declared their shared affiliation at the time of the review.

Copyright © 2018 Leyva Salas, Thierry, Lemaître, Garric, Harel-Oger, Chatel, Lè, Mounier, Valence and Coton. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Supplementary 1. Descriptors used by the jury during the sensory evaluation

<b>Translation</b>	<b>Original descriptors (French)</b>
acidic	acide
after-taste	arrière-goût
balanced	équilibré
bitter taste	arrière-goût amer, amer
cheese flavor	goût fromage
different after-taste	arrière-goût différent
different flavor	goût différent
firm texture	ferme, texture compacte
melting	fondant en bouche
mild flavor	goût doux, goût faible
lactic	lactique
no holes	pas d'ouvertures
not melting	manque de fondant
nutty after-taste	arrière-goût noisette
odorless	odeur neutre
pronounced flavor	goût marqué, goût prononcé
pungent	piquant
slightly acidic	légèrement acide
smooth texture	texture lisse
a few holes	peu d'ouvertures, peu de trous
sour cream flavor	type crème fraîche
sweet	sucré
tasteless	fade, goût neutre, peu de goût, peu goûté, goût neutre, pas très goûté

- **Résultats majeurs**

- i. Criblage de l'activité antifongique**

L'activité antifongique d'une sélection de 32 souches bactériennes appartenant à 12 espèces des genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Propionibacterium*, issues des collections du LUBEM, de la collection de culture de l'Université de Bretagne Occidentale (UBOCC) et du Centre International de Ressources Microbiennes - Bactérie d'Intérêts Alimentaires (CIRM-BIA), a été criblée dans deux modèles laitiers (Tableaux 1 de l'article 3). Ces souches ont été sélectionnées selon trois critères : i) une diversité d'espèces connues pour leur potentiel antifongique, ii) la possibilité d'application comme levains additionnels en technologie laitière, mais également iii) sur la base de précédents travaux de criblage réalisés en tant que fermentats (Garnier et al., 2018).

La méthode de criblage à haut débit dans le modèle fromage a été développée pour l'évaluation de l'activité antifongique de bactéries lactiques pour la bioprotection de produits laitiers sous formes de i) fermentats (fermentation d'un substrat laitier par des bactéries lactiques), ii) de ferments additionnels et iii) de métabolites purifiés. Cette méthode de criblage pour évaluer des ferments additionnels a fait l'objet d'un article publié sous forme de « *Technical Note* » dans la revue « *Journal of Dairy Science* » (**Article 3** en annexe de cette Partie 1) et les résultats de l'activité antifongique de certaines souches de cette Partie 1 en tant que ferments y sont présentés. Ce travail a montré que les bactéries lactiques qui présentaient une activité en tant que fermentat présentaient également une activité lorsqu'elles étaient utilisées directement comme ferment. L'effet antifongique des souches ajoutées comme ferments est supérieur dans 73% des cas (n=44) à celui des fermentats des souches correspondantes (Tableau 1 - Article 3).

Dans ce travail de thèse, nous avons étendu la méthode haut-débit de criblage de l'activité antifongique à la matrice « yaourt » afin d'évaluer l'effet « matrice ». Cette méthode de criblage dans 2 matrices laitières a permis d'évaluer l'activité antifongique des souches sélectionnées à différents niveaux d'inoculum, en présence de divers ferments acidifiants, en combinant des souches par 2 et 3, et en testant plusieurs cibles fongiques.

L'évaluation de l'activité antifongique en présence de différents ferments acidifiants a montré un faible effet du ferment acidifiant sur l'activité antifongique. Au contraire, les résultats ont montré un impact significatif de la matrice (modèle fromage et yaourt) qui pourrait être lié à différents paramètres comme le couple temps/température d'incubation, le pourcentage de



matière grasse, le pH et le levain technologique. Dans les conditions testées, les souches du genre *Leuconostoc* et *Propionibacterium* ont présenté une faible activité antifongique, pouvant s'expliquer par une croissance plus lente comparativement aux souches de *Lactobacillus* spp. Concernant les cibles fongiques, toutes ont été inhibées, même si les effets pouvaient se montrer contrastés, les champignons filamenteux *M. racemosus* et *P. commune* se sont avérés être plus sensibles que les levures testées. Cinq souches de lactobacilles, *L. plantarum* CIRM-BIA1113 et CIRM-BIA1112, *L. rhamnosus* L244, *L. brevis* L128 et *L. harbinensis* L172, considérées comme les plus efficaces et présentant un large spectre d'activité sur les deux matrices, ont été retenues pour évaluer l'intérêt de combiner des souches.

## **ii. Combinaison des souches**

L'évaluation de l'activité antifongique de 13 combinaisons binaires et ternaires, à partir des 5 souches sélectionnées dans la première étape, a permis de sélectionner 3 combinaisons binaires avec une activité antifongique égale voire supérieure à celle des cultures commerciales sélectionnées comme référentiel. Ces 3 combinaisons binaires correspondent à *L. plantarum* L244 combiné soit à *L. harbinensis* L172 (combinaison A1), soit à *L. brevis* (combinaison A2), soit à *L. rhamnosus* (combinaison A3). Ces 3 combinaisons ont montré un spectre d'activité contre 10 cibles fongiques analogue en comparaison avec les souches constituant ces combinaisons, mais une inhibition plus marquée en combinaison (Tableau 2 de l'article 2). Ces combinaisons ont été choisies selon différents critères : i) réduction du nombre de cultures à tester *in-situ*, ii) activité antifongique supérieure à celle des cultures pures correspondantes, iii) inhibition au moins égale à celle des cultures antifongiques commerciales et iv) diversité d'espèces pour l'adaptabilité aux technologies en termes de viabilité d'au moins une des souches de la combinaison. Les populations minimales à inoculer pour observer une activité inhibitrice variaient entre  $10^6$  et  $2.10^7$  UFC/mL selon les cibles fongiques, les combinaisons et la matrice laitière.

## **iii. Application des cultures antifongiques *in situ***

La combinaison A2 a été écartée pour l'application *in situ* à l'échelle pilote car la souche *L. brevis* L128, présente dans cette combinaison, possède des gènes impliqués dans les voies de production des amines biogènes, tyramine (*tyrdc*) et putrescine (*agdi*). Cette partie de l'étude portant sur l'évaluation de l'innocuité des souches des combinaisons sélectionnées dans la première étape du criblage *in vitro* (et d'autre souches qui ne font pas partie des résultats de

cette thèse) ont fait l'objet de l'**Article 4** « *Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a Propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures* » placé en annexe de cette première partie.

Les cultures A1 et A3 ont donc été ajoutées en tant que ferments additionnels pendant la production à l'échelle pilote de crème fraîche et de pâte pressée à croûte morgée, en comparaison avec des cultures antifongiques commerciales, et le sorbate et la natamycine comme références de conservateurs chimiques antifongiques. Les combinaisons A1 et A3 ont été ajoutées à 3 niveaux d'inoculum dans la crème fraîche dû à la facilité de fabrication de cette matrice comparée à celle du fromage à pâte pressée pour lequel un seul inoculum a été testé (inoculum recommandé pour la culture commerciale). Ces produits ont été caractérisés par des tests d'activité antifongique (challenge tests contre des cibles inoculées et tests d'usage), des analyses microbiologiques (ferment acidifiant et cultures antifongiques), biochimiques (suivi du pH, composition, teneur en matière sèche) et sensorielles.

#### ***Application de cultures antifongiques dans la crème fraîche***

L'activité antifongique des cultures sélectionnées a été validée dans la crème fraîche, contre 3 cibles fongiques, *P. commune* UBOCC-A-116003, *M. racemosus* UBOCC-A-116002 et *R. mucilaginosa* UBOCC-A-216004 en challenge test, mais aussi contre des contaminations naturelles ambiantes lors des tests d'usage. La combinaison A1 a montré le plus large spectre d'action. En effet, c'était la seule culture capable d'inhiber totalement la croissance des trois cibles fongiques inoculées et d'inhiber *P. commune* et *R. mucilaginosa* pendant plusieurs jours. A1 a permis un retard de croissance de 1 à 5 jours de *M. racemosus*, de 24 jours de *P. commune* et de 14 jours de *R. mucilaginosa*. L'association A3 n'a pas eu d'effet contre *M. racemosus*, mais a montré une inhibition totale de 2 à 7 jours de la croissance de *P. commune* et de 7 jours de *R. mucilaginosa* au niveau d'inoculation  $> 5.10^6$  UFC/mL. Au niveau de l'inoculum  $10^6$  UFC/mL, l'association A3 a eu un potentiel inhibiteur des cibles fongiques proche de la culture commerciale. Le sorbate, a montré une forte activité antifongique de la même façon que l'association A1 à un niveau d'inoculum  $\geq 5.10^6$  UFC/mL contre *P. commune*. Lors du test d'usage, les cultures bioprotectrices A1 et A3 ont montré une forte inhibition et un large spectre d'action contre des contaminants fongiques naturels, inhibant les 8 espèces fongiques identifiées dans la crème fraîche témoin sans aucun antifongique ajouté.

La viabilité des cultures antifongiques n'a pas été impactée pendant la fabrication de crème fraîche, la population a augmenté d'1 log UFC/g quel que soit son niveau initial dans ces conditions de fabrication. L'absence d'inhibition antifongique n'est pas due donc à l'incapacité des souches à se développer dans ce produit laitier. Ces résultats permettent de conclure que l'association A1 doit atteindre une population supérieure à 7 log UFC/g pour inhiber totalement les trois cibles fongiques testées. Par contre, l'activité antifongique de l'association A3 contre *P. commune* n'était observée que pour une population atteinte de 8 log UFC/g.

Le suivi du pH et le dénombrement des levains ont montré que les cultures antifongiques A1, A3 et commerciale n'impactaient ni la croissance ni la cinétique d'acidification des levains technologiques. Les crèmes fraîche inoculées avec les cultures antifongiques à  $2.10^7$  UFC/mL ont montré une post-acidification plus marquée que les crèmes fraîches sans antifongiques après 4 semaines de stockage à 10°C.

Les analyses sensorielles ont montré que les cultures A1, A3 et la culture commerciale impactaient principalement l'acidité de la crème fraîche, mise à part la culture A1 à un niveau d'inoculation de  $10^6$  UFC/mL.

### ***Application de cultures antifongiques dans la pâte pressée***

Concernant cette seconde matrice, l'activité des cultures antifongiques a été testée en challenge test contre 2 cibles fongiques sélectionnées, *P. commune* UBOCC-A-116003 et *M. racemosus* UBOCC-A-116002. L'inhibition de ces cibles fongiques par les cultures antifongiques et le conservateur chimique de référence était moins marquée qu'en crème fraîche, avec une inhibition maximale de 9 jours observée pour la natamycine contre *M. racemosus*. L'activité antifongique d'A1 était égale voire supérieure à celle de la culture commerciale en inhibant seulement *M. racemosus*, alors qu'A3 était la seule culture bioprotectrice capable d'inhiber *P. commune*. L'activité antifongique observée lors du test d'usage dans des morceaux de fromage affiné 4 semaines a été plus marquée que celle observée lors du challenge test des fromages non-affinés. Les résultats du test d'usage ont montré que les cultures antifongiques A1 et A3 peuvent protéger le fromage contre des contaminants fongiques environnementaux à un niveau similaire à celui de la culture bioprotectrice commerciale testée.

La population des cultures bioprotectrices a augmenté de 2 log UFC/g pendant les 3 premiers jours de fabrication (correspondant aux opérations suivantes : acidification, salage et application de la morge). Ce développement de cultures antifongiques n'a impacté ni la

croissance ni la cinétique d'acidification du ferment acidifiant. Les analyses sensorielles ont montré que les fromages avec les cultures A1, A3 et commerciale ont été perçus comme différents des témoins mais sans affecter leur acceptabilité.

Les résultats montrent également que l'activité antifongique observée peut varier de façon marquée entre fabrications fromagères (Figure 3-Article 2 - et Figures 15 et 16 - Annexe I). Les conditions de fabrication à petite échelle n'ont pas permis de standardiser parfaitement la composition des fromages : i) utilisation d'un matériel ne permettant pas de réguler finement les conditions de fabrication (température lors du travail en cuve, soutirage), ii) affinage effectué dans des armoires réglées à 12°C, 95% d'humidité, choisies pour limiter les contaminations environnementales, mais qui ont induit un dessèchement plus ou moins marqué des fromages au cours de l'affinage. Pour mieux comprendre les facteurs susceptibles d'avoir impacté l'activité antifongique, une ACP a été effectuée en intégrant pour chacune des deux fabrications, différentes variables caractérisant les fromages: pH, matière sèche et population des cultures antifongiques à trois stades : à 22h avant démoulage, à 72h quand les cultures antifongiques ont atteint leur population maximale et au moment de l'inoculation des cibles ; et après 1 semaine d'affinage (ACP, Figure 17- Annexe 1).

Les 2 essais sont séparés sur l'axe 1 de l'ACP qui explique 41,7% de la variance totale. Les fromages E1 se caractérisent par un pH plus élevé et une matière sèche plus faible après 1 semaine d'affinage (en moyenne pH 5,4 versus 5,2 pour E2 et MS 52,9 versus 55,5 pour E2). Les cultures A1 et A3 étaient globalement associés à une population antifongique supérieure à 72 h, et à une inhibition plus marquée de *M. racemosus*, alors que les fromages CC3 et A1 de l'essai 2 étaient associés à une matière sèche élevée après 22 h et à une inhibition plus marquée de *P. commune*.

Par ailleurs, nous avons pu noter que tous les fromages présentaient une contamination environnementale par un champignon identifié comme *Penicillium nordicum*. De plus, les fromages destinés aux tests d'usages affinés dans la même armoire que ceux inoculés avec *P. commune*, ont subi une contamination croisée. Cependant, il est important de noter que malgré les contaminations déjà présentes sur la croûte des fromages et les contaminants environnementaux, 40 à 80% des tranches de fromages (découpées après 4 semaines d'affinage) n'étaient pas contaminées lors du test d'usage contrairement aux tranches des fromages contrôles (Figure 5). La mise en place d'un système de conditionnement sous film ou de flux



d'air stérile aurait permis de mieux contrôler les contaminations mais notre but était d'évaluer l'activité antifongique dans des conditions les plus proches de la réalité.

- ***Impact scientifique***

En conclusion, cette première partie rend compte d'une stratégie performante pour développer des cultures antifongiques efficaces et applicables en tant que ferments additionnels de bioprotection dans des produits laitiers. A partir des données du criblage de l'activité antifongique et des combinaison de souches *in vitro* dans 2 modèles laitiers, nous avons pu valider l'activité antifongique de 2 combinaisons binaires de lactobacilles sur 2 produits laitiers de technologies différentes : la crème fraîche et un fromage à pâte pressée à croûte morgée. Nous avons également pu montrer que l'utilisation de ces cultures antifongiques dans les produits testés n'a pas un impact indésirable. De plus, à partir des données de l'activité antifongique *in vitro* et *in situ*, nous avons pu observer que l'inhibition des cibles fongiques par les cultures sélectionnées varie selon le produit/modèle laitier.

Sur un plan appliqué, les transformateurs laitiers devront donc maintenant évaluer l'utilisation de ces cultures comme seul outil naturel ou comme outil complémentaire selon le produit, et potentiellement adapter leurs fabrications pour permettre l'utilisation de ces cultures. De plus, les producteurs de levains devront également tester et optimiser la préparation de cultures antifongiques : lyophilisation ou congélation, et vérification de la viabilité et de la stabilité des souches après congélation/lyophilisation.

D'un point de vue cognitif, afin de comprendre le mode d'action des cultures antifongiques, il est nécessaire d'identifier les molécules mises en jeu dans l'activité antifongique observée dans les différents produits laitiers. Cet aspect fait l'objet de la deuxième partie de cette thèse.

## **Annexes I**

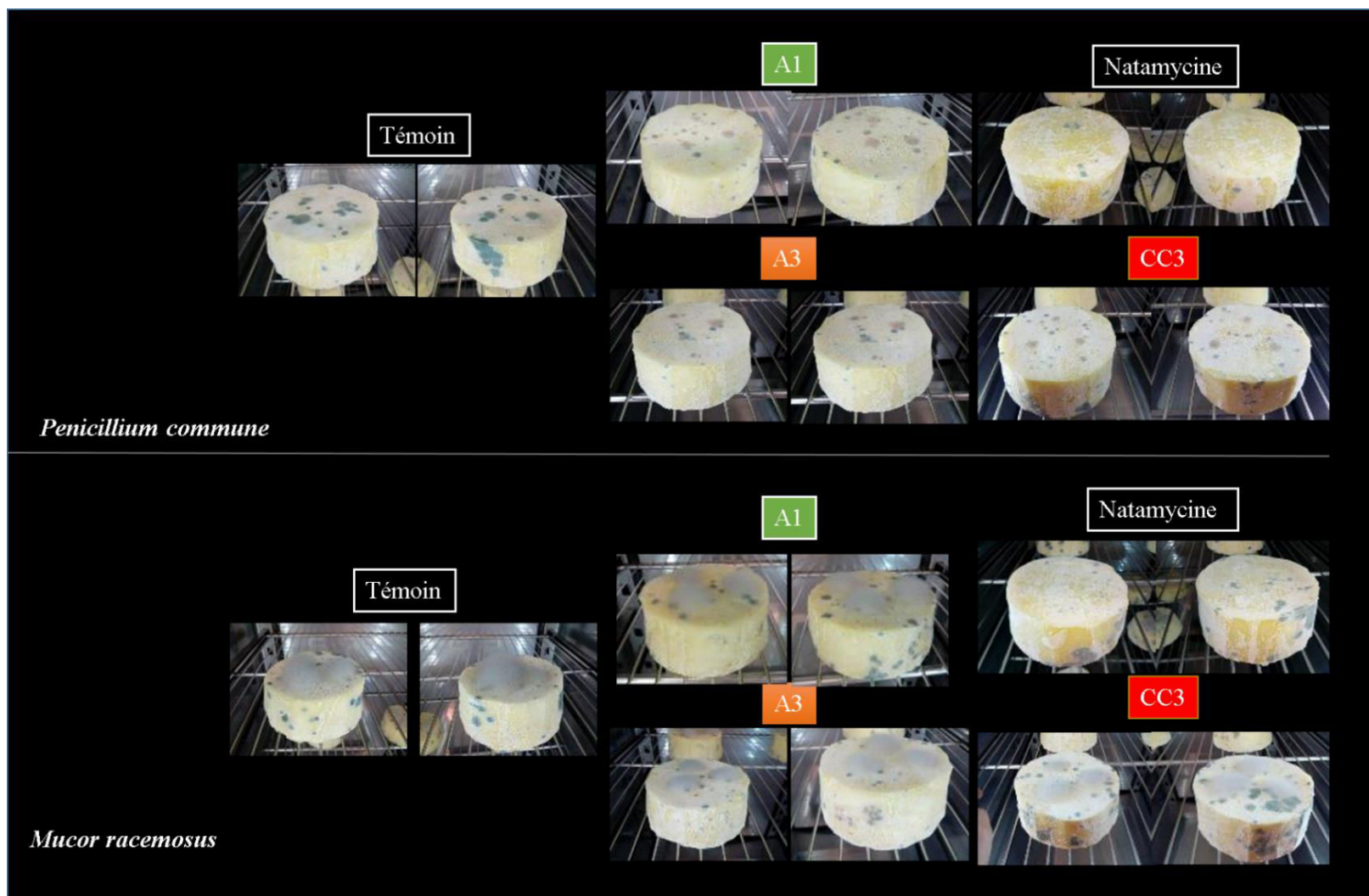


Figure 15. Photos des fromages à pâte pressée contrôles ou avec les cultures antifongiques A1, A3 et CC3, ou le conservateur natamycine inoculés volontairement avec les cibles fongiques *P. commune* et *M. racemosus*. Affinage de 13 jours à 12°C, 95% humidité (Essai 1).

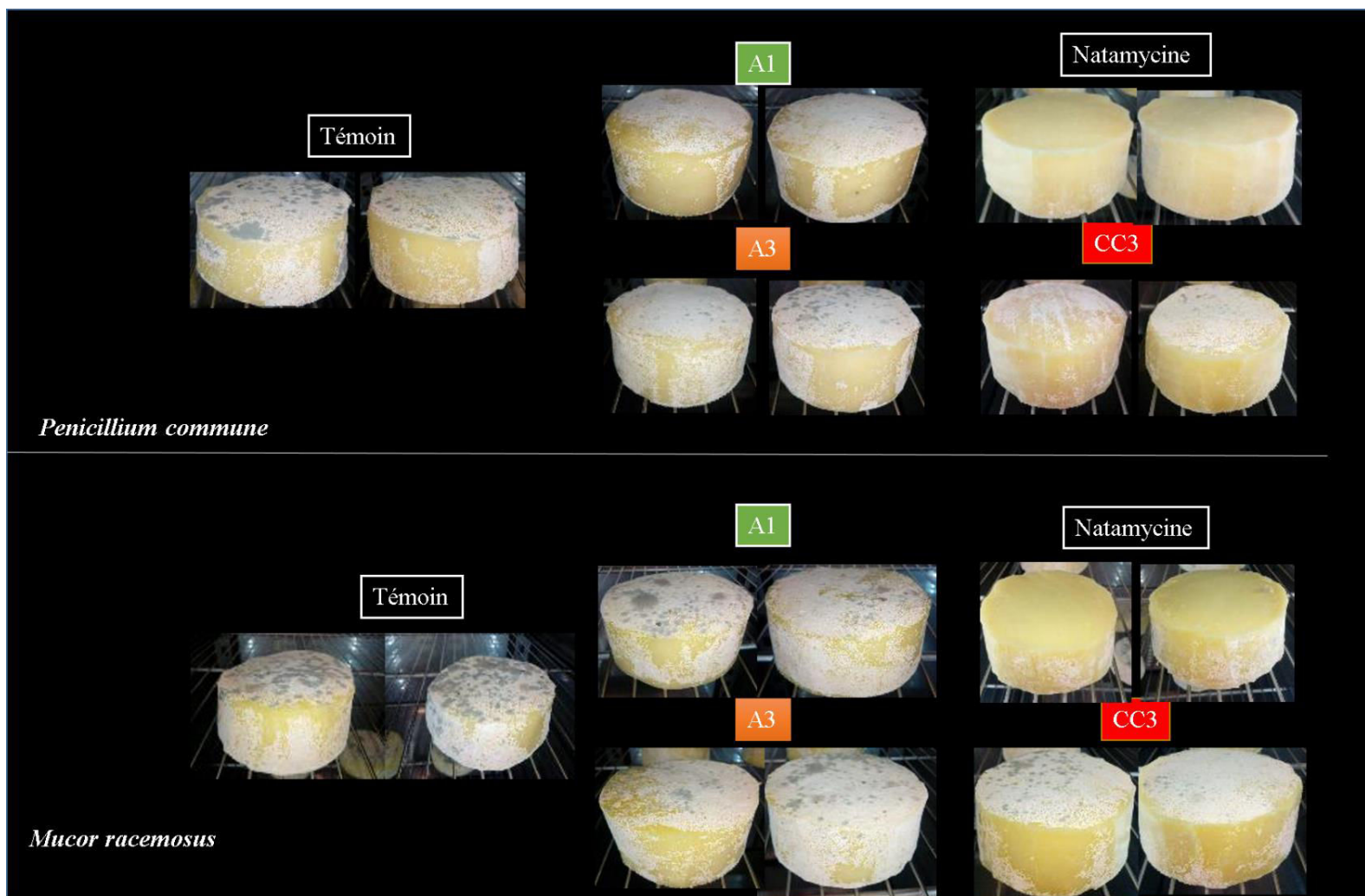
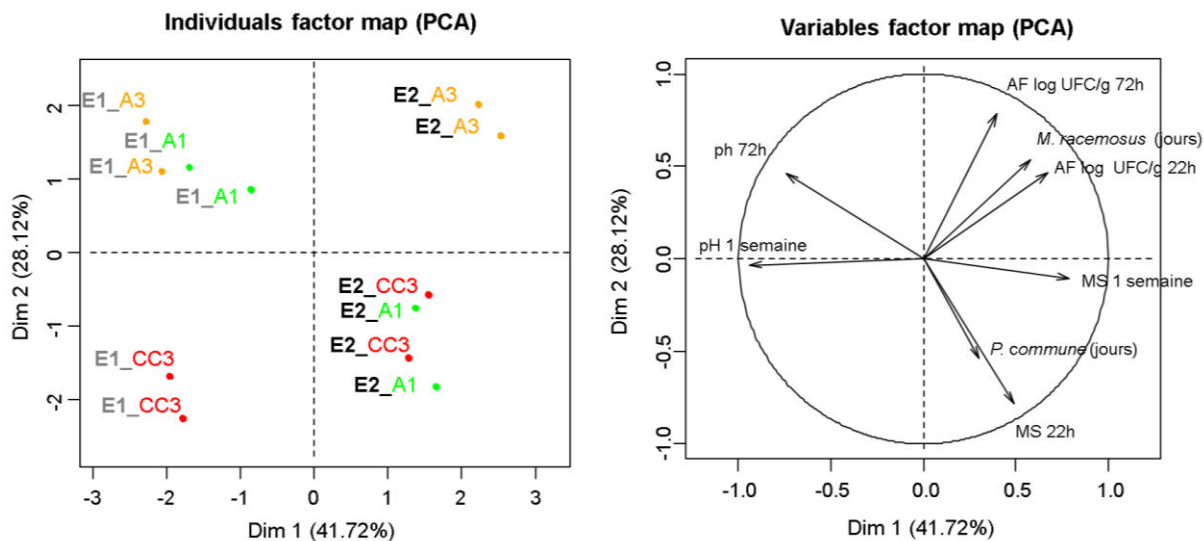


Figure 16. Photos des fromages à pâte pressée contrôlés ou avec les cultures antifongiques A1, A3 et CC3, ou le conservateur natamycine inoculés volontairement avec les cibles fongiques *P. commune* et *M. racemosus*. Affinage de 13 jours à 12°C, 95% humidité (Essai 2).





**Figure 17. Représentation des différences entre deux fabrications de fromages par analyse en composantes principales (ACP) : graphiques des individus et des variables pour les dimensions 1 et 2 de l'ACP. Les individus sont les échantillons des deux essais E1 et E2 de fabrication de fromage à pâte pressée avec les cultures antifongiques A1, A3 et CC3, inoculées à  $5.10^6$  UFC/mL. Les variables correspondent à : population de la culture antifongique après fermentation de 22h et après application de la morge et inoculation des cibles de 72h (AF log UFC/g 22h ou 72h), jours de retard pour *P. commune* et *M. racemosus*, et les pH et matière sèche au début (72h après inoculation des cultures antifongiques) et après 1 semaine d'affinage. Les variables mal représentées sur ce graphique (cosinus carré inférieur à 0,2) ne sont pas montrées.**

## **Annexes II**

### **Article 3**

**Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model**



## Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model

Lucille Garnier,\*† Marcia Leyva Salas,\*† Nicolas Pinon,† Norman Wiernasz,\* Audrey Pawtowski,\* Emmanuel Coton,\* Jérôme Mounier,\* and Florence Valence†<sup>1</sup>

\*Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

†STLO, Agrocampus Ouest, INRA, 35000 Rennes, France

### ABSTRACT

In this study, we developed a high-throughput antifungal activity screening method using a cheese-mimicking matrix distributed in 24-well plates. This method allowed rapid screening of a large variety of antifungal agent candidates: bacterial fermented ingredients, bacterial isolates, and preservatives. Using the proposed method, we characterized the antifungal activity of 44 lactic acid bacteria (LAB) fermented milk-based ingredients and 23 LAB isolates used as protective cultures against 4 fungal targets (*Mucor racemosus*, *Penicillium commune*, *Galactomyces geotrichum*, and *Yarrowia lipolytica*). We also used this method to determine the minimum inhibitory concentration of a preservative, natamycin, against 9 fungal targets. The results underlined the strain-dependency of LAB antifungal activity, the strong effect of fermentation substrate on this activity, and the effect of the screening medium on natamycin minimum inhibitory concentration. Our method could achieved a screening rate of 1,600 assays per week and can be implemented to evaluate antifungal activity of microorganisms, fermentation products, or purified compounds compatible with dairy technology.

**Key words:** high-throughput screening, antifungal activity, cheese model

### Technical Note

Fungal spoilage of dairy products remains a major concern for dairy manufacturers despite the use of preventive and control approaches, including the use of chemical preservatives. Among methods that are increasingly used by industries for microbial contaminant control, biopreservation is gaining increasing attention due to strong societal (Gerez et al., 2013) and legisla-

tive (Fuselli et al., 2012; Stratford et al., 2013) demand for preservative-free products. Biopreservation can be defined as using natural or added microbiota or their antimicrobial compounds to preserve a food product (in terms of safety and quality) and possibly extend its shelf life (Stiles, 1996). Lactic acid bacteria (**LAB**) are well known for their ability to exhibit antifungal activity (Schillinger and Villareal, 2010; Wulijidigen and Taku, 2011; Cheong et al., 2014) and protective cultures containing LAB, such as FreshQ (consisting of *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains; Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) or the HOLDBAC series (consisting of various lactobacilli and propionibacteria; Danisco/DuPont, Madison, WI), are currently used in dairy products for their antifungal properties (Varsha and Nampoothiri, 2016). Recently, Inglin et al. (2015) developed a high-throughput screening method to detect antimicrobial (including antifungal) activities using an agar-spot assay in 24-well plates. This method enabled screening of 2,000 assays per day. However, despite being a useful primary high-throughput screening method for developing protective cultures, this antifungal screening assay used de Man, Rogosa, and Sharpe (**MRS**) agar medium, which can strongly affect expression of antifungal properties and antifungal molecule activity. Indeed, as mentioned in several articles (Stiles et al., 2002; Delavenne et al., 2012; Le Lay et al., 2016), MRS contains acetate, which may reinforce LAB antifungal activity and artificially inflate the number of active isolates. However, assays applied to real food matrices (e.g., dairy product models such as yogurt) can rapidly become labor intensive, thereby reducing the number of isolates that can be screened to detect strains with antifungal activity (Lynch et al., 2014; Delavenne et al., 2015). In addition, these methods do not allow large-scale and rapid screening of antifungal cultures or compounds.

In the present study, we present a high-throughput screening assay for antifungal activity in a cheese-mimicking matrix distributed in a 24-well plate. The

Received July 18, 2017.

Accepted November 30, 2017.

<sup>1</sup>Corresponding author: [florence.valence-bertel@inra.fr](mailto:florence.valence-bertel@inra.fr)



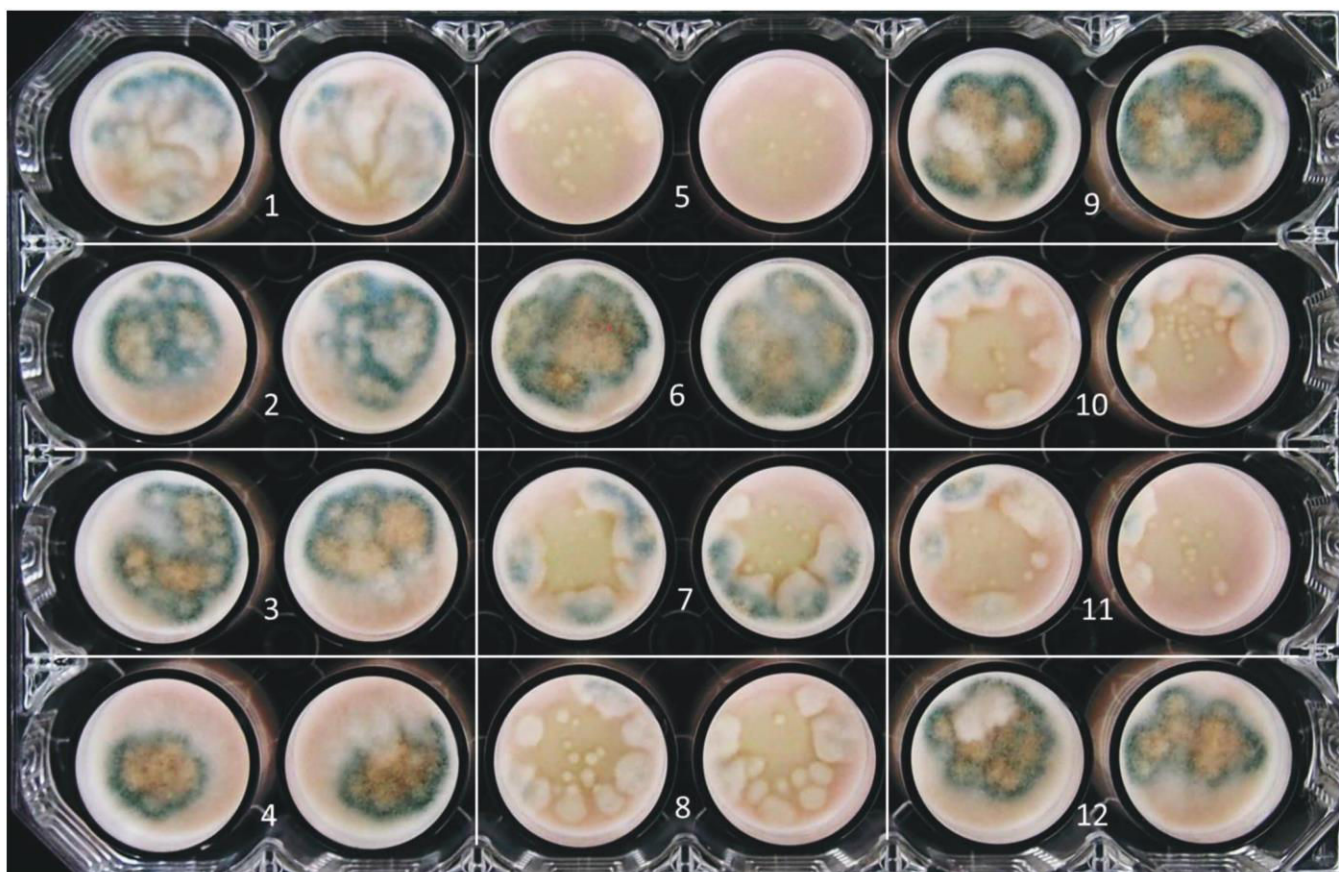
proposed method allowed testing the antifungal activity of a large variety of microbial protective compounds: bacterial fermentation products, bacterial cultures used as adjunct cultures, and purified antifungal preservatives. To prepare the cheese-mimicking matrix, we used a standardized UF milk retentate (3.4×; 244 g/kg of DM, 65.8 g/kg total fat, 116.2 g/kg of total N, pH 6.53) prepared according to Hannon et al. (2006). Briefly, whole raw cow milk was heated to 50°C and skimmed using a cream separator (Westfalia, Handelsweg, the Netherlands). Skim milk was then microfiltered (0.8-µm Sterilox GP membrane, Pall Corp., Port Washington, NY) at 50°C using the pilot equipment GP7 (Brenet, Mamirolle, France) and cream was heat-treated for 2 min at 95°C followed by fat standardization (20 g/kg final concentration). The retentate was ultrafiltered at 0.02 µm at 50°C (T.I.A., Bollene, France) and sterilized sodium chloride (Sogebul, Sainte-Maure de Touraine, France) was added to reach 0.7% (wt/wt). The salted retentate was heat-treated for 2 min at 95°C (Microthermics, Raleigh, NC), distributed in 1-L sterile bottles, and kept at -20°C until use. Before plate preparation, 10 mL/L of a pH indicator (sterile solution of litmus 50 g/L), 10<sup>6</sup> cfu/L of commercial starter MA016 (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *L. lactis* ssp. *lactis*, Elimeca, Thoissey, France), and 1.5 mL/L of 5× diluted and filtered (0.22 µm) rennet (Danisco, Dangé Saint-Romain, France) were added to the thawed retentate. After vigorous homogenization for 1 min, the retentate was distributed into 24-well plates (2 mL/well) and incubated for 1 h at 30°C and then for 3 d at 20°C, leading to the formation of a “mini-cheese” (pH 5) in each well. The exudate was then removed from the surface of each mini-cheese and plates were stored at 12°C until use.

Using this cheese-mimicking matrix, we screened the antifungal activity of 44 LAB fermented milk-based products and 23 LAB isolates used as protective cultures against 4 fungal targets. The LAB were obtained from the culture collections of CIRM-BIA (Centre International de Ressources Microbienne-Bactéries d'Intérêt Alimentaire, Rennes, France) and LUBEM (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Plouzané, France). For fermentation product preparation, a 10%-reconstituted low-heat milk supplemented with 45% anhydrous milk fat and 0.5% litmus (LH medium) was sterilized for 30 min at 110°C. Then, it was individually inoculated with a suspension of the LAB to be tested (1% vol/vol), obtained after 2 subcultures of 24 h at 30°C in MRS broth (Difco, Le Pont de Claix, France). The LH medium inoculated with LAB was then incubated for 20 h at 30°C; 100 µL of the resulting fermentation product was then deposited on the surface of each mini-cheese. After drying

for 2 h at room temperature under laminar air flow, plates were surface inoculated with 1 of 4 fungal targets: *Mucor racemosus* UBOCC-A-116002, *Penicillium commune* UBOCC-A-116003, *Galactomyces geotrichum* UBOCC-A-216001, or *Yarrowia lipolytica* UBOCC-A-216006, which were previously isolated from dairy products (Garnier et al., 2017) and obtained from the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France). Except for yeasts that were first cultured in potato dextrose broth, 10 µL of suspension containing 5 × 10<sup>3</sup> spores or cells/mL, obtained as previously described (Delavenne et al., 2012), was spotted at the center of each mini-cheese (1 tested fungus/plate). Plates were then incubated at 12°C for 5, 6, and 8 d for *M. racemosus*, *G. geotrichum*, and *P. commune* and *Y. lipolytica*, respectively. Antifungal activity was then determined by visually evaluating fungal growth compared with a negative control without any fermentation product (Figure 1). To test the antifungal activity of LAB isolates for potential use as protective cultures, we applied the same methodology except that LAB isolates to be tested were individually suspended in sterilized milk to reach a final concentration of 10<sup>7</sup> cfu/mL of retentate and inoculated concomitantly with the commercial starter MA016, pH indicator, and rennet before distribution in 24-well plates. In this context, 23 LAB cultures were tested in duplicate against the same fungal targets as those described above, after 2 pre-cultures for 24 h at 30°C in MRS broth. Incubation to obtain the mini-cheeses was performed as described above. Plates were then surface-inoculated with 1 of the 4 fungal targets and antifungal activity was evaluated as described above.

All tested fungal species grew well in the cheese-mimicking model (Supplemental Figure S1; <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13518>) and the results obtained for both replicates were similar, confirming the suitability of this matrix to sustain fungal growth and the reproducibility of the screening method. Among the 46 tested LAB fermentation products, 25 showed antifungal activity against at least one fungal target, and 22 out of the 23 tested protective cultures showed antifungal activity against at least one target. More precisely, intermediate antifungal activities against at least one fungal target were observed for 14 (30%) fermentation products and 12 (55%) isolates, whereas complete inhibition against at least one fungal target was only observed for LAB isolates (n = 10; 45%; Table 1). The most active (++ and +++) isolates or fermentation products corresponded to *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides*, and, to a lesser extent, *Lb. rhamnosus*. Antifungal activity varied depending on the utilization mode (protective culture or





**Figure 1.** Visual evaluation of fungal growth to determine antifungal activity. Photograph of a 24-well plate showing the antifungal activity of 11 fermentation products from lactobacilli strains (tested in duplicate) against *Penicillium commune* UBOCC-A-116003 (50 spores/well) in mini-cheeses incubated for 8 d at 12°C. Lactobacilli strains: *Lactobacillus plantarum* L89 (well 1) and L96 (8); *Lactobacillus buchneri* L90 (2); *Lactobacillus reuteri* L91 (3), L92 (4), L94 (6), and L97 (9); *Lactobacillus casei* L95 (7); *Lactobacillus paracasei* L93 (5); and *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA 607 (10) and CIRM-BIA 909 (11) fermentation products; negative control (without fermentation product) (12). No antifungal activity (–) observation in positions 2, 3, 4, 6, 9; weak activity (+) in position 1; intermediate antifungal activities (++) in positions 5, 7, 8, 10, and 11. When complete inhibition was observed, a “+++” score was attributed to the corresponding isolate.

fermentation product). For example, for *Lb. plantarum* strains tested both for their fermentation products and as protective culture, fermentation products showed no activity against *M. racemosus* but could inhibit the latter when used as protective cultures (Table 1). In contrast, *Lb. brevis* CIRM-BIA 608 showed activity only against *M. racemosus* and *P. commune* when used as a fermentation product. None of the tested isolates of *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus sakei*, or *Leuconostoc citreum* showed any activity (Table 1). As expected, within a species, not all tested isolates showed the same antifungal activity. For example, each tested *Lb. casei* isolate showed antifungal activity but the inhibited fungal target and the obtained antifungal scores were different among them, confirming that antifungal activity is a strain-dependent trait, as suggested by Cortés-Zavaleta et al. (2014). Finally, under the tested conditions, *P. commune* was the most

frequently inhibited target, followed by *M. racemosus* and *G. geotrichum*. None of the strains used to produce fermentation products was able to inhibit growth of *Y. lipolytica*, whereas only 3 strains used as protective cultures (*Lb. brevis* CIRM-BIA 128, *Lb. plantarum* L244, and *Leu. mesenteroides* CIRM-BIA 1187) showed intermediate antifungal activity against this target (Table 1). Overall, antifungal activity of the tested strains was higher when they were used as protective cultures; indeed, all isolates did show antifungal activity. The reproducibility of antifungal activities obtained with 2 batches of mini-cheeses for 2 protective cultures and fermentates was evaluated (Supplemental Figure S2; <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13518>). The obtained antifungal activities showed a good reproducibility despite slight variation.

The proposed method was also used to evaluate resistance to natamycin (a natural antibiotic produced by

*Streptomyces natalensis* used for fungal control on cheese surface) of 9 fungi, including those previously mentioned as well as *Phoma pinodella* UBOCC-A-116004, *Candida parapsilosis* UBOCC-A-216002, *Meyerozyma guilliermondii* UBOCC-A-216003, *Trichosporon asahii* UBOCC-A-216005, and *Rhodotorula mucilaginosa* UBOCC-A-216004 (Garnier et al., 2017). Natamycin

resistance was tested in a similar concentration range (from 0 to 0.2 mg/dm<sup>2</sup>) as that used by Garnier et al. (2017). Natamycin was deposited on the mini-cheese surface, in duplicate, using 100 µL of a stock solution followed by fungal inoculation on the cheese surface as described above. The MIC was determined as the concentration for which no visible growth occurred

**Table 1.** Lactic acid bacteria used as dairy ingredient (fermentation product) or protective culture for the antifungal assay

Genus and species	Strain number <sup>1</sup>	Antifungal activity of fermentation product (F) or protective culture (Pc) <sup>2</sup>								
		<i>Galactomyces geotrichum</i>		<i>Mucor racemosus</i>		<i>Penicillium commune</i>		<i>Yarrowia lipolytica</i>		
		F	Pc	F	Pc	F	Pc	F	Pc	
<i>Lactobacillus casei</i>	L1	+	-	++	+	+	++	-	-	
	L37	-	+	-	++	-	++	-	-	
	L61	-	-	+	+	+	++	-	-	
	L95	-	ND	-	ND	+	ND	-	ND	
	L142	-	-	+	+++	+	+++	-	-	
	L194	-	-	+	++	++	+++	-	-	
	L93	-	-	++	+	++	++	-	-	
<i>Lactobacillus brevis</i>	L128	-	-	+	+++	++	+++	-	++	
	L31	-	-	-	++	-	++	-	-	
	L30	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 608	+	ND	++	ND	++	ND	-	ND	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	CIRM-BIA 932	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L233	-	-	+	++	++	++	-	+	
	L56	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L84	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND	
	L90	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L137	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 913	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CIRM-BIA 607	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 909	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 1107	-	+	-	+	-	+	-	-	
	CIRM-BIA 1112	-	+	-	+	+	+++	-	-	
	CIRM-BIA 1436	-	-	-	+	-	+	-	-	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	CIRM-BIA 522	-	+	+	-	++	++	-	++	
	L91	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L92	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L94	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	L97	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 853	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CIRM-BIA 1490	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	L11	-	-	-	+++	++	++	-	-
		L14	+	+	-	+++	+	++	-	-
		L17	-	+	-	+++	+	++	-	-
		L63	-	-	-	+	++	++	-	-
		L89	-	ND	-	ND	+	ND	-	ND
		L96	-	ND	-	ND	++	ND	-	ND
		L244	-	-	+	++	++	+++	-	++
		CIRM-BIA 892	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
		CIRM-BIA 1559	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
<i>Leuconostoc citreum</i>		CIRM-BIA 742	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	CIRM-BIA 852	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 1453	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 1454	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	
	CIRM-BIA 1176	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CIRM-BIA 1187	-	+	-	+++	+	+++	-	+	
	L126	-	-	-	+++	-	++	-	-	

<sup>1</sup>L = isolates from Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (Plouzané, France); CIRM-BIA = isolates from Centre International de Ressources Microbienne-Bactéries d'Intérêt Alimentaire (Rennes, France).

<sup>2</sup>Where - = no antifungal activity; + = weak antifungal activity; ++ = intermediate antifungal activity; +++ = complete inhibition; ND = not determined (not tested as protective culture).



**Table 2.** Minimal inhibitory concentrations (g/L) of natamycin in model cheese versus potato dextrose agar (Garnier et al., 2017) for 9 isolates of representative spoilage fungal species encountered in dairy products

Fungal species	Strain number <sup>1</sup>	Isolation source	MIC <sup>2</sup>	
			Model cheese	Potato dextrose agar
<i>Galactomyces geotrichum</i>	UBOCC-A-216001	Fresh cheese	0.12 (0.6)	0.1 (0.5)
<i>Mucor racemosus</i>	UBOCC-A-116002	Semi-hard cheese	0.04 (0.2)	0.1 (0.5)
<i>Penicillium commune</i>	UBOCC-A-116003	Semi-hard cheese	0.06 (0.3)	0.06 (0.3)
<i>Phoma pinodella</i>	UBOCC-A-116004	Cream cheese	0.08 (0.4)	0.1 (0.5)
<i>Candida parapsilosis</i>	UBOCC-A-216002	Yogurt	0.08 (0.4)	0.1 (0.5)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	UBOCC-A-216003	Cream cheese	0.1 (0.5)	0.08 (0.4)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	UBOCC-A-216004	Fresh cheese	0.08 (0.4)	0.1 (0.5)
<i>Trichosporon asahii</i>	UBOCC-A-216005	Fresh cheese	0.04 (0.2)	0.1 (0.5)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	UBOCC-A-216006	Semi-hard cheese	0.16 (0.8)	>0.2 (>1.0) <sup>3</sup>

<sup>1</sup>Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC, Plouzané, France).

<sup>2</sup>With mg/dm<sup>2</sup> in parentheses.

<sup>3</sup>Highest tested concentration.

after the incubation period (Table 2). The obtained MIC values were then compared with those obtained by Garnier et al. (2017) in potato dextrose agar at pH 5. Independently of the fungal target, natamycin MIC were generally slightly lower in the cheese model than in potato dextrose agar. This result may be explained by differences in the physiological status of the fungal targets as well as by the fact that other compounds present in the cheese may enhance natamycin activity. For example, lactic acid produced by lactococci starter cultures could act synergistically with natamycin.

*Mucor racemosus* and *T. asahii* were the most sensitive fungi to natamycin with a MIC of 0.04 mg/dm<sup>2</sup>, followed by *P. commune* (0.06 mg/dm<sup>2</sup>; Table 2). *Yarrowia lipolytica* showed the highest resistance to natamycin with a MIC of 0.16 mg/dm<sup>2</sup>, which is very close to the maximum authorized concentration (0.2 mg/dm<sup>2</sup>) that can be used in dairy products within the European Union.

The main objective of this work was to develop a high-throughput screening method to evaluate antifungal activities of various antifungal agent candidates (bioprotective cultures, fermentation products, or purified molecules) in a matrix as close as possible to real dairy products, such as cheese, in terms of physical, chemical, and biological composition. The proposed method, based on the use of a cheese mimicking-model distributed in 24-well plates, could achieve a screening rate of 1,600 assays per week, is easy to implement, and does not require complex and high-cost equipment. Such a screening matrix, closer to an actual dairy product, makes antifungal activity screening more robust in regards to scale-up validation, which follows the screening step. Even though the gross composition of the retentate used to make mini-cheeses was verified in 3 batches (252 ± 8 g/kg DM, 67.8 ± 1.9 g/kg fat, 113.9 ± 2.08 g/kg N content, pH 6.53 ± 0.02), slight

variations in observed antifungal activities could occur from one retentate batch to another. Indeed, minor compound (e.g., micronutrient) variability is expected due to seasonal variation in milk composition but such variability was not verified in the context of this study. In addition, by determining the number of pixels represented by the targeted fungi on the cheese surface, estimation of fungal growth could be automated using image analysis, yielding a quantitative estimation of fungal growth. In conclusion, the developed method offers new perspectives for developing new biopreservation solutions.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Conseils Régionaux de Bretagne (grant no. 13008651) and Pays de la Loire (grant no. 2014-01081) in the framework of the PROFIL interregional project under the scientific coordination of INRA (J. Leonil) and managed by the Bretagne Biotechnologies Alimentaires industrial association (Rennes, France).

## REFERENCES

- Cheong, E. Y. L., A. Sandhu, J. Jayabalan, T. T. Kieu Le, and N. T. Nhiep., H. TMy Ho, J., N. Zwielehner, Bansal, and M. S. Turner. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46:91–97.
- Cortés-Zavaleta, O., A. López-Malo, A. Hernández-Mendoza, and H. S. García. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* 173:30–35.
- Delavenne, E., S. Cliquet, C. Trunet, G. Barbier, J. Mounier, and G. Le Blay. 2015. Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiol.* 45:10–17.
- Delavenne, E., J. Mounier, F. Deniel, G. Barbier, and G. Le Blay. 2012. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from

- raw milk samples from cow, ewe, and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 155:185–190.
- Fuselli, F., C. Guarino, A. La Mantia, L. Longo, A. Faberi, and R. M. Marianella. 2012. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 906:9–18.
- Garnier, L., F. Valence, A. Pawtowski, L. Auhustsinava-Galerie, N. Frotté, F. Deniel, E. Coton, and J. Mounier. 2017. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241:191–197.
- Gerez, C. L., M. J. Torres, G. Font de Valdez, and R. Rollan. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control* 64:231–237.
- Hannon, J. A., S.-M. Deutsch, M.-N. Madec, J.-Y. Gassi, M.-P. Chapot-Chartier, and S. Lortal. 2006. Lysis of starters in UF cheeses: Behaviour of mesophilic lactococci and thermophilic lactobacilli. *Int. Dairy J.* 16:324–334.
- Inglin, R. C., M. J. Stevens, L. Meile, C. Lacroix, and L. Meile. 2015. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114:26–29.
- Le Lay, C., J. Mounier, V. Vasseur, A. Weill, G. Le Blay, G. Barbier, and E. Coton. 2016. *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control* 60:247–255.
- Lynch, K. M., A. M. Pawlowska, B. Brosnan, A. Coffey, E. Zannini, A. Furey, P. L. H. McSweeney, D. M. Waters, and E. K. Arendt. 2014. Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 34:167–173.
- Schillinger, U., and J. V. Villarreal. 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21:107–111.
- Stiles, J., S. Penkar, M. Plocková, J. Chumchalová, and L. B. Bullerman. 2002. Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Prot.* 65:1188–1191.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70:331–345.
- Stratford, M., H. Steels, G. Nebe-von-Caron, M. Novodvorska, K. Hayer, and D. B. Archer. 2013. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Int. J. Food Microbiol.* 166:126–134.
- Varsha, K. K., and K. M. Nampoothiri. 2016. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control* 69:61–64.
- Wulijidiligen, S., and M. Taku. 2011. Screening and identification of lactic acid bacteria from Airag for antifungal activity. *J. Anim. Vet. Adv.* 10:2751–2757.



## **Annexes III**

### **Article 4**

**Biogenic amine and antibiotic resistance profiles  
determined for lactic acid bacteria and a  
*Propionibacterium* prior to use as antifungal bioprotective  
cultures**



## Short communication

## Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures

Monika Coton<sup>a,\*</sup>, Mégane Lebreton<sup>a</sup>, Marcia Leyva Salas<sup>a,b</sup>, Lucille Garnier<sup>a,b</sup>, Marion Navarri<sup>a</sup>, Audrey Pawtowski<sup>a</sup>, Gwenaëlle Le Blay<sup>c</sup>, Florence Valence<sup>b</sup>, Emmanuel Coton<sup>a</sup>, Jérôme Mounier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280, Plouzané, France

<sup>b</sup> STLO, Agrocampus Ouest, INRA, 35000, Rennes, France

<sup>c</sup> Université de Brest, UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin, IUEM, Technopôle Brest-Iroise, 29280, Plouzané, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 20 November 2017

Received in revised form

29 April 2018

Accepted 2 May 2018

Available online 2 June 2018

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) and propionibacteria are two microbial groups studied as alternatives to chemical preservatives in foods. As potential bioprotective cultures in the food industry, not only does antimicrobial efficiency need to be ensured, but safety criteria should be evaluated. Here, 21 LAB and 1 propionibacterium with previously determined antifungal properties were screened for two relevant criteria: biogenic amine production and antibiotic resistance patterns. Low risk profiles were observed for 15 strains, highlighting their potential industrial use as bioprotective cultures. Some exceptions were identified: both *Lactobacillus buchneri* strains tested were histamine-producers, while 1 *Lactobacillus brevis*, 2 *Lactobacillus rhamnosus* and 1 *Leuconostoc mesenteroides* strains were tyramine-producers. These same strains were resistant to up to 5 antibiotics, thus excluding them as candidates for industrial use. These results confirm the importance of ensuring safety criteria are met before considering a candidate strain for use as a bioprotective agent in food products.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Among preservation methods, microbial fermentations have been used since the Neolithic era for their key role in food processing and preservation (Bourdichon et al., 2012). The antimicrobial potential of several microorganisms, combined with the need for alternative preservation methods, has led to the biopreservation concept, i.e., the selection and use of bioprotective cultures (Leyva Salas et al., 2017). Bioprotective cultures are an interesting natural alternative to chemical preservatives as they can be directly or indirectly (through the compounds they produce) used to inhibit or delay growth of spoilage and pathogenic microorganisms in a given food or feed product, and increase product shelf life (Stiles, 1996). The main bacterial groups currently used for food biopreservation correspond to lactic acid bacteria (LAB) followed by propionibacteria (PAB) and to

a lesser extent some staphylococci or *Brevibacterium* species/strains (Elsser-Gravesen & Elsser-Gravesen, 2014).

Many LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* species, and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) and PAB already have a long history of safe use in foods and agricultural applications, and have been granted the QPS (EFSA 2013, 2016) or GRAS status for feed or food applications or are listed among safe microorganisms by the IDF (Bourdichon et al., 2012). For food-related non-enterococcal LAB and PAB species, most have been described not to harbour many safety concerns: no known virulence factors, no toxins produced and limited antimicrobial resistances. This finding was reinforced in a recent study by Bennedsen, Stuer-Lauridsen, Danielsen, and Johansen (2011) who screened 28 LAB genomes *in silico* (including 16 strains representing 8 *Lactobacillus* species, 3 *Lactococcus lactis* strains and 3 *S. salivarius* subsp. *thermophilus* strains) for antimicrobial resistance genes and virulence factors and none were identified. Also, recent comparative genomics with *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 showed that no pathogenicity factors were present (Falentin et al., 2010).

\* Corresponding author. Tel.: +33 2 99 91 51 55.

E-mail address: [monika.coton@univ-brest.fr](mailto:monika.coton@univ-brest.fr) (M. Coton).



Despite the clearly low risks associated with many LAB strains belonging to *Lactobacillus* and *Lactococcus* species and *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, as well as dairy PAB (especially, *Propionibacterium freudenreichii*, *Acidipropionibacterium propionici*, *Acidipropionibacterium jensenii* and *Acidipropionibacterium thoenii*) (Meile, Le Blay, & Thierry, 2007; Thierry et al., 2011), efficient safety criteria evaluation is still necessary. Indeed, strains of some dairy related LAB species have already been described as biogenic amine (BA) producers such as lactococci (Flasarová et al., 2016; Ladero et al., 2011; Martín & Coton, 2017) and lactobacilli (Linares, Martín, Ladero, Alvarez, & Fernandez, 2011; Martín & Coton, 2017). BA can have potential physiological effects that can be more or less severe on the consumer if ingested in high quantities from contaminated foods (Spano et al., 2010). Therefore, searching for BA-production should be systematically included in safety evaluation. Moreover, antimicrobial resistance profiles should be determined to ensure there is no risk for dissemination of any acquired antibiotic resistances that may be harboured on mobile elements.

Based on current knowledge (Bourdichon et al., 2012; Laulund, Wind, Derkx, & Zuliani, 2017) and QPS/GRAS/IDF safety criteria guidelines, we evaluated the safety of 21 candidate antifungal bioprotective LAB and PAB strains for both BA-production and the presence of acquired antibiotic resistances.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains and culture conditions

In this study, 21 LAB strains with interesting antifungal activities (for some, already studied by Delavenne et al., 2013, 2015; Mieszkin et al., 2017), were evaluated for BA-production and antibiotic resistances (Table 1). Four lactobacilli, 1 streptococci and 1 propionibacterium were used as BA-positive controls or reference strains for antibiotic resistance testing (Table 1). Lactobacilli pure cultures were grown on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) plates (Biokar, France) pH 6.4 and incubated at 30 °C for 48 h under anaerobic

conditions, except for *Lactobacillus saerimneri* ATCC 33222 that was incubated at 37 °C under anaerobic conditions. *Streptococcus thermophilus* was cultured on M17 medium (bioMérieux, France) and incubated at 37 °C for 24 h. PAB were grown on yeast extract lactate medium (YEL) and incubated at 30 °C for 4–5 days under anaerobic conditions, as described by Malik, Reinbold, and Vedamuthu (1968).

### 2.2. Biogenic amine determination

#### 2.2.1. Specific culture conditions for biogenic amine determination

LAB strains were grown in MP decarboxylase broth (Bover-Cid & Holzapfel, 1999) or MRS broth (Biokar, France) supplemented or not with 2.5 g L<sup>-1</sup> tyrosine, 2.5 g L<sup>-1</sup> L-histidine monohydrochloride, 2.5 g L<sup>-1</sup> L-ornithine monohydrochloride and 1 g L<sup>-1</sup> agmatine sulphate and adjusted to pH 5.3 before autoclaving. Cultures were incubated at 30 °C (except for *L. saerimneri* ATCC 33222 at 37 °C) for 72 h in static conditions. For *A. jensenii* and *S. thermophilus* strains, MRS-based medium was replaced by YEL and M17, supplemented accordingly and incubated at 30 °C and 43 °C, respectively. Three consecutive cultures in amino acid enriched media were performed and the final culture was used for HPLC analysis. Each strain was also enumerated on the appropriate medium (as described above) to ensure similar growth in all biological triplicates.

#### 2.2.2. Biogenic amine quantification by high performance liquid chromatography

Biogenic amine quantification was performed using an Agilent 1200 high performance liquid chromatography (HPLC) system (Agilent Technology, Paris, France) equipped with a LUNA 3 µm C18 150 mm × 4.5 mm column (Phenomenex, Paris, France) according to the method developed by Duflos, Dervin, Malle, and Bouquelet (1999). This method simultaneously quantifies 11 biogenic amines, namely methylamine, ethylamine, tryptamine, 2-phenyl ethylamine, isoamylamine, cadaverine, putrescine, histamine, tyramine, spermidine and spermine.

**Table 1**  
Species, sources and strain characteristics for lactic acid bacteria and propionibacteria strains used in this study.

Species	Strain number	Biotope	Strain characteristics	Culture conditions
<i>L. brevis</i>	IOEB 9809	France-Wine	BA control ( <i>tyrdc</i> <sup>+</sup> , <i>agdi</i> <sup>+</sup> )	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. saerimneri</i>	ATCC 33222	Horse stomach	BA control ( <i>hdc</i> <sup>+</sup> , <i>odc</i> <sup>+</sup> , <i>ldc</i> <sup>+</sup> )	MRS; 37 °C; Anaerobic
<i>L. plantarum</i>	LMG 6907	Sour kraut	Antibiotic testing control	MRS; 28 °C; Anaerobic
<i>L. paracasei</i>	LMG 13552	Emmental	Antibiotic testing control	MRS; 37 °C; Anaerobic
<i>S. thermophilus</i>	LMG 18311	Yoghurt	Antibiotic testing control	M17; 37 °C; Anaerobic
<i>A. jensenii</i>	CIRM-BIA 39 <sup>T</sup>	Buttermilk	Antibiotic testing control	YEL; 30 °C; Anaerobic
<i>L. buchneri</i>	L162	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. buchneri</i>	L233	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. brevis</i>	L128	2009-France-Raw sheep milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. casei</i>	L142	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. coryniformis</i>	K.V9.3.10	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. harbinensis</i>	L172	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. harbinensis</i>	K.V9.3.1NP	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. paracasei</i>	L117	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. plantarum</i>	L11	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. plantarum</i>	L14	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. plantarum</i>	L17	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. plantarum</i>	L244	2009-France-Raw cow milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. rhamnosus</i>	CIRM-BIA 1112	Fermented milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. rhamnosus</i>	CIRM-BIA 1113	Unknown	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. rhamnosus</i>	CIRM-BIA 1952	Unknown	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. rhamnosus</i>	CIRM-BIA 574	Raw milk cheese	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. rhamnosus</i>	CIRM-BIA 578	Raw milk cheese	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. zeae</i>	M.C7.5.2C	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	CIRM-BIA 47	Diacetyl producing starter	this study	M17; 30 °C; Anaerobic
<i>L. mesenteroides</i>	M.C8.4.1B	2009-France-Raw goat milk	this study	MRS; 30 °C; Anaerobic
<i>A. jensenii</i>	CIRM-BIA 1774	Raw cow milk	this study	YEL; 30 °C; Anaerobic
<i>S. thermophilus</i>	CIRM-BIA 16	Buttermilk	this study	M17; 37 °C; Anaerobic



### 2.2.3. Biogenic amine gene detection by PCR

DNA was extracted from 1 mL overnight bacterial cultures with the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel, France) according to the manufacturer's instructions. The molecular method, simultaneously detecting 4 major BA associated genes (*hdc*, *agdi*, *odc* and *tyrdc*) and a PCR internal control (targeting the 16S rRNA gene) was used as described by Coton et al. (2010).

### 2.2.4. Gene sequencing and sequence analysis

The individual PCR fragments obtained were sequenced by Eurofins MWG (Abersberg, Germany) and sequence similarity was determined using BLAST in the NCBI GenBank database.

### 2.3. Determination of antibiotic susceptibility

Minimum inhibitory concentration (MIC) determination for 13 antibiotics (ATB) (Table 3) was conducted according to the ISO 10932 IDF 223 International Standard (2010-06-15) applicable to bifidobacteria and non-enterococcal LAB related to milk and milk products. Culture conditions for LAB were those described by the ISO 10932 IDF 223. For PAB, the ISO standard did not indicate any specification therefore an IST-YEL 2X medium containing 90% (v/v) 2 × Iso-Sensitest medium and 10% (v/v) 2 × YEL medium was used.

For each plate, the reference strains for each microbial group specified by the ISO standard (namely *Lactobacillus plantarum* LMG6907, *Lactobacillus paracasei* LMG13552 and *S. thermophilus* LMG18311) and negative controls were included. For PAB, we included the control strain, *A. jensenii* CIRM-BIA 39<sup>T</sup>, based on recently published data (Darilmaz & Beyatli, 2012). Control strains were included in each series in biological triplicates. MIC values were determined and corresponded to the ATB concentration in the first well where no growth was visible and as determined by an

automatic Multiskan FC plate reader (Thermo Scientific, Paris, France) set to 620 nm.

## 3. Results and discussion

### 3.1. In vitro biogenic amine determination

The 21 LAB and 1 PAB selected antifungal strains and control strains were analysed using a combined molecular and biochemical approach.

*A. jensenii* CIRM-BIA 1774 did not harbour any of the target genes as shown by both multiplex and simplex PCRs (Table 2) and this finding was further validated by HPLC analyses. These results suggest that this PAB strain is of low risk for BA-production despite that BA screening among PAB strains has not been largely explored. Noteworthy, an in silico search was also performed using available *Propionibacteria* genomes but no positive BLAST results were obtained reinforcing their low risk profile.

For LAB, no BA target genes were amplified for 15 of the tested strains (Table 2) and HPLC analyses confirmed these findings with no BA (below detection limit in culture supernatants).

On the other hand, *tyrdc* and *agdi* genes were simultaneously detected by PCR in *Lactobacillus brevis* L128, and *tyrdc* was amplified for 2 *L. rhamnosus* strains (CIRM-BIA 574, CIRM-BIA 578) and *Leuconostoc mesenteroides* M.C8.4.1B (Table 2). *L. brevis* L128 *tyrdc* and *agdi* amplification products were 100% and 99% identical to those of *L. brevis* ATCC367 (Genbank accession n°CP000416.1), while in *L. rhamnosus* (CIRM-BIA 574, CIRM-BIA 578) and *L. mesenteroides* (M.C8.4.1B) strains, *tyrdc* fragments were 97% and 98% identical with this same sequence thus confirming valid gene identification. Production of the corresponding BA by these strains was further confirmed in both amino acid supplemented media (Table 2). *L. brevis* is a known tyramine- and putrescine-producer

**Table 2**

Multiplex PCR to detect the four main genes (*tyrdc*, *hdc*, *odc* and *agdi*) involved in tyramine, histamine and putrescine production and *in vitro* biogenic amine production in optimal culture medium (MRS) and/or MP decarboxylase medium.<sup>a</sup>

Species and strain code	<i>agdi</i>	<i>tyrdc</i>	<i>hdc</i>	<i>odc</i>	Cadaverine (mg L <sup>-1</sup> )	Histamine (mg L <sup>-1</sup> )	Putrescine (mg L <sup>-1</sup> )	Tyramine (mg L <sup>-1</sup> )
<i>L. saerimneri</i> ATCC 33222 (control)	-	-	+	+	493 ± 14 (MRS)	887 ± 62 (MRS)	601 ± 13 (MRS)	nd
<i>L. brevis</i> IOEB 9809 (control)	+	+	-	-	nd	nd	223 ± 18 (MRS)	768 ± 80 (MRS)
<i>L. buchneri</i> L162	+	-	+	-	nd	743 ± 33 (MRS)	nd	nd
<i>L. buchneri</i> L233	+	-	+	-	nd	855 ± 13 (MPH)	nd	nd
<i>L. brevis</i> L128	+	+	-	-	nd	723 ± 39 (MRS)	200 ± 12 (MRS)	574 ± 50 (MRS)
<i>L. casei</i> L142	-	-	-	-	nd	972 ± 47 (MPH)	292 ± 6 (MPTa)	641 ± 7 (MPTa)
<i>L. coryniformis</i> K.V9.3.10	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. harbinensis</i> L172	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. harbinensis</i> K.V9.3.1NP	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. paracasei</i> L117	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. plantarum</i> L11	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. plantarum</i> L14	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. plantarum</i> L17	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. plantarum</i> L244	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1112	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1113	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1952	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 574	-	+	-	-	nd	nd	nd	702 ± 39 (MRS)
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 578	-	+	-	-	nd	nd	nd	410 (MRS)
<i>L. zeae</i> M.C7.5.2C	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. lactis</i> CIRM-BIA 47	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd
<i>L. mesenteroides</i> M.C8.4.1B	-	+	-	-	nd	nd	72 ± 12 (MRS)	580 (MRS)
<i>S. thermophilus</i> CIRM-BIA 16	-	-	-	-	nd	nd	41 (MPTa)	413 (MPTa)
<i>A. jensenii</i> CIRM-BIA 1774	-	-	-	-	nd	nd	nd	nd

<sup>a</sup> Determinations were done using high performance liquid chromatography. Biogenic amine (BA) quantifications are expressed in mg L<sup>-1</sup> and nd signifies BA was not detected. BAs not mentioned in this table were not detected at quantifiable amounts in any samples. Absent (-); present (+); MPH: decarboxylase medium supplemented with histidine; MPTa: decarboxylase medium supplemented with tyrosine and agmatine.



**Table 3**  
Antibiotic susceptibility testing for 21 LAB and 1 PAB strains with 13 antibiotics.<sup>a</sup>

Species	ATB with action on the cell wall										ATB inhibiting protein synthesis		ATB inhibiting nucleic acid synthesis	
	Ampicillin	Vancomycin	Chloramphenicol	Clindamycin	Erythromycin	Gentamicin	Kanamycin	Neomycin	Streptomycin	Tetracycline	Oxytetracycline	Trimethoprim	Rifampicin	
<i>L. brevis</i> L128	0.5 (2)	>128 (nr)	4 (4)	16 (1)	0.5 (1)	1 (16)	32 (32)	2–4 (nd)	16 (64)	8–16 (8)	16 (nd)	0.12–1 (nd)	0.25 (nd)	
<i>L. buchneri</i> L162	1 (2)	>128 (nr)	4 (4)	0.03 (1)	0.5 (1)	0.5 (16)	8–16 (32)	0.5 (nd)	4 (64)	16 (8)	16–32 (nd)	2 (nd)	0.12–0.25 (nd)	
<i>L. buchneri</i> L233	1 (2)	>128 (nr)	8–16 (4)	0.03 (1)	0.5 (1)	0.5 (16)	8–16 (32)	0.5 (nd)	4–8 (64)	16 (8)	16–32 (nd)	2 (nd)	0.12–0.25 (nd)	
<i>L. casei</i> L142	0.5 (4)	>128 (nr)	8 (4)	0.06–0.12 (1)	0.5 (1)	4 (32)	32–64 (64)	8 (nd)	16 (64)	1 (4)	1 (nd)	1–2 (nd)	0.25–0.5 (nd)	
<i>L. coryniformis</i> K.V9.3.10	0.5–1 (4)	>128 (nr)	0.5–1 (4)	0.06–0.12 (1)	0.5–1 (1)	1–8 (16)	64–128 (64)	4 (nd)	8–16 (64)	1–2 (8)	2–4 (nd)	0.125 (nd)	0.5–1 (nd)	
<i>L. harbinensis</i> K.V9.3.1Np	0.25–0.5 (4)	>128 (nr)	1–2 (4)	0.25–2 (1)	0.25–1 (1)	4–8 (16)	32–128 (64)	4–16 (nd)	32–64 (64)	8–16 (8)	16–8 (nd)	1–4 (nd)	0.5–2 (nd)	
<i>L. harbinensis</i> L172	0.5 (4)	>128 (nr)	2–4 (4)	1 (1)	0.5 (1)	2 (16)	32 (64)	8 (nd)	4 (64)	0.25 (8)	0.25 (nd)	0.12 (nd)	0.12 (nd)	
<i>L. lactis</i> CIRM-BIA 47	1–4 (2)	>128 (4)	1 (8)	1–2 (1)	0.5 (1)	1–4 (32)	16–64 (64)	2–8 (nd)	8–32 (32)	8–16 (4)	8–16 (nd)	0.125–2 (nd)	0.5–1 (nd)	
<i>L. mesenteroides</i> M.C8.4.1B	1–4 (2)	>128 (nr)	2 (4)	0.032 (1)	0.5–1 (1)	2–8 (16)	32–64 (32)	16–8 (nd)	8–32 (64)	0.5–1 (8)	0.5–2 (nd)	8–32 (nd)	0.5–2 (nd)	
<i>L. paracasei</i> L117	0.25 (4)	>128 (nr)	4 (4)	0.12–0.25 (1)	0.5 (1)	4 (32)	128 (64)	8–16 (nd)	32 (64)	1 (4)	1 (nd)	0.12 (nd)	0.25 (nd)	
<i>L. plantarum</i> L11	0.12 (2)	>128 (nr)	4 (8)	2–4 (2)	1 (1)	8 (16)	128 (64)	8–16 (nd)	64 (nr)	8–16 (32)	8 (nd)	0.5–1 (nd)	2 (nd)	
<i>L. plantarum</i> L14	0.12 (2)	>128 (nr)	4 (8)	2–4 (2)	1 (1)	8 (16)	128 (64)	8–16 (nd)	64 (nr)	8–16 (32)	8 (nd)	0.5 (nd)	2 (nd)	
<i>L. plantarum</i> L17	0.12 (2)	>128 (nr)	4 (8)	2–4 (2)	1 (1)	8 (16)	128 (64)	8–16 (nd)	64 (nr)	8–16 (32)	8–16 (nd)	0.5–1 (nd)	2 (nd)	
<i>L. plantarum</i> L244	0.12–0.25 (2)	>128 (nr)	4 (8)	0.03 (2)	0.5–1 (1)	2 (16)	64 (64)	4 (nd)	32 (nr)	8 (32)	8 (nd)	0.5–2 (nd)	1–2 (nd)	
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1112	0.5 (4)	>128 (nr)	8 (4)	>16 (1)	>8 (1)	2–4 (16)	32 (64)	8–16 (nd)	>256 (32)	1 (8)	1 (nd)	8–16 (nd)	0.25 (nd)	
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1113	0.25–0.5 (4)	>128 (nr)	4 (4)	0.5–1 (1)	0.5–1 (1)	2 (16)	32 (64)	8 (nd)	8 (32)	0.5–1 (8)	0.5–1 (nd)	64–>64 (nd)	0.12–0.25 (nd)	
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 1952	0.5 (4)	>128 (nr)	4–8 (4)	0.5 (1)	0.5 (1)	2 (16)	32–64 (64)	4–8 (nd)	8 (32)	0.5–1 (8)	0.5–1 (nd)	>64 (nd)	0.12 (nd)	
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 574	0.063–2 (4)	>128 (nr)	0.25–1 (4)	0.125–0.5 (1)	0.063–2 (1)	4–8 (16)	32–64 (64)	1–32 (nd)	4–32 (32)	0.25–0.5 (8)	0.125–0.5 (nd)	2–8 (nd)	0.125–1 (nd)	
<i>L. rhamnosus</i> CIRM-BIA 578	2–4 (4)	>128 (nr)	1 (4)	0.25–0.5 (1)	0.25–0.5 (1)	4–8 (16)	64–128 (64)	16–64 (nd)	4–8 (32)	0.25–0.5 (8)	0.25–0.5 (nd)	2–8 (nd)	0.25–1 (nd)	
<i>L. zeae</i> M.C7.5.2C	0.25–1 (4)	>128 (nr)	2–4 (4)	0.25–1 (1)	0.5–1 (1)	4 (16)	64–256 (64)	8 (nd)	32–64 (64)	8–16 (8)	8–16 (nd)	1–4 (nd)	2–4 (nd)	
<i>A. jensenii</i> CIRM-BIA 1774	0.5 (2)	0.25 (4)	0.5 (2)	0.12–0.25 (0.25)	0.5 (0.5)	4 (64)	16–32 (64)	1–2 (nd)	2 (64)	0.25–0.5 (2)	0.5 (nd)	0.12 (nd)	0.12 (nd)	
<i>S. thermophilus</i> CIRM-BIA 16	0.03 (2)	0.25 (4)	4–16 (4)	0.03 (2)	0.5 (2)	2–4 (32)	32 (64)	8 (nd)	4–16 (64)	0.25 (4)	0.25 (nd)	32 (nd)	0.12 (nd)	

<sup>a</sup> Values in tables correspond to minimal inhibitory concentrations ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and, in parentheses, microbiological cut-off values ( $\text{mg L}^{-1}$ ) according to EFSA (2012). Abbreviations: nr, not required; nd, not determined.



and the biosynthesis gene clusters have been well documented (Coton & Coton, 2009; Lucas et al., 2007). For the *L. rhamnosus* strains, to our knowledge, this is the first description of this species as a strong tyramine-producer.

Concerning the 2 *Lactobacillus buchneri* strains tested (L162 and L233), simultaneous detection of both *hdc* and *agdi* genes was observed (Table 2). These sequences were 100% identical to *Lactobacillus parabuchneri* DSM5987 *hdc* sequence (Genbank accession n°LN877765.1) and *agdi* in *L. brevis* ATCC367, respectively, again confirming gene identity. Interestingly, while both strains produced histamine *in vitro*, no putrescine was produced in these conditions. To our knowledge, this is the first time that these two genes are simultaneously described in *L. buchneri*. Elsanhoty and Ramadan (2016) identified a *L. buchneri* strain with a putative *agdi* gene (however, no *agdi* sequence data was made available), but not with a *hdc* gene. Complementary to our findings, we detected this gene in the *L. buchneri* CD034 genome sequence (accession n°CP003043.1) (Heinl et al., 2012), therefore suggesting that this species may also be a potential putrescine-producer. Further studies could be of interest to elucidate the *agdi* cluster in this species and determine whether it is functional.

### 3.2. Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was the second criteria used for antifungal strain safety evaluation according to the standardised ISO 10932:2010 method (ISO, 2010).

All lactobacilli strains were resistant to the clinically important ATB vancomycin (a glycopeptide) (Table 3). Nine strains (*L. plantarum* L11, L14 and L17, *Lactobacillus coryniformis* K.V9.3.1O, *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np, *L. paracasei* L117, *L. rhamnosus* CIRM-BIA 578 and *Lactobacillus zeae* M.C7.5.2C) were also resistant to kanamycin (Table 3). Lactobacilli are well-known to be naturally resistant to vancomycin while kanamycin has already been described among lactobacilli, including *L. plantarum* (Danielsen & Wind, 2003).

Six strains were resistant to tetracycline (*L. buchneri* L162 and L233, *L. zeae* M.C7.5.2C, *L. brevis* L128, *L. lactis* CIRM-BIA 47 and *L. harbinensis* K.V9.3.1Np), while all others presented intermediate profiles (Table 3). Two *L. rhamnosus* strains (CIRM-BIA 1113 and CIRM-BIA 1952) were also resistant to trimethoprim, a diaminopyrimidin antibiotic, while all other strains were either sensitive or gave an intermediate result (Table 3). High natural resistance to trimethoprim has already been described among some LAB species (Danielsen & Wind, 2003; Mathur & Singh, 2005). Many strains were also found to be resistant to the lincosamide, clindamycin, and corresponded to *L. plantarum* L11, L14 and L17, *L. brevis* L128, *L. rhamnosus* CIRM-BIA 1112 and to a lesser extent *L. lactis* CIRM-BIA 47 as the MIC values determined for this strain reached the cut-off value. Six strains were also resistant to chloramphenicol (*L. buchneri* L233, *L. casei* L142, *L. rhamnosus* CIRM-BIA 1112 and CIRM-BIA 1952, *L. zeae* M.C7.5.2C, *S. thermophilus* CIRM-BIA 16). Finally, one *L. rhamnosus* strain (CIRM-BIA 1112) was resistant to multiple antibiotics namely streptomycin, erythromycin, clindamycin, chloramphenicol and, as already mentioned, vancomycin. This finding has never been described in literature data, although Korhonen et al. (2010) identified 3 *L. rhamnosus* strains possessing 3 ATB resistances (clindamycin, erythromycin and streptomycin).

Most of the tested strains were resistant to either 1 or 2 ATBs, including vancomycin (except for *A. jensenii* CIRM-BIA 1774 and *S. thermophilus* CIRM-BIA 16). Only 8 strains were resistant to 3 or more ATBs and corresponded to *L. brevis* L128, *L. buchneri* L233, *L. plantarum* L11, L14 and L17, *L. rhamnosus* CIRM-BIA 1112 and CIRM-BIA 1952 and *L. zeae* M.C7.5.2C. *L. harbinensis* K.V9.3.1Np

showed 2 ATB MIC values only weakly in the cut-off value zone therefore this strain could be considered to have only one notable resistance to vancomycin. It is worth underlining that intermediate MIC values were observed for most ATBs and strains. The use of these tests is sufficient for determining antibiotic resistance profiles in LAB and PAB, and comparison to literature data on natural and transmissible resistances within a considered species should allow to select or not a strain as a candidate for bioprotective applications.

The safety evaluation criteria identified most strains (from 13 species) as non-BA-producers and with low ATB resistance patterns. The only exceptions were *L. rhamnosus* strains as 2 produced high tyramine levels *in vitro* (CIRM-BIA 574 and CIRM-BIA 578) and 3 had multi-resistances (5 for CIRM-BIA 1112, 3 for CIRM-BIA 1952 or 2 for CIRM-BIA 1113) and 2 *L. buchneri*, 1 *L. brevis* and 1 *L. mesenteroides* were either histamine- or tyramine -producers, and 2 and 3 ATB resistances were observed.

## 4. Conclusions

Using the proposed safety evaluation approach, certain antifungal bioprotective culture candidates were excluded for potential future food applications as (i) BA biosynthesis associated genes were harboured in their genomes and BA-production observed *in vitro* and (ii) ATB resistances, beyond known natural ones (e.g., vancomycin-resistance in LAB), were identified, even if the genetic determinants were not determined in the scope of this research. In the future, it could be of interest to determine the genetic elements related to ATB resistances as they could pose a putative risk related to gene dissemination.

## Acknowledgements

This work was partly supported by the French National Agency for Research (ANR) program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01). We are also grateful to the Regional Councils of Bretagne (grant no. 13008651) and Pays de la Loire (grant no. 2014-07081) for their financial support, and INRA for scientific coordination (J. Leonil) through the interregional project PROFIL, managed by the BBA industrial association. We would also like to thank H el ene Falentin for performing *in silico* searches on the 20 *P. freudenreichii* genomes.

## References

- Bennedsen, M., Stuer-Lauridsen, B., Danielsen, M., & Johansen, E. (2011). Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 2785–2787.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 87–97.
- Bover-Cid, S., & Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33–41.
- Coton, E., & Coton, M. (2009). Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 26, 52–57.
- Coton, E., Mulder, N. L., Coton, M., Pochet, S., Trip, H., & Lolkema, J. S. (2010). Origin of the putrescine-producing ability of the coagulase-negative bacterium *Staphylococcus epidermidis* 2015B. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5570–5576.
- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1–11.
- Darilmaz, D. O., & Beyatli, Y. (2012). Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. *Anaerobe*, 18, 122–127.
- Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J., & Le Blay, G. (2015). Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.11 in yogurt. *Food Microbiology*, 45, 10–17.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., & Le Blay, G. (2013). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*, 30, 206–213.



- Duflos, G., Dervin, C., Malle, P., & Bouquelet, S. (1999). Use of biogenic amines to evaluate spoilage in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangius merlangus*). *Journal of AOAC International*, 86, 1357–1363.
- EFSA. (2012). Scientific opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10, 1–10.
- EFSA. (2013). Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11, 3449–3555.
- EFSA. (2016). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA Journal*, 14, 4522.
- Elsanhoty, R. M., & Ramadan, M. F. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220–228.
- Elsser-Gravesen, D., & Elsser-Gravesen, A. (2014). Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 143, 29–49.
- Falentin, H., Deutsch, S. M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., et al. (2010). The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. *PLoS One*, 5, e11748.
- Flasarová, R., Pachlová, V., Buňková, L., Menšíková, A., Georgová, N., Dráb, V., et al. (2016). Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. *Food Chemistry*, 194, 68–75.
- Heinl, S., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Szczepanowski, R., Blom, J., Linke, B., et al. (2012). Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. *Journal of Biotechnology*, 161, 153–166.
- ISO. (2010). *Lait et produits laitiers – Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'antibiotiques applicable aux bifidobactéries et bactéries lactiques non-entérocoques. Norme ISO 10932:2010 (IDF 223:2010)*.
- Korhonen, J. M., Van Hoek, A. H., Saarela, M., Huys, G., Tosi, L., et al. (2010). Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus*. *Beneficial Microbes*, 1, 75–80.
- Ladero, V., Rattray, F. P., Mayo, B., Martín, M. C., Fernández, M., & Alvarez, M. A. (2011). Sequencing and transcriptional analysis of the biosynthesis gene cluster of putrescine-producing *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6409–6418.
- Laulund, S., Wind, A., Derkx, P. M. F., & Zuliani, V. (2017). Regulatory and safety requirements for food cultures. *Microorganisms*, 5, 1–14.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation - a review. *Microorganisms*, 5, Article 37.
- Linares, D. M., Martín, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., & Fernandez, M. (2011). Biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 691–703.
- Lucas, P. M., Blancato, V. S., Claisse, O., Magni, C., Lolkema, J. S., & Lonvaud-Funel, A. (2007). Agmatine deiminase pathway genes in *Lactobacillus brevis* are linked to the tyrosine decarboxylation operon in a putative acid resistance locus. *Microbiology*, 153, 2221–2230.
- Malik, A. C., Reinbold, G. W., & Vedamuthu, E. R. (1968). An evaluation of the taxonomy of *Propionibacterium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 14, 1185–1191.
- Martin, J. F., & Coton, M. (2017). Blue cheese: Microbiota and fungal metabolites. In C. Martinez-Villaluenga, & E. Peñas (Eds.), *Fermented foods in health and disease prevention* (pp. 275–303). Boston, MA, USA: Academic Press.
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Microbiology*, 105, 281–295.
- Meile, L., Le Blay, G., & Thierry, A. (2007). Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 316–320.
- Mieszkin, S., Hymery, N., Debaets, S., Coton, E., Le Blay, G., Valence, F., et al. (2017). Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 47–55.
- Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., et al. (2010). Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S95–S100.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 331–345.
- Thierry, A., Deutsch, S. M., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F. J., & Jan, G. (2011). New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 19–27.

## **Parti 2. Identification des composés antifongiques support**



- ***Contexte***

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des bactéries lactiques possédant des propriétés antifongiques, il existe une recherche permanente de composés impliqués dans cette activité. Beaucoup de travaux ont concerné l'identification des composés antifongiques produits par les bactéries lactiques, la méthodologie s'étant principalement portée sur le fractionnement guidé par dosage biologique afin de trouver un ou plusieurs composés responsables pour l'activité antifongique. Au fil du temps, de nombreux composés ont été considérés comme antifongiques. Bien que l'activité de ces composés ait été démontrée, les concentrations produites par les bactéries lactiques se sont avérées inférieures à leur concentration minimale inhibitrice (MIC) (Clément et al., 2008; Huang et al., 2010; Sjogren et al., 2003; Yoon, 2016). Certaines études ont montré que les combinaisons de composés produits augmentent l'activité antifongique, ce qui indique un effet synergique entre les composés (Corsetti et al., 1998; Schwenninger et al., 2008). Les études récentes excluent les étapes fractionnement ; les échantillons sont traités et étudiés par des techniques de chromatographie et de spectrométrie de masse permettant d'identifier et de quantifier plusieurs composés connus (Brosnan et al., 2012). Les bactéries lactiques produisent une grande variété de composés antifongiques classés en acides organiques, acides gras libres, composés volatils et peptides, leur permettant de jouer un rôle actif dans la conservation des produits laitiers fermentés.

Dans des travaux précédents, il a été montré que la composition du milieu impacte la production du composé antifongique étudié et en conséquence l'activité antifongique (Bustos et al., 2018; Schmidt et al., 2017; Valerio et al., 2016). Ces études sont principalement réalisées par l'ajout des précurseurs d'un composé antifongique spécifique. Les résultats de la première partie de cette thèse, des combinaisons de souches ont également montré une activité antifongique différente en fonction du produit laitier considéré.

- ***Questionnement***

Les produits laitiers présentant une composition plus complexe que la plupart des milieux synthétiques, cette deuxième partie visait à déterminer qualitativement et/ou quantitativement les composés, produits par les combinaisons sélectionnées, potentiellement supports de l'activité antifongique observée dans les différents produits laitiers (Q4).

- ***Stratégie de recherche***

Dans cette partie de la thèse, nous avons utilisé 4 techniques de chromatographie, couplées ou non à la spectrophotométrie de masse, pour quantifier les différents composés connus pour leur activité antifongique (acides organiques, AGL et composés volatils). Nous avons utilisé une approche ciblée pour quantifier 52 composés correspondants à des acides organiques et gras libres, et une approche non ciblée pour déterminer les composés volatils. Ces composés ont été déterminés dans les 4 produits laitiers testés dans la première partie de cette thèse (*i.e.* modèle fromage, yaourt, crème fraîche et pâte pressée à croûte morgée) avec ajout ou non des cultures antifongiques sélectionnées (A1, A2, A3) ou commerciales (X1, X2 et CC3). Les résultats de la première partie de cette thèse ont montré un effet du niveau de la population des cultures antifongiques et du temps d'affinage sur l'activité antifongique. Dans cette partie, nous avons donc étudié les composés antifongiques dans la crème fraîche avec différents niveaux de populations et dans le fromage à pâte pressée, avant et après 4 semaines d'affinage.

Des analyses statistiques ont été appliquées aux données de quantification obtenues pour identifier les composés produits par les cultures antifongiques A1, A2, A3, X1, X2 et CC3. Par « composé produit », nous avons considéré ceux quantifiés à des concentrations significativement ( $p < 0.05$ ) plus élevées comparé aux témoins sans culture antifongique. Finalement, des analyses discriminantes (AD) sur les analyses en composants principales (ACP) ont été réalisées pour identifier les composés potentiellement support de l'activité antifongique, observée dans la Partie 1, contre *M. racemosus* et *P. commune*. Pour réaliser cette analyse supervisée, nous avons établi 3 classes pour la variable qualitative d'inhibition (*i.e.* pas d'inhibition, inhibition moyenne et forte inhibition.).

Ce travail fait l'objet de l'Article 5 en préparation. Le manuscrit est présenté, ci-après.

## **Article 5**

**Identification and quantification of natural compounds  
produced by antifungal bioprotective cultures in dairy  
products**

# Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products

Marcia Leyva Salas<sup>1,2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Baptiste Rebours<sup>2</sup>, Florence Valence<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup> and Anne Thierry<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France. [marcia.leyvasalas@univ-brest.fr](mailto:marcia.leyvasalas@univ-brest.fr) (MLS); [jerome.mounier@univ-brest.fr](mailto:jerome.mounier@univ-brest.fr) (JM), [emmanuel.coton@univ-brest.fr](mailto:emmanuel.coton@univ-brest.fr) (EC)

<sup>2</sup>UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France. [florence.valence-bertel@inra.fr](mailto:florence.valence-bertel@inra.fr) (FV); [anne.thierry@inra.fr](mailto:anne.thierry@inra.fr) (AT); [marie-bernadette.maillard@inra.fr](mailto:marie-bernadette.maillard@inra.fr) (MM)

\*Correspondence: Dr. Anne Thierry

**Keywords:** *fatty acids, organic acids, volatile compounds, antifungal bioprotective cultures, sour cream, yogurt, cheese*



## Abstract

Fungi are commonly responsible for dairy product spoilage, which leads to substantial economic losses for the dairy industry as well as consumer dissatisfaction. In a context of chemical preservative reduction, lactic acid bacteria can play an active role in bioprotection of fermented dairy product due to their ability to produce a large range of antifungal metabolites. In a previous study, binary combinations of lactobacilli strains were selected as antifungal adjunct cultures as they proved to be active not only *in vitro* (in yogurt and cheese-mimicking model), but also *in situ* in products manufactured at a pilot scale (sour cream and semi-hard cheese). Using four different analytical methods including high performance liquid chromatography and gas chromatography combined or not with mass spectrometry, 53 compounds with known antifungal activity were detected in at least one of the four dairy products analyzed. These compounds varied both qualitatively and quantitatively according to the considered dairy product. Lactic, acetic and citric acids were the most abundant compounds, while most of the other compounds were in concentrations <100 mg/kg. Thirty-three compounds were in significantly higher concentrations ( $p$ . value < 0.05) in at least one of the dairy products inoculated with the tested antifungal cultures, compared to the controls. Depending of the dairy product, each antifungal culture produced a cocktail of 1 to 27 compounds at a higher abundance than in the respective control products. Among the latter compounds, diacetyl, acetic, hydroxyphenyllactic, pyruvic, phenyllactic, succinic, and decanoic acids, and some long chain unsaturated free fatty acids were the most were part of more than one cocktail. A linear discriminant analysis showed that acetic, benzoic, nonanoic and phenyl acetic acids, acetoin, diacetyl, 2-nonanone, 2-pentanedione and a non-identified volatile compound were associated with a high antifungal activity against the fungal targets *Penicillium commune* and *Mucor racemosus*. Overall, by analyzing the antifungal compounds in different dairy products, this study provides an expanded view of compounds with a potential role in the bioprotective activity of efficient antifungal cultures.

## Introduction

Dairy products constitute a favorable environment for the growth of fungal contaminants that leads to food waste, economic losses and brand image deterioration (Pitt and Hocking, 2009a). Molds and yeasts frequently found in contaminated dairy products belong to the *Penicillium*, *Mucor* and *Cladosporium*, and *Candida*, *Kluyveromyces* and *Yarrowia* genera, respectively (Pitt and Hocking, 2009; Garnier et al., 2017).

To control fungal contaminants in the dairy industry, both preventive and control methods are used. The hurdle technologies are implemented to prevent contamination or recontamination during product manufacturing and/or to inhibit or slow down the growth of fungal contaminants. During processing and storage, good hygiene practices, a hazard analysis critical control point (HACCP) system, air and surfaces decontamination, cleanroom technologies, heat treatment, refrigeration and brining can prevent and control contamination (Fellows 2000). In addition, additives such as benzoate, propionate, sorbate and natamycin can be added to dairy products to extend their shelf-life, according to the relevant legislation (Silva and Lidon 2016). However, consumer preference for preservative-free, more natural and less processed food has led to the study of preservation alternatives such as biopreservation. Biopreservation corresponds to the use of microorganisms (bioprotective cultures) or their metabolites exhibiting antimicrobial activities to extend food shelf-life and/or increase food safety (Stiles 1996).

Lactic acid bacteria (LAB) are good candidates for biopreservation as they have a long history of safe use in various dairy products such as fermented milks, kefir, or cheese (Stiles 1996). In this context, several antifungal bioprotective LAB cultures are available on the market to be used in dairy products (e.g. Holdbac -DuPont Danisco-, FreshQ -CHR Hansen-). The production of antifungal molecules and pH decrease are the main factors contributing to LAB antifungal activity in foods (Leyva Salas et al. 2017). LAB produce lactic and acetic acid as the main fermentation end-products. Lactic acid *per se*, despite being produced at high quantities, is not very effective against spoilage fungi in contrast to acetic acid (Dagnas et al. 2015). Nevertheless, acetic acid minimal inhibitory concentrations (MIC) is increased in the presence of lactic acid, indicating that they can act in synergy (Dagnas et al. 2015). Despite this, the latter mentioned acids are not sufficient to explain the antifungal activity of LAB. LAB can also produce a variety of compounds in low concentrations and below their individual MIC, which are also likely to act in synergy with lactic and acetic acids (Dagnas et al. 2015; Honoré et al.

2016). The nature of the antifungal compounds corresponds to other organic acids, fatty acids, cyclopeptides, reuterin, hydrogen peroxide, and volatile compounds such as diacetyl (Crowley et al., 2013a; Leyva Salas et al., 2017; Sjogren et al., 2003).

In a recent study, 3 binary combinations of lactobacilli with antifungal activity were selected after an *in vitro* screening in yogurt and cheese models and the applicability of two of them as bioprotective cultures in dairy products was validated at a pilot-scale after incorporation in sour cream and semi-hard cheese production (Leyva Salas et al. 2018). The aim of the present study was to identify the compounds potentially responsible for their observed antifungal activity in dairy products. For that purpose, different analytical methods, including liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry, were applied to detect and quantify antifungal compounds, followed by statistical analyses.

## **Materials and methods**

### ***Microorganisms and culture conditions***

The strains constituting three binary combinations namely, *Lactobacillus plantarum* L244, *Lactobacillus harbinensis* L172, *Lactobacillus brevis* L128 and *L. rhamnosus* CIRM-BIA113 were obtained from the Université de Bretagne Occidentale (UBOCC, France) and CIRM-BIA (INRA, France) culture collections. Moreover, three strains isolated on de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) agar from commercial bioprotective cultures (*Lactobacillus paracasei* CIRM-BIA1759 and *Lactobacillus rhamnosus* CIRM-BIA1761 from commercial culture CC1, and *Lactobacillus plantarum* CIRM-BIA1758 from commercial culture CC2) were used as reference antifungal strains. Culture X1 corresponded to a 1:1 combination of *L. paracasei* CIRM-BIA1759 and *L. rhamnosus* CIRM-BIA1761 strains, while culture X2 corresponded to *L. plantarum* CIRM-BIA1758 alone. Another commercial culture (CC3) was also used as detailed in Leyva Salas et al. (2018). All strains were stored at -80°C in MRS broth (BD Difco laboratories, Sparks, MD, USA) supplemented with glycerol (20%) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Before inoculation as adjunct cultures, strains were cultivated twice in MRS broth at 30°C for 24 h. Culture concentration was then adjusted to the target concentrations using sodium chloride peptone broth (Merck, Darmstadt, Germany). After centrifugation, the cells were suspended in sterile skimmed milk.

## ***Dairy products preparation***

The cheese model and yogurt were prepared as previously reported (Leyva Salas et al. 2018) with the antifungal cultures A1, A2, A3, X1 and X2 added at  $2.10^7$  colony forming unit (CFU)/mL together with the starter cultures. The cheese model was prepared as detailed by Garnier et al. (2018). Briefly, 10 mL of heat-treated salted 0.7% (w/w) ultrafiltered milk retentate was poured into 60-mL sterile polypropylene containers. Rennet, starter culture MA016 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *L. lactis* subsp. *lactis*, Elimeca, Thoissey, France) and cell suspensions in milk of the antifungal strains at a final concentration of  $10^7$  CFU/mL of each strain forming the binary combinations was added to the cheese. The containers were then incubated for 1 h at 30°C then for 3 days at 20°C, leading to a final pH of  $4.8 \pm 0.1$ . The yogurt was prepared from semi-skimmed milk (Candia, France) supplemented with skimmed milk powder at 4% (Carrefour, France). After heat treatment for 30 min at 85°C, milk was rapidly cooled to 45°C before adding 0.1 g/L of the lyophilized starter culture MY800 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, Choozit, Danisco, Sassenage, France). After homogenization, the preparation was distributed into sterile polypropylene containers (10 mL/container) and the antifungal strain suspensions were added under the same conditions as for the cheese model. Containers were then incubated at 42°C during 4 h, until pH  $4.97 \pm 0.03$  was reached. At the end of the yogurt and cheese model fermentation, the exudate formed was removed and samples were stored at -20°C.

Samples from sour cream and semi-hard cheese produced at pilot scale with the A1, A3, X1 or CC3 antifungal cultures in the previous study (Leyva Salas et al. 2018) were stored at -20°C before analysis. Sour cream (final fat 35 %) was produced from pasteurized (75°C for 20 s), cow milk as previously described by (Leyva Salas et al. 2018). It was inoculated with the Choozit MM100 starter culture (Danisco, Sassenage, France) at 3 U/100 L and the antifungal combinations A1 or A3 (at either  $10^6$ ,  $5.10^6$  or  $2.10^7$  CFU/mL) or the X1 combination ( $10^6$  CFU/mL) before packaging in 100 g plastic tubs with mobile lids and incubated for 22 h at 23°C. Sour cream samples were stored at -20°C before antifungal molecules analyses. Semi-hard cheese was manufactured from pasteurized (72°C for 20 s), standardized cow milk as previously described (Leyva Salas et al. 2018). Antifungal cultures were added at  $5.10^6$  CFU/mL (each strain at  $2.5.10^6$  CFU/mL for the A1 and A3 combinations and the commercial culture CC3) with the commercial starter. Samples of semi-hard cheese were stored at -20°C



before ripening (Ch<sub>i</sub>) and after 4 weeks of ripening at 12°C (Ch<sub>f</sub>) before antifungal compound analyses.

Control samples corresponded to the yogurt, cheese model, sour cream and semi-hard cheese containing only the corresponding commercial starters. Yogurt and cheese model were tested in triplicate, sour cream and semi-hard cheese manufactured in duplicate per assay performed on separate weeks (2 assays per product).

### ***Antifungal compounds analysis***

Samples were extracted and injected once for the High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight mass spectrometry (LC-Q-ToF) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) analyses. For the quantification of free fatty acids by Gas Chromatography – Flame Ionization Detector (GC-FID), samples were extracted once and injected twice.

#### ***Quantification by HPLC***

Cheese model and semi-hard cheese were first blended with MilliQ water (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) using a stomacher (Merck Eurolab, Strasbourg, France) (1:2 and 2:3 w/v, respectively). The obtained suspensions were then centrifuged at 10 000 g for 30 min and supernatants were diluted (2:1 and 1:5 v/v ratios) with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to reach 5 mM final concentration and stored overnight at -20°C. Sour cream and yogurt samples were directly dissolved at proportion of 2:1 and 1:5 w/v with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to reach 5 mM. After thawing, all samples were centrifuged at 10 000 g for 30 min, the upper phase recovered, filtered with PTFE membrane (0.45 µm pore size, Fisher Scientific) and centrifuged again in centrifugal concentrators (Vivaspin 6 Polyethersulfone, 10 kDa, Sartorius, Göttingen, Germany) at 4 000 g for 5 min. Samples were then poured in 2-mL vials for analysis. The compounds were separated using a HPLC Dionex system (Sunnydale, CA, USA) equipped with a Aminex HPX-87H column (Biorad, Hercules, CA, USA), using 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase, and detected using both UV (210 nm) and refractometer detectors. In order to quantify organic acids at high concentrations and low concentrations, the two prepared dilutions were injected for each sample. The compounds were identified and quantified using standard solutions (concentrations ranging from 0.06 to 1 mg/mL) of acetic, benzoic, butyric, citric, hydroxyphenyllactic, lactic,

phenylpropionic, phenyllactic, propionic, pyruvic, succinic and 2-pyrrolidone-5-carboxylic acids.

### ***Quantification of organic acids by LC-Q-ToF***

The standard preparation, extraction, detection quantification and analyses were performed as detailed by Garnier *et al.* submitted. Briefly, a total of 31 compounds with known antifungal activity were searched for as previously described (Brosnan *et al.*, 2012, 2014; Le Lay *et al.*, 2016a), Garnier *et al.* submitted) (Table 1). For sample preparation, 10 g of each dairy product were first blended in sterile bags with 9 mL of water for mass spectrometry (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) using a stomacher (Merck Eurolab, Strasbourg, France). Then, 10 mL of the resulting suspensions were mixed with 4 g of MgSO<sub>4</sub>, 1 g of NaCl and 10 mL ethyl acetate supplemented with 1% of formic acid. The obtained mixtures were then vigorously shaken and centrifuged for 10 min at 8500 g at 4 °C. The organic phase was transferred into a dSPE tube (dispersive Solid Phase Extraction, Agilent technologies), vortexed and centrifuged for 10 min at 2600 g. The liquid phase was then recovered in a 15 mL tube, mixed with 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and evaporated under nitrogen gas until a volume of 100 µL corresponding to the added DMSO. The 100-µL volume (non-volatile under nitrogen gas) were reconstituted with 900 µL of H<sub>2</sub>O/acetonitrile (90/10, v/v), filtered at 0.22 µm and stored in amber vials at -20°C until analysis. The liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-ToF) quantification was performed with the use of a system equipped with a binary pump 1260 Infinity binary HPLC, an online degasser, an autosampler and a thermostated column compartment coupled with a 6540 Q-ToF-MS with a Dual ESI source (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Sample (10 and 50 µL) were injected in a Zorbax Extend-C18 column (201 x 150 mm, 5 µ) equipped with a pre-column (2.1 x 12.5 mm, 5 µ) (Agilent technologies) at 30°C. The mass spectrometer was operated in negative electrospray ionization mode. Separation of compounds was by binary solvent gradient (A: water with 10 mM ammonium formate and 0.1% formic acid; B: acetonitrile with 0.1% formic acid). Identification and quantification were achieved using a matrix-matched calibration curve. This calibration curve was built by diluting the standard mix of the 31 compounds at 0, 1, 5, 10, 30, and 50 ppm in a blank extract of acidified semi-skimmed milk (adjusted to pH 5 with lactic acid).

### ***Quantification of free fatty acids by GC-FID***

Free fatty acids were extracted and quantified with the method described by De Jong and Badings (1990) with some modifications by Thierry et al. (2006). Briefly, 10 g for yogurt or sour cream samples, or 1 g for cheese model or grated semi-hard cheese were first mixed with 3 g of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Then, 0.3 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2.5 M), 1 mL of internal standards and 15 mL of ether/heptane (1:1) were added before centrifugation (3 min at 1000 g). The organic layer was recovered in a 100 mL flask containing 1g of anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to capture residual water. The obtained pellet was suspended in 15 mL of ether/heptane (1:1) and centrifuged (3 min at 1000 g). This step was repeated 3 times by pooling the organic layers.

Free fatty acid purification was performed with a Manifold, using a SPE (Solis Phase Extraction) 500-mg column Strata NH<sub>2</sub> (Phenomenex, UK) conditioned with 10 mL heptane. The organic layer was transferred onto the column and 10 mL heptane/2-propanol (3:2) were added for neutral lipids removal. Free fatty acids were eluted with 5 mL ether diethyl with 2% formic acid and transferred in an amber vial. Free fatty acids were quantified by gas chromatography (Varian CP-3800) equipped with a flame ionization detector (FID) and a capillary column (BP21 25m x 0.53 mm, layer 0.5 µm, JW Scientific, Folsom, USA). Vector gas was dihydrogen at 9.7 mL/min. A temperature gradient was applied from 65 to 240°C with a ratio of 10°C/min then 10 min at 240°C using direct injection. Quantification was performed using standard calibration curves with the Agilent OpenLAB ChemStation.

The internal standard solution contained 3 standards at 0.5 g/L: heptanoic acid (C7:0), undecanoic acid (C11:0) and heptadecanoic acid (C17:0). Calibration curves were established based on the correction factors against each internal standard. The short-chain acids (acetic to hexanoic acids) were calculated against C7:0, the mid-chain acids (octanoic to tetradecanoic acids) against C11:0, and the long-chain acids (hexadecanoic to eicosanoic acids.) against C17:0.

### ***Volatile compounds analysis of by GC-MS***

Dairy product samples were transferred into 22-mL Perkin Elmer vials (2.5 g per vial) and stored at -80°C until headspace (HS) trap extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses. HS-trap-GC-MS was performed using a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment and a Clarus 680 gas chromatograph coupled to a Clarus 600T quadrupole mass spectrometer (PerkinElmer, Courtaboeuf), as described by Pogačić et al. (2015) with some modifications. Volatile compounds were separated on a Stalbilwax MS capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Restek), with helium as mobile phase. The mass spectrometer was operated within a mass range of  $m/z$  29-206 and ionisation impact of 70 eV.

Volatile compounds were identified by comparison to standards, retention indexes and/or the mass spectral data from the NIST 2008 Mass Spectral Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA). GC-MS data were processed as described by Pogačić et al. (2015). Briefly, raw data files were converted to time- and mass-aligned chromatographic peaks areas using the XCMS open source package implemented with the R statistical language (Smith et al. 2006). Volatiles were quantified using the abundance of one selected mass fragment ( $m/z$ ), in arbitrary units.

In order to quantify some volatile compounds (*i.e.* diacetyl, 2,3-pentanedione, 2-heptanone, 2-nonanone and 2-undecanone), aliquot of standards were first mixed together, diluted in methanol and then in water prior to be spiked in a non-fermented cheese model and in cream containing sodium azide at 0.02% w/w to prevent microbial development. Standard concentrations in both products ranged from 6 to 1 502 ppb. The standard preparation, and cheese model, yogurt, sour cream and semi-hard cheese samples with or without the antifungal cultures were analyzed by HS-trap-GC-MS as described above. The calibration curve for individual volatile compounds was built up by plotting the signal abundance of each compound against the concentration. Then concentrations of these five volatile compounds in the dairy products were calculated from the linear regression of each calibration curve. Calibrations curves of standards diluted in the cheese model were used to quantify the compounds in cheese model and semi-hard cheese, while those diluted in cream were used to quantify volatile compounds in yogurt and sour cream.

### ***Statistical analysis***



Statistical analyses were performed using the R software (Free Software Foundation's GNU General Public License) and the FactoMineR package (Lê, Josse, and Husson 2008).

Analysis of variance (ANOVA) was applied to determine whether the presence of an antifungal cultures significantly influenced the antifungal compound concentration. Means were then compared using a Fisher's least significant difference (LSD) test. The ANOVA and LSD tests were applied on data obtained from the LC-Q-ToF, HPLC, GC-FID and CG-MS analyses to determine the compounds in significantly higher concentrations ( $p\text{-value} < 0.05$ ) in the dairy products with antifungal cultures compared to the controls (i.e. with no antifungal culture added).

Principal component analysis (PCA) was performed with the concentrations determined for all the antifungal compounds and antifungal activity as variables, for the four dairy products (including semi-hard cheeses before -Ch<sub>i</sub>- and after 4 weeks of ripening -Ch<sub>r</sub>-), using the PCA function of the FactoMineR R package. A discriminant analysis (DA) was performed to identify the compounds discriminating the samples according to the intensity of antifungal activity against *Penicillium commune* and *Mucor racemosus* (based on the data from Leyva Salas et al. 2018). To do so, three groups of inhibition were defined: i) no inhibition: growth of the fungal target without delay, regardless of the inhibition score of 0 to 2, ii) slight inhibition: inhibition score of 3 (total inhibition) for 1 or 2 days compared to the negative control, and iii) high inhibition: inhibition score of 3 (total inhibition) for more than 2 days compared to the negative control (for more details about the antifungal evaluation see Leyva Salas et al. (2018)). To ensure that variables submitted to DA were perfectly uncorrelated, the coordinates of the samples on PCA on the data set of the four tested dairy products (yogurt, cheese model, sour cream, and semi-hard cheese before ripening), done as a prior step to DA, were used as variables. DA was performed by using the *lda* function of the MASS R package.

## **Results**

### ***Antifungal compounds detected***

#### ***Antifungal organic acids quantified***

Out of the 56 antifungal compounds targeted using HPLC, LC-Q-ToF and GC-FID analyses, 33 compounds were detected in at least one dairy product, while 23 were below their limit of detection (LOD) (Table 1). Most of the compounds (27 out of 33) were detected in the four

tested dairy products. Five compounds were quantified/qualified by more than one chromatographic method. For the latter compounds, the results from quantification by LC-Q-ToF-MS were chosen because MS provided lower limits of quantification (LOQ) and a higher identification accuracy compared to HPLC-UV-refractometry. As for GC, GC-FID was chosen rather than GC-MS because the GC-FID results were obtained as absolute concentrations.

The detected organic and free fatty acids were in abundant, moderate and low concentrations as shown respectively in Figures 1A, B and C. The most abundant organic acids and free fatty acids in the 4 dairy products (Figure 1A) correspond to ~95% of the total concentration of all the detected antifungal compounds. These compounds were lactic, citric, acetic, succinic and hexadecanoic acids. Their concentrations varied depending on the considered dairy product and ranged from 5.6 to 16.9 g/kg for lactic acid, 0.2 to 3.4 g/kg for citric acid, 0.04 to 0.9 g/kg for acetic acid, 0.02 to 0.4 g/kg for succinic acid and 0.03 to 0.2 g/kg for hexadecanoic acid (Figure 1A). Compounds at intermediary concentrations represented together between 1 and 5% of the total concentration of antifungal compounds. These compounds were 5 organic acids and 4 fatty acids and were present in concentrations above 10 mg/kg in at least one of the products (Figure 1B). Finally, 12 organic acids and 7 free fatty acids were detected at concentrations lower than 5 mg/kg (Figure 1C).

In general, as shown in Figure 1, the detected organic and free fatty acids were at higher concentrations in semi-hard cheese followed by cheese model and the lowest was in yogurt and sour cream. Concentrations of the 12 detected free fatty acids also differed according to the considered product as shown in Figure 1. They were at higher concentrations in semi-hard cheese and sour cream and the lowest in yogurt.

### ***Profile of volatile compounds***

The untargeted GC-MS approach led to the detection of 27 to 35 volatile compounds, depending on the dairy product. Twenty of these volatile compounds, shown in Table 2, were described in the literature for their antifungal properties (Aunbjerg et al., 2015; Crowley et al., 2013a; de Bok et al., 2011; Hashem et al., 2016). A non-identified volatile compound (VX) was retained because it was detected in significantly higher abundance in yogurt, cheese model and sour cream with antifungal cultures compared to controls. This compound presented 87, 88 and 55 *m/z* fragments and a retention time of 21.25 min and a Kovats retention index of 1272.

### ***All detected compounds***

A global picture of the concentrations of the 53 detected compounds in all samples (cheese model, yogurt, sour cream, and semi-hard cheeses before and after 4 weeks of ripening), with antifungal cultures and controls, is provided by the PCA shown in Figure 2. The first two components account for 68 % of the total variance and clearly distinguished the four dairy products, regardless of the presence or not of antifungal cultures. PC1, accounting for 43.4% of the total variance, separated cheese model and yogurt from semi-hard cheeses and sour cream. Semi-hard cheeses and sour creams were negatively related to PC1 with high concentrations of most of the free fatty acids (*i.e.* C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C16:1 and C18:1). PC2, accounting for 24.6% of the total variance, separated sour cream samples from the other products, related to lower concentrations in AZA, HPLA, HPPA, LA and PLA. Semi-hard cheeses, in particular after ripening, were associated with the highest concentrations of some free fatty acids and volatile compounds, and most of the organic acids (*e.g.* AC, C2, PCA, MV, HiC6, LA, HPPA, HPLA, PLA, and AZA). In contrast, yogurt and cheese model were associated with the highest concentrations of most of the volatile compounds including HTN, NN, PD and ACTN, and a few organic acids.

The antifungal activities of the cultures selected in the study of (Leyva Salas et al. 2018) and active against *Penicillium commune* and *Mucor racemosus* were projected on the PCA as supplementary variables (Figure 2) in order to visualize their potential correlation. The variables were “score” and “days” against each fungal target. The score corresponds to the observed intensity of the inhibition that ranged from 0 (no inhibition) to 3 (total inhibition) and the “days” corresponds to the days of total inhibition until fungal growth was visible (for more details see Leyva Salas et al. 2018). In the 2018 (Leyva Salas et al. 2018) study, antifungal cultures showed the highest antifungal activity in sour cream. The antifungal activity “scores and days) was not correlated to any compound on the first PCA dimensions (Figure 2). In order to determine the compounds potentially responsible for the observed antifungal activity, statistical analyses were performed to identify the compounds produced by the antifungal cultures (ANOVA) and the compounds correlated to the antifungal activity as shown below hereafter (DA).

### ***Antifungal compounds produced by the antifungal cultures***

Out of the 53 volatile and non-volatile compounds detected in the dairy products, 33 compounds were at significantly higher concentrations ( $p$ . value  $<0.05$ ) in at least one of the dairy products with the antifungal cultures A1, A2, A3, X1, X2 and/or CC3 compared to the controls (Tables 1 & 2). These 33 compounds are therefore produced by the antifungal cultures. Six of these compounds were detected at significantly higher concentrations in the four dairy products: acetic acid, HPLA, HPPA, HCA, PCA and diacetyl. The group of compounds produced by each antifungal cultures are here named as cocktails.

Each antifungal culture was associated with a distinct cocktail of antifungal compounds, which differed in the 4 dairy products as shown in Figures 3 and 4. The cocktails of compounds produced by A1, A2, A3, X1, and/or CC3 in each of the 4 dairy products are illustrated by four Venn diagrams shown in Figure 3.

In cheese model, 17 compounds, in cocktails of 7 to 16, were produced by A1, A2, A3 or X1, with A1 producing the highest number (Figure 3). In yogurt, 16 out of 25 compounds were found in higher concentrations with A1, followed by A3, X1 and A2 compared to controls (Figure 3). In sour cream, 7 out of the 8 compounds produced in sour cream were produced by A1, and only 2 of them by A3 (Figure 3). In unripened semi-hard cheese, 13, 12, and 6 compounds were produced by A1, A3 and CC3 antifungal cultures, respectively (Figure 3). Regardless of the dairy product, concentrations of most of the organic acids and free fatty acids are slightly different between the antifungal cultures. Concentrations of the compounds forming the cocktails slightly varied between the antifungal cultures as shown in Figure 3 for some compounds. Moreover, in the 4 dairy products, acetic acid was produced by A1 at the highest concentrations, 6 and ~2.5 times higher in yogurt and in the 3 other products, respectively, compared to the controls (Figure 4).

In cheeses, fifteen antifungal compounds increased in concentration during ripening by a factor ranging from 1.3 to 15, as illustrated in Figure 5 for some selected compounds. Six out of the 20 compounds produced by antifungal cultures in semi-hard cheeses were only detected at significant higher concentrations in ripened semi-hard cheeses ( $Ch_f$ ), namely 2-pyrrolidone-5-carboxylic, succinic, butyric, hydroxydecanoic, benzoic and lactic acids (Table 1). Some compounds increased in concentrations during ripening in all cheeses including the controls, while some others increased only in the presence of antifungal cultures (Figure 5). Differences were also observed between the antifungal cultures. For example, as shown in Figure 5, the concentrations of AC, C2, HPLA, PLA, SA, and PCA in cheeses before ripening were the



highest in the presence of A1 and 1.8 to 11 times higher than in the controls. On the other hand C2, PLA and SA reached the highest concentrations in A3 cheeses after ripening.

Inoculation level of the antifungal cultures impacted the concentration of 8 out of the 31 compounds A1 and A3 produced in sour cream: acetoin, diacetyl, acetic acid, VX, PCA, HPPA, HPLA and PLA. The higher the inoculation level, the higher the concentration was, as illustrated in Figure 6. In contrast, the concentrations of succinic and citric acids decreased when the inoculated populations of antifungal cultures increased (data not shown).

In order to quantify the volatile compounds, five volatile compounds produced by A1 were quantified in the 4 dairy products with A1 and controls, namely diacetyl, 2-heptanone, 2-nonanone, 2,3-pentanedione and 2-undecanone (Table 3). These volatile

### ***Identification of the most probable antifungal compounds by discriminant analysis***

Discriminant analyses were performed to identify the antifungal compounds which best discriminated the samples according to the observed level of inhibition (no inhibition / slight inhibition / strong inhibition). Two fungal targets were considered, *M. racemosus* and *P. commune*, and discriminant analyses were first performed with the whole dataset (4 dairy products, Figure 7). The first axis of the DA plot separated the samples in which no inhibition was observed, from those in which inhibition was slight to strong. Inhibition was mainly associated with higher concentrations of diacetyl. The second axis separated the slight and the high levels of inhibition, and was associated with pyruvic acid and HPLA. Since both the observed antifungal activity (Leyva Salas et al. 2018) and the antifungal compound concentrations (Figures 1 and 2) varied according to the dairy product, DAs were also done by considering the data of each dairy product individually, and the corresponding results are summarized in Table 4. The high concentrations of diacetyl, acetic acid, non-identified volatile VX, 2-nonanone and 2,3-pentanedione were linked to a strong inhibition of both fungal targets. Nevertheless, there were also product-specific and fungal target-specific compounds. For example, in sour cream, HCA, HPLA, diacetyl, PAA, lactic acid and pyruvic acid while diacetyl, AC, VX, HCA CC2 and C15:0 are linked to strong antifungal activity against *P. commune* and *M. racemosus*, respectively.

## Discussion

In this study, four dairy products including a cheese model, yogurt, sour cream, and semi-hard cheese with or without antifungal bioprotective cultures (Leyva-Salas et al., 2018) were analyzed to identify the potential antifungal compounds produced *in situ* and involved in the observed activity. Since microbial antifungal activity can result from a large panel of active molecules belonging to various chemical families (Crowley et al., 2013a) and exhibiting different chemical properties (hydrophobicity, volatility), several extraction methods coupled to different chromatographic methods were used, including both targeted (for organic acids and free fatty acids) and non-targeted approaches (for volatile compounds). The targeted compounds result from different types of metabolic pathways: fermentation of lactose and citrate present in dairy products, lipolysis, and/or amino acid and free fatty acid catabolism.

Lactic and acetic acids were the most abundant fermentation products and their antifungal activity is well documented (Bian et al. 2016; Gerez et al. 2010; Lind, Jonsson, and Schnürer 2005). Lactic and acetic acid minimal inhibitory concentrations (MIC) corresponded to 180 and 12 g/kg against *P. commune* and *M. racemosus* in PDA-pH 5 (Mounier, personal communication). Concentrations observed in the 4 dairy products with antifungal cultures and controls were 6 to 20 times below the latter MIC, suggesting that lactic and acetic acids found in high concentrations alone cannot explain the observed antifungal activity, even if lactic and acetic acid can act in synergy on fungi (Dagnas et al. 2015).

The antifungal activity of weak organic acids depends on the pH of the product and their pKa. The pKa is the pH at which 50% of the acid are in the dissociated and 50% in the undissociated forms, the latter form being able to diffuse through the membrane of fungal contaminants as mechanism of antifungal activity (Theron and Lues 2011; Coton and Leguerinel 2014). Therefore, in cheese model, yogurt and semi-hard cheese with a pH of 4.7 to 5, lactic acid with a pKa of 3.9 is unlikely to be responsible for the observed antifungal activity, while in sour cream with a lower pH of 4.2, lactic acid is likely to participate in the antifungal activity observed. In contrast, acetic acid, with a pKa of 4.75, could have a role in the antifungal activity of A1, which produced the highest concentrations of acetic acid in the 4 products. The concentrations of pyruvic and succinic acids were significantly higher in semi-hard cheese with A1, A3 and/or CC1, but their pKa (4.21 and 2.45, respectively) are far below cheese pH (5), thus decreasing their potential antifungal activity.

Most of the free fatty acids and non-hydroxylated organic acids produced by A1, A2, A3, X1 and/or CC3 were present at low concentrations (<100 mg/kg). The non-hydroxylated phenyllactic acid is a well-known antifungal compound produced by LAB and propionibacteria. The MIC of the phenyllactic acid produced by 2 *L. plantarum* was 10 mg/kg against *P. anomala*, *P. roqueforti* and *Aspergillus fumigatus*. Other non-hydroxylated compounds as mevalonolactone, methylcinnamic acid, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid, 3-phenylpropionic acid and phenyl acetates showed MIC ranging from 0.5 to 1 mg/kg (Ryan et al. 2011; Broberg et al. 2007; Yoon 2016).

Saturated and unsaturated fatty acids produced by LAB have previously been shown to exhibit antifungal activities. For example, decanoic, octanoic, hexadecanoic, octadecanoic acids and their unsaturated forms inhibited fungi from the *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* and *Candida* genera at low MIC ranging from 0.01 to 0.5 mg/kg in glycerol agar (pH5) (Huang et al. 2010; Sjogren et al. 2003) and from 0.3 to 34 mg/kg in Sabouraud agar (Clément et al. 2008).

Hydroxylated compounds are more likely to disrupt the fungal membrane than non-hydroxylated compounds (Pohl, Kock, and Thibane 2011). In a recent study, it was hypothesized that compounds resulting from fermentation as acetic acid and lactic acid and six hydroxylated compounds, including 2-hydroxy-3-phenylpropanoic acid and 4-hydroxyphenyllactic acid, were responsible for the antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* cell-free supernatant against *Penicillium* spp. (Honoré et al. 2016). Four other hydroxylated compounds (3-hydroxydecanoic acid, 3-hydroxy-5-*cis*-dodecenoic acid, 3-(*R*)-hydroxydodecanoic acid and 3-(*R*)-hydroxytetradecanoic acid) present in *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 supernatant showed MIC ranging from 10 to <100 mg/L in malt extract broth against different fungal contaminants (Sjogren et al. 2003). Other compounds such as hydrocinnamic and 3-hydroxydecanoic acids were in higher concentrations in silage inoculated with the antifungal *L. plantarum* strains compared to the non-inoculated one (Broberg et al. 2007) and MIC were between 0.1 and 1.0 mg/kg against *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus fumigatus*.

Volatile compounds have recently shown a non-negligible role in antifungal activity (Aunsbjerg et al. 2015; Gotor-Vila et al. 2017). Fermented dairy products contain many volatile compounds apart from diacetyl. For example, when the antifungal strain *L. paracasei* DGCC 2132 was added in yogurt together with the starter culture, a marked increase in diacetyl was observed after 7h fermentation at 43°C (1 mg/L with no antifungal vs. 5 mg/L with *L. paracasei*)

(Aunbjerg et al. 2015). Other volatile compounds slightly increased with the addition of *L. paracasei* DGCC 2132 but diacetyl was shown to be responsible for the observed antifungal activity against *Penicillium solitum* (Aunbjerg et al. 2015). In the present study, diacetyl was at concentrations 2 to 6 times higher in the presence of antifungal cultures in cheese model, yogurt, sour cream and semi-hard cheese (13.4, 3.7, 3.3 and 6.2 mg/kg, respectively) compared to the controls. Noteworthy, an unidentified volatile compound, named VX here, was found in 3 dairy products (cheese model, yogurt and sour cream) at 4 to 10 higher amounts in the presence of the antifungal culture A1 compared to the controls. Identification of this compound and study of its antifungal potential would be of interest in the future. Other volatile compounds detected in the present study resulted from different pathways naturally occurring during fermentation of dairy products. For example, 2,3-pentanedione, 2-heptanone and 2-nonanone have frequently been reported in dairy products, including milk, fermented milk, and cheese (de Bok et al. 2011). Moreover, some antifungal volatiles, such as diacetyl and short-chain fatty acids, contribute to cheese flavor (Curioni and Bosset 2002) and could thus be involved in flavor changes in biopreserved dairy products.

LAB produce aroma compounds from carbohydrate metabolism, amino acid catabolism, fat hydrolysis and free fatty acid catabolism (Smid and Kleerebezem 2014). All the detected volatile compounds result from these metabolic pathways (Table 2). Concerning carbohydrate metabolism, citrate utilization results in an excess of pyruvate, which can thus be converted to diacetyl and 2,3-butanediol to equilibrate the redox balance of cellular metabolism. Some LAB can also synthesize 2,3-pentanedione from pyruvate and threonine (Thierry et al. 2015). Citrate concentrations in all products were lower when the antifungal cultures were added, In this study, an increase of some volatile compounds produced by the antifungal cultures was observed at the end of ripening as expected, suggesting that the AF cultures remained active, even if their population did not increase during the corresponding period (data not shown).

In this work, we tried to establish possible correlations between the cocktails potentially responsible for the antifungal activity of selected cultures (Leyva-Salas et al. 2018) through the discriminant analysis.

In a previous study (Leyva Salas et al. 2018), the antifungal cultures A1, A2 and A3 showed a similar inhibition of *P. commune* in cheese model and yogurt. The compounds found in the intersection of diagrams of A1, A2 and A3 (Figure 3) in cheese model (HPPA, HPLA, PLA, HCA, PY, C18:0, C18:1, VX, UDN) and yogurt (acetic acid, HCA, C10:0, C12:0, C16:0) could



thus inhibit *P. commune*. The high concentrations of most of these compounds were associated with a slight or strong antifungal activity against *P. commune*, as a result of the discriminant analysis. In cheese model, only A1 and A2 strongly inhibited *G. geotrichum* and *Y. lipolytica*, two resistant yeasts, while A3 only slightly inhibited these yeasts. Thus, the inhibition of these latter may be related to the high production of HPLA by A1 and A2 (concentration 6 and 4 times higher compared to the controls for A1-A2 and A3, respectively). In cheese model and yogurt, A1 inhibited 6 other fungal targets for a longer time compared to A2 and A3. Based on this result, fatty acids appear as good candidates to explain the wider spectrum of A1 in these two products.

This is in sour cream that the antifungal cultures showed the highest antifungal activity. Moreover, *P. commune* was inhibited for a longer time by A1 than by A3. Therefore, the compounds produced by A1, most of them being correlated to a strong antifungal activity as shown by the discriminant analysis (*i.e.* HPLA, HCA, PCA, acetic acid, acetoin, diacetyl and VX) could act synergistically to highly inhibit the fungal targets.

In semi-hard cheese, A1 and A3 produced in common a cocktail of 12 compounds (acetic acid, HPPA, HCA, acetoin, MV, HPLA, PLA, PY, NN, UDN, HTN and diacetyl), but the concentrations of these compounds were higher in A1 cheeses compared to A3. Interestingly, the antifungal culture A1 previously showed similar, and for some fungi, higher antifungal activity compared to CC3 commercial cultures (Leyva Salas et al. 2018). Thus, the concentration of the cocktail of compounds produced by A1 could play a role in its higher antifungal activity. Such hypothesis is well supported by the discriminant analysis results as most of these compounds were associated with slight (acetic acid, HPPA, HPLA, MV, PLA) or strong inhibition (D).

Antifungal proteinaceous compounds were produced by several lactobacilli strains, e. g. *L. plantarum* IS10, ALAC-4 and YML007, *L. brevis* NCDC 02, *L. paracasei* M3 (Ahmad Rather et al., 2013; Atanassova, 2003; Chen et al., 2018; Falguni et al., 2010; Muhialdin et al., 2016). Concerning the selected antifungal cultures, further studies will be needed to determine whether proteinaceous compounds may also be involved with the observed antifungal activity.

The analyses performed in this study showed that 33 compounds, corresponding to organic acids, free fatty acids and volatile compounds, were produced differently, qualitatively and quantitatively, according to the tested dairy products and antifungal cultures. Moreover, the 22

compounds produced in common by A1 and A3 in at least one of the dairy products at the concentrations produced by A1 may potentially be specifically responsible for its antifungal activity. These 2 antifungal cultures have been proposed as biopreservative cultures (Leyva Salas et al. 2018). The results of discriminant analyses showed that different cocktails of some compounds at high concentration were associated to an antifungal activity. This study demonstrates the complexity of the production of antifungal compounds in food matrices such as dairy products and is a valuable source of cocktails of antifungal compounds for investigation of antifungal properties of lactic acid bacterial cultures. Finally, the antifungal activity of the identified compounds, alone and in cocktails, in dairy products should be further investigated.

### **Acknowledgements**

This work was financially supported by the Conseils Régionaux de Bretagne and des Pays de la Loire, France (grants N°13008651 and N°2014-01081, respectively) in the framework of the PROFIL interregional project under the scientific coordination of INRA (J. Leonil) and managed by the Bretagne Biotechnologie Alimentaire (BBA) industrial association. We thank Stéphane Pezenec, INRA, for help in statistical analyses.

## References

- Ahmad Rather, I., Seo, B. J., Rejish Kumar, V. J., Choi, U.-H., Choi, K.-H., Lim, J. H., et al. (2013). Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 69–76. doi:10.1111/lam.12077.
- Atanassova, M. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 63–73. doi:10.1016/S0168-1605(03)00054-0.
- Aunsbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., et al. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 46–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007.
- Bian, X., Muhammad, Z., Evvie, S. E., Luo, G.-W., Xu, M., and Huo, G.-C. (2016). Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control* 66, 183–189. doi:10.1016/j.foodcont.2016.02.004.
- Broberg, A., Jacobsson, K., Strom, K., and Schnurer, J. (2007). Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5547–5552. doi:10.1128/AEM.02939-06.
- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E. K., and Furey, A. (2012). Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2983–2995. doi:10.1007/s00216-012-5955-1.
- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E. K., and Furey, A. (2014). The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures. *Talanta* 129, 364–373. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.006.
- Chen, Z., Li, X., and Gao, H. (2018). Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus plantarum* ALAC-4 isolated from Inner Mongolian traditional fermented dairy food. *Int. J. Dairy Technol.* 71, 223–229. doi:10.1111/1471-0307.12426.
- Clément, M., Tremblay, J., Lange, M., Thibodeau, J., and Belhumeur, P. (2008). Purification and Identification of Bovine Cheese Whey Fatty Acids Exhibiting *in vitro* Antifungal Activity. *J. Dairy Sci.* 91, 2535–2544. doi:10.3168/jds.2007-0806.
- Coton, E., and Leguerinel, I. (2014). “ECOLOGY OF BACTERIA AND FUNGI IN FOODS | Effects of pH,” in *Encyclopedia of Food Microbiology* (Elsevier), 577–586. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00439-0.
- Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004.

- Curioni, P. M. G., and Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* 12, 959–984. doi:10.1016/S0958-6946(02)00124-3.
- Dagnas, S., Gauvry, E., Onno, B., and Membré, J.-M. (2015). Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. *J. Food Prot.* 78, 1689–1698. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-046.
- de Bok, F. A. M., Janssen, P. W. M., Bayjanov, J. R., Sieuwerts, S., Lommen, A., van Hylckama Vlieg, J. E. T., et al. (2011). Volatile Compound Fingerprinting of Mixed-Culture Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6233–6239. doi:10.1128/AEM.00352-11.
- De Jong, C., and Badings, H. T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 94–98. doi:10.1002/jhrc.1240130204.
- Falguni, P., Shilpa, V., and Mann, B. (2010). Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 70–76. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00553.x.
- Fellows, P. (2000). *Food processing technology: principles and practice*. 2nd ed. Cambridge, England : Boca Raton, FL: Woodhead Pub. ; CRC Press.
- Garnier, L., Leyva Salas, M., Pinon, N., Wiernasz, N., Pawtowski, A., Coton, E., et al. (2018). Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2017-13518.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Obregozo, M. D., and Font de Valdez, G. (2010). A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. *J. Food Prot.* 73, 758–762.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., et al. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006.
- Hashem, M., Alamri, S. A., Alrumman, S. A., and Moustafa, M. F. (2016). Suppression of phytopathogenic fungi by plant extract of some weeds and the possible mode of action. *Br Microbiol Res J* 15, 1–13.
- Honoré, A. H., Aunsbjerg, S. D., Ebrahimi, P., Thorsen, M., Benfeldt, C., Knøchel, S., et al. (2016). Metabolic footprinting for investigation of antifungal properties of *Lactobacillus paracasei*. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 83–96. doi:10.1007/s00216-015-9103-6.
- Huang, Y., Wilson, M., Chapman, B., and Hocking, A. D. (2010). Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. *Food Microbiol.* 27, 33–36. doi:10.1016/j.fm.2009.07.017.
- Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Choiset, Y., et al. (2016). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid



- bacteria and propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). **FactoMineR** : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 5, 37. doi:10.3390/microorganisms5030037.
- Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., et al. (2018). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01787.
- Lind, H., Jonsson, H., and Schnürer, J. (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria--contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 157–165. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.020.
- Muhialdin, B. J., Hassan, Z., Bakar, F. A., and Saari, N. (2016). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* 59, 27–30. doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.022.
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: Springer US Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92207-2> [Accessed March 24, 2016].
- Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A. L., et al. (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* 46, 145–153. doi:10.1016/j.fm.2014.07.018.
- Pohl, C. H., Kock, J. L., and Thibane, V. S. (2011). Antifungal free fatty acids: a review. *Sci. Microb. Pathog. Curr. Res. Technol. Adv.* 1, 61–71.
- Ryan, L. A. M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., and Arendt, E. K. (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 276–283. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036.
- Silva, M., and Lidon, F. (2016). Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric.*, 1. doi:10.9755/ejfa.2016-04-351.
- Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J., and Kenne, L. (2003). Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7554–7557. doi:10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003.
- Smid, E. J., and Kleerebezem, M. (2014). Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 313–326. doi:10.1146/annurev-food-030713-092339.

- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. doi:10.1021/ac051437y.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Theron, M. M., and Lues, J. F. R. (2011). *Organic acids and food preservation*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Thierry, A., Maillard, M.-B., Richoux, R., and Lortal, S. (2006). Ethyl Ester Formation Is Enhanced by Ethanol Addition in Mini Swiss Cheese with and without Added Propionibacteria. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6819–6824. doi:10.1021/jf060673m.
- Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., and Lortal, S. (2015). “Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods,” in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, eds. F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 314–340. doi:10.1002/9781118868386.ch19.
- Yoon, M.-H. (2016). Production and antifungal effect of 3-phenyllactic acid (PLA) by lactic acid bacteria. *J. Appl. Biol. Chem.* 59, 173–178.

**Table 1. Targeted antifungal compounds and corresponding detection methods used.**

Ab.	Compound IUPAC name (common name)	CAS	Or.	Method	CM	Y	SC	Chi	Chf
C2	ethanoic acid (acetic acid)	64-19-7	C	1*,3,4	•	•	•	•	•
C4	butanoic acid (butyric acid)	107-92-6	L	1, 3*, 4	+	+	+	+	•
iC4	2-methylpropionic acid (isobutyric acid)	79-31-2	AA	1, 4*	-	-	-	-	-
iC5	3-methylbutanoic acid (isovaleric acid)	503-74-2	AA	2*, 4	-	-	+	+	+
C6:0	hexanoic acid (caproic acid)	142-62-1	L	1, 3*, 4	+	+	+	+	+
C7:0	heptanoic acid	111-14-8	L	3*, 4	-	-	-	-	-
C8:0	octanoic acid (caprylic acid)	124-07-2	L	3*, 4	+	•	+	+	+
C9:0	nonanoic acid	112-05-0	L	3*, 4	-	-	-	-	-
C10	decanoic acid (capric acid)	334-48-5	L	3	+	•	+	+	+
C11:0	undecanoic acid	112-37-8	L	3	-	-	-	-	-
C12:0	dodecanoic acid	143-07-7	L	3	+	•	+	+	+
C14:0	tetradecanoic acid (myristic acid)	544-63-8	L	3	+	+	+	+	+
C15:0	pentadecanoic acid	1002-84-2	L	3	•	+	+	+	+
C16:0	hexadecanoic acid (palmitic acid)	57-10-3	L	3	+	•	+	+	+
C16:1	9-hexadecenoic acid (palmitoleic acid)	373-49-9	L	3	•	•	+	+	+
C18:1	(9Z)-9-octadecenoic acid (oleic acid)	112-80-1	L	3	•	•	+	+	+
C18:0	octadecanoic acid (stearic acid)	57-11-4	L	3	•	•	+	+	+
C18:2	(9Z,12Z)-9,12-octadecadienoic acid (linoleic acid)	60-33-3	L	3	•	•	+	+	+
C18:3	(9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid (linolenic acid)	463-40-1	L	3	-	-	-	-	-
C19:0	nonadecanoic acid	646-30-0	L	3	-	-	-	-	-
C20:0	eicosanoic acid (arachidic acid)	506-30-9	L	3	-	-	-	-	-
AGA	N-acetyl-D-glucosamine	7512-17-6	AA	2	-	-	-	-	-
AZA	nonanedioic acid (azelaic acid)	64-19-7	C	2	-	-	-	-	+
BPH	2,4 di-tert-butylphenol	96-76-4	AA	2	-	-	-	-	-
BZA	benzenecarboxylic acid (benzoic acid)	65-85-0	AA	1, 2 *	+	+	+	+	•
CA	2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid (citric acid)	77-92-9	C	1	+	+	+	+	+
CY	cytidine	65-46-3	AA	2	-	-	-	-	-
DCY	2'-deoxycytidine	951-77-9	AA	2	-	-	-	-	-
DHB	1,2-dihydroxybenzene (catechol)	120-80-9	AA	2	-	-	-	-	-
DHC	3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid)	331-39-5	AA	2	-	-	-	-	-
DHHC	3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid (hydrocaffeic acid)	1078-61-1	AA	2	-	-	-	-	-
FA	4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid)	1135-24-6	AA	2	-	-	-	-	-
GA	D glucuronic acid	6556-12-3	AA	2	-	-	-	-	-
HBZ	4-hydroxybenzoic acid	99-96-7	AA	2	-	-	-	-	-
HC10	3-hydroxydecanoic acid	5561-87-5	FFA	2	•	+	+	+	•
2HC12	2-hydroxydodecanoic acid (2-hydroxylauric acid)	2984-55-6	FFA	2	+	+	-	-	-
3HC12	3-hydroxydodecanoic acid (3-hydroxylauric acid)	1883-13-2	FFA	2	+	+	+	+	+
HC14	3-hydroxytetradecanoic acid (3-hydroxymyristic acid)	3422-31-9	FFA	2	+	+	-	-	-
HCA	3-phenylpropionic acid (hydrocinnamic acid)	501-52-0	AA	1, 2*	•	•	•	•	•
4HCA	trans-4-hydroxycinnamic acid ( <i>p</i> -coumaric acid)	501-98-4	AA	2	-	-	-	-	-
HiC6	2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (hydroxyisocaproic acid)	13748-90-8	AA	2	+	•	+	•	•
HMPPA	3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propionic acid	1135-23-5	AA	2	-	-	-	-	-
HPLA	3-(4-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid	6482-98-0	AA	1, 2 *	•	•	•	•	•
HPPA	3-(4-hydroxyphenyl) propionic acid	501-97-3	AA	2	•	•	•	•	•
LA	DL-lactic acid	50-21-5	C	1	+	+	+	+	•
MCA	(2E)-2-methyl-3-phenylacrylic acid ( $\alpha$ -methylcinnamic acid)	1199-77-5	AA	2	+	•	-	-	-
MV	4-hydroxy-4-methyltetrahydro-2H-pyran-2-one (mevalonolactone)	19115-49-2	C	2	+	•	+	•	•
PAA	phenyl ethanoate (phenyl acetate)	122-79-2	AA	1, 2*	+	•	•	+	+
PCA	2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (DL-pyroglyutamic acid)	149-87-1	AA	1	•	•	•	+	•
PLA	(S)-2-hydroxy-3-phenylpropionic acid (phenyllactic acid)	828-01-3	AA	1, 2 *	•	•	+	•	+
PPA	propanoic acid (propionic acid)	79-09-4	C	1*,4, 3	-	-	-	-	-
PY	2-oxopropanoic acid (pyruvic acid)	127-17-3	C	1	•	•	+	•	•
RA	(R,Z)-12-Hydroxyoctadec-9-enoic acid (ricinoleic acid)	141-22-0	FFA	2	-	-	-	-	-
SA	butanedioic acid (succinic acid)	110-15-6	C	1*,2	+	•	•	+	•
SAA	2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid)	69-72-7	AA	1, 2	-	-	-	-	-
VA	4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid)	121-34-6	AA	2	-	-	-	-	-

(Ab.) = abbreviations. Compound name according to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenclature followed by trivial name. Identification and quantification method: (1) HPLC coupled to UV or refractometer detectors; (2) LC-Q-ToF; (3) GC-FID, and/or (4) GC-MS. (\*) chosen quantification for statistical analysis. Pathway of origin (Or.): (L) lipolysis, (C) carbohydrate metabolism, (AA) amino acid metabolism or (FFA) free fatty acid metabolism. (+) Detected compounds, and (•) significantly higher in each product with A1, A2, A3, X1, X2 and/or CC3 compared to controls, (-) not detected or at concentrations < LOD in cheese model (CM), yogurt (Y), sour cream (SC) and semi-hard cheese before ripening (Chi) and after 4 weeks of ripening (Chf).

**Table 2. Volatile compounds and their corresponding retention index, quantification ion and CAS number**

Ab.	Compound (trivial name)	m/z	Identification	RI	CAS	Or.	CM	Y	SC	Chi	Chf
AC	3,2-hydroxybutanone (acetoin)	88	S, RI, DB	1274	513-86-0	C	+	•	•	•	+
ACTN	2-propanone (acetone)	58	RI, DB	811	67-64-1	C	•	+	+	+	•
BTN	2-butanone	72	RI, DB	895	78-93-3	C	+	+	+	+	
BZH	benzaldehyde	106	S, RI, DB	1511	100-52-7	AA	•	+	+	+	+
C2	acetic acid	60	S, RI, DB	1451	64-19-7	C	•	•	•	•	+
C4	butanoic acid	60	S, RI, DB	1624	107-92-6	L	+	+	+	+	•
C6	hexanoic acid	60	S, DB	N/A	142-62-1	L	+	+	+	+	+
C7	heptanoic acid	87	S, DB	N/A	111-14-8	L	+	+	-	-	
C8	octanoic acid	101	S, DB	N/A	124-07-2	L	+	+	+	+	+
C9	nonanoic acid	115	S, DB	N/A	112-05-0	L	+	+	-	+	+
D	2,3-butanedione (diacetyl)	86	S, RI, DB	970	431-03-8	C	•	•	•	•	+
DMS	dimethyl sulfone	79	DB	N/A	67-71-0	AA	+	+	+	+	+
HTN	2-heptanone	58	S, RI, DB	1178	110-43-0	FFA	•	+	+	•	•
iC4	2-methylpropanoic acid	73	S, RI, DB	1563	79-31-2	AA	-	-	-	+	+
iC5	3-methylbutanoic acid	60	S, RI, DB	1664	503-74-2	AA	-	-	-	+	+
mC5	3-methylpentanoic acid	74	DB	N/A	105-43-1	AA	+	+	-	-	
NN	2-nonanone	58	S, RI, DB	1378	821-55-6	FFA	•	+	+	•	•
PD	2,3-pentanedione	100	RI, DB	1042	600-14-6	C	+	•	-	-	
UDN	2-undecanone	58	RI, DB	1588	112-12-9	FFA	•	+	-	•	•
VX	non-identified	87	N/A	1272	N/A	N/A	•	•	•	-	-

(Ab.) = abbreviations. Compound name according to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenclature followed by trivial name. Compounds identified on the basis of: (S), Retention time and mass spectrum from standard; (RI), retention index; (DB), mass spectral data Library NIST; (RI), Kovats retention index; (N/A), not applicable. (CAS), Chemical Abstract Service registry number. (Or.), Pathway of origin: (L) lipolysis, (C) carbohydrate metabolism, (AA), amino acid metabolism or (FFA) free fatty acid metabolism. (+) Detected compounds; (•) compound present at significantly higher concentration in the products with A1, A2, A3, X1, X2 and/or CC3 compared to controls, (-) not detected or at concentrations < LOD in (CM), cheese model; (Y), yogurt; (SC), sour cream; and (Chi) semi-hard cheese before ripening and (Chf) after 4 weeks of ripening. N/A, xxx

**Table 3. Quantification of 5 volatile compounds (mg/kg) in the 4 studied dairy products with the antifungal culture A1 and control.**

Volatile compound	m/z	LOD	LOQ	Cheese model		Yogurt		Sour cream		Cheese	
				A1	C	A1	C	A1	C	A1	C
diacetyl	86	0.06	0.2	13.4	3.7	3.7	1.91	3.3	0.6	6.2	-
2,3-pentanedione	57	0.001	0.004	0.01	0.01	0.2	0.2	-	-	0.01	0.02
2-heptanone	58	0.002	0.007	-	-	-	-	-	-	-	-
2-nonanone	58	0.01	0.04	-	-	1.3	0.3	4.0	1.5	-	-
2-undecanone	58	0.05	0.15	-	-	0.1	0.15	-	-	-	-

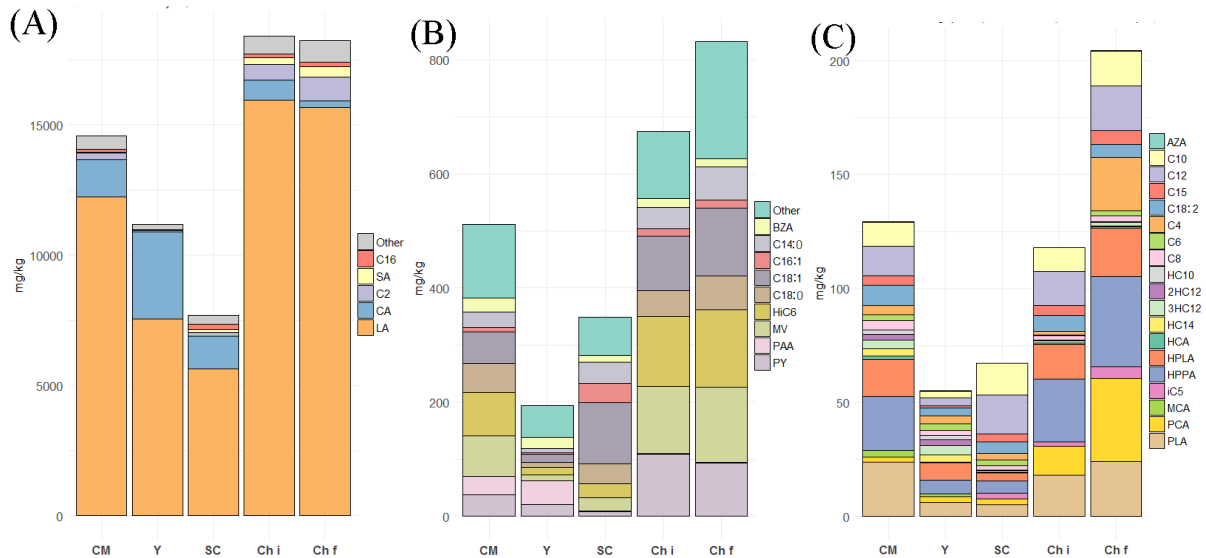
m/z= quantification ion. Dairy products with antifungal culture A1 or without (control, C). (-) Ions detected but quantity below the limit of detection (LOD) and quantification (LOQ)



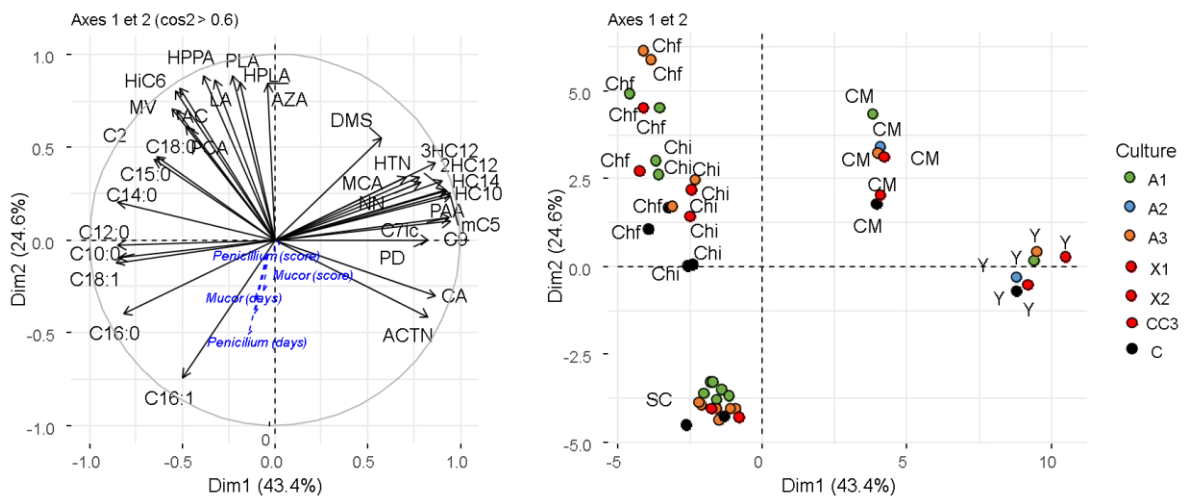
**Table 4. Compounds discriminating the level of inhibition observed for two fungal targets, *Mucor racemosus* and *Penicillium commune*, according to the results of the discriminant analyses performed on the compositional data of four dairy products, considered globally and individually.**

	All dairy products		Cheese model		Yogurt*	Sour cream		Semi-hard cheese*	
	<i>P. commune</i>	<i>M. racemosus</i>	<i>P. commune</i>	<i>M. racemosus</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. commune</i>	<i>M. racemosus</i>	<i>P. commune</i>	
Slight inhibition [1;2]	HPLA	BTN	HPLA	BTN		SA	C18:2	MV	
	PY	C18:2	PLA	C9		BTN	HC10	HPPA	
	C4:0	C14:0	HPPA			AC		BZA	
	MCA	C8	HCA			C15:0		C2	
	SA	PLA				C14:0		UDN	
	C15:0					C12:0		NN	
	C8:0							ACTN	
	HPPA							MCA	
	C14:0							HPLA	
	C12:0							PLA	
	PLA							LA	
	Strong inhibition (> 2)	D	D	VX	D	PCA	HCA	D	D
		VX	C2	D	VX	MCA	HPLA	AC	AC
C9		VX	NN	NN	SA	D	VX		
BZA		NN	PY	PD	PLA	PAA	HCA		
PD			PD	C2	D	LA	C2		
BZA					C2	PY	C15:0		
PAA					C10:0				
					C16:0				
					C9:0				
					HCA				
				HPLA					

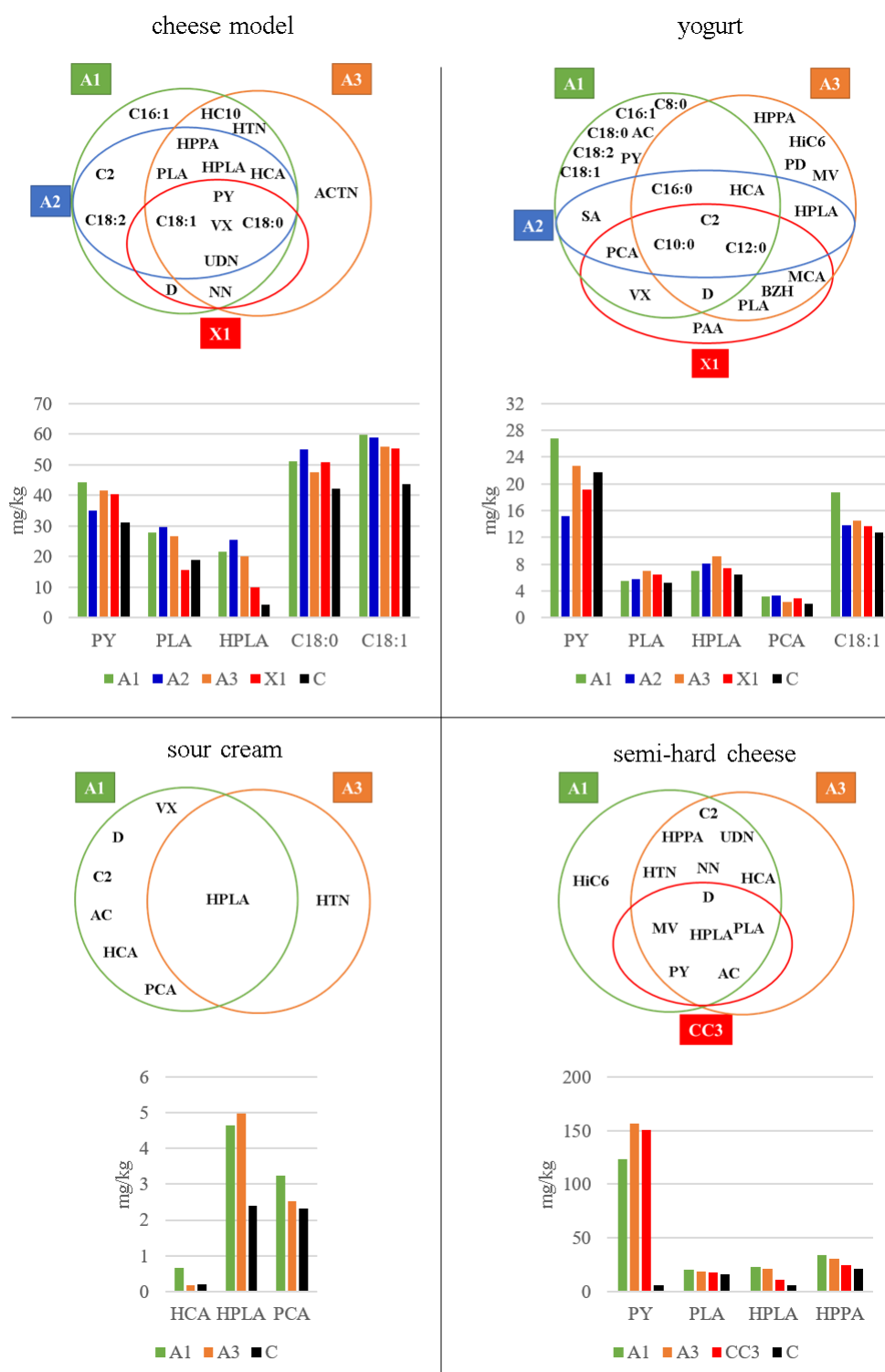
\$ see text for details; \*There was no inhibition of *M. racemosus* in yogurt and semi-hard cheese. For compound abbreviations see Tables 1 & 2



**Figure 18.** Means of organic and free fatty acid concentrations in mg/kg of (CM) cheese model, (Y) yogurt, (SC) sour cream and semi-hard cheese (Chi) before and (Chf) after 4 weeks ripening. (A), compounds at concentrations above 5% of all detected compounds in at least one dairy product; (B), compounds above 2% in at least one dairy product among the “others” shown in (A); (C) detail of the “others” shown in (B). See Table 1 for abbreviations

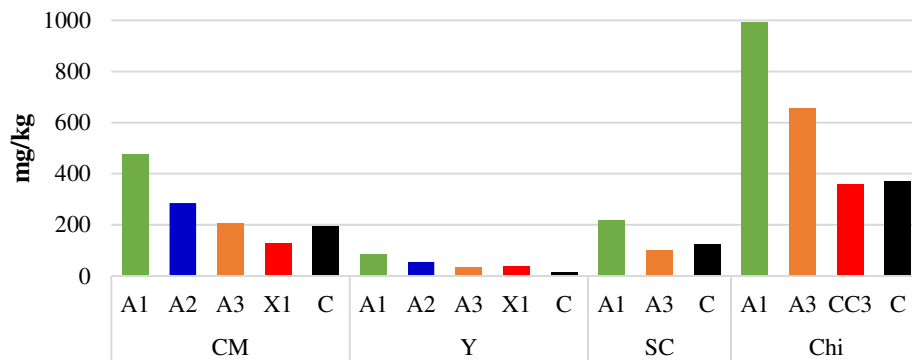


**Figure 2.** (A) Variable factor map and (B) Individual factor map of principal component analysis on 53 antifungal quantified in 4 dairy products (CM, cheese model; Y, yogurt; SC, sour cream; Chi, semi-hard cheeses before ripening and Chf after 4 weeks of ripening) inoculated with different antifungal cultures (A1, A2, A3, X1, X2, CC3) and in control (C) products without antifungal cultures. The score intensity of the inhibition and days of inhibition of two fungal targets, *Mucor racemosus* and *Penicillium commune*, are projected as supplementary variables (dotted blue lines). For compounds abbreviation see Tables 1 & 2. The variables poorly represented on this plot (square *cosinus* limit below 0.6) are not shown.

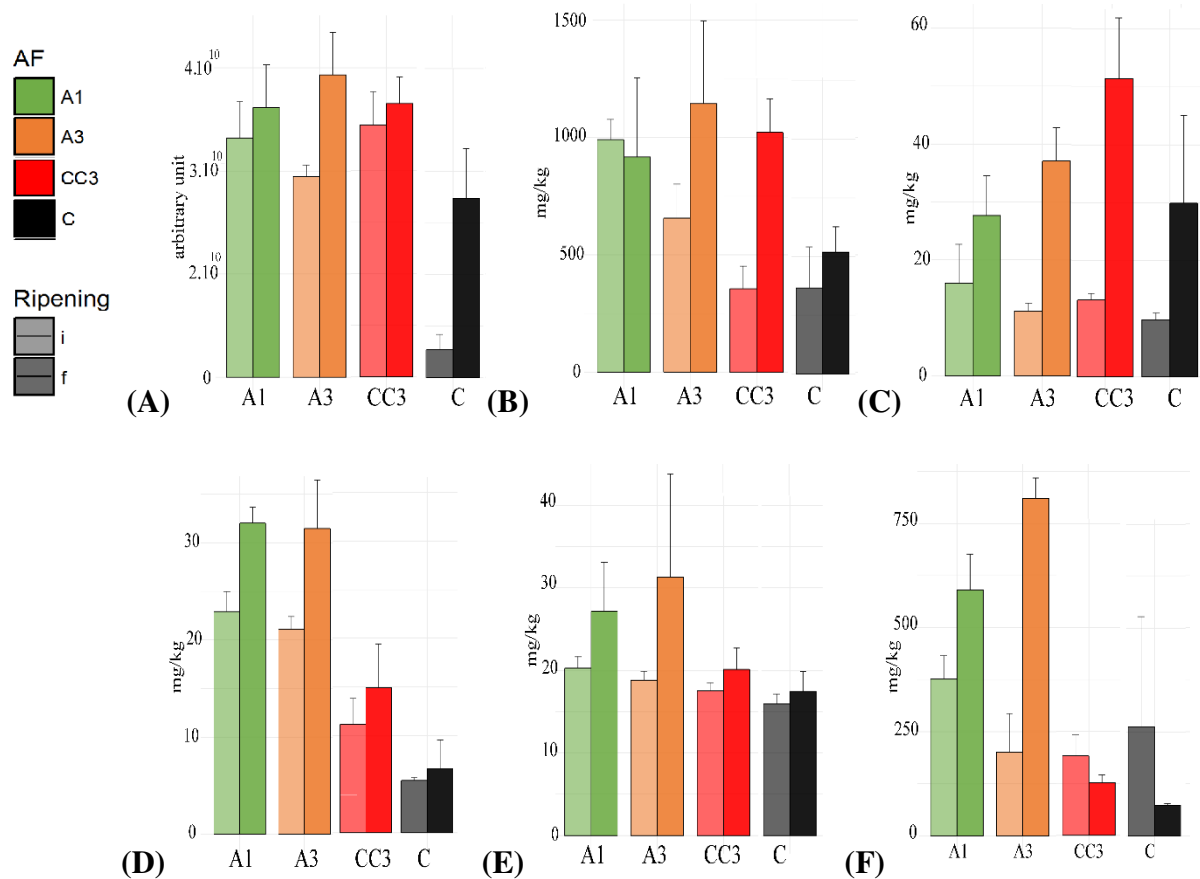


**Figure 3. Compounds produced by antifungal cultures A1, A3, X1 and CC3 in cheese model, yogurt, sour cream, and semi-hard cheese before ripening (Chi).**

Antifungal cultures inoculated at  $2.10^7$  CFU/mL except in semi-hard cheese ( $5.10^6$  CFU/mL). C are controls without antifungal cultures. For compound abbreviations see Tables 1 and 2. Compounds produced by the reference culture X2 are not shown because of its low antifungal activity (Leyva-Salas et al. 2018).



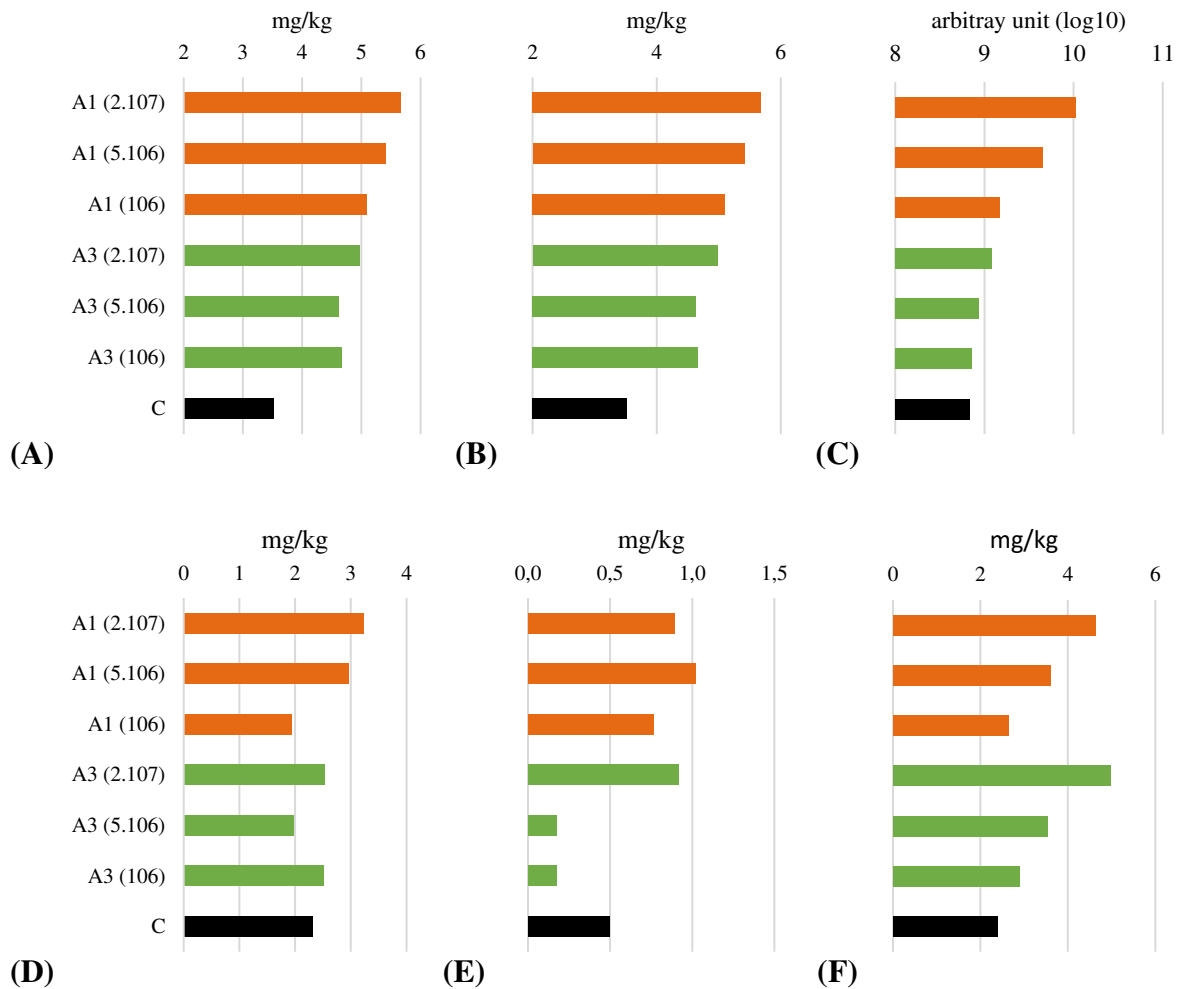
**Figure 4. Concentrations of acetic acid (mg/kg) in cheese model (CM), yogurt (Y), sour cream (SC) and semi-hard cheese before ripening (Chi) with antifungal cultures A1, A2, X1 and CC1, and in controls (C) without antifungal cultures.**



**Figure 5. Six compounds out of 20 produced by A1 in semi-hard cheeses.**

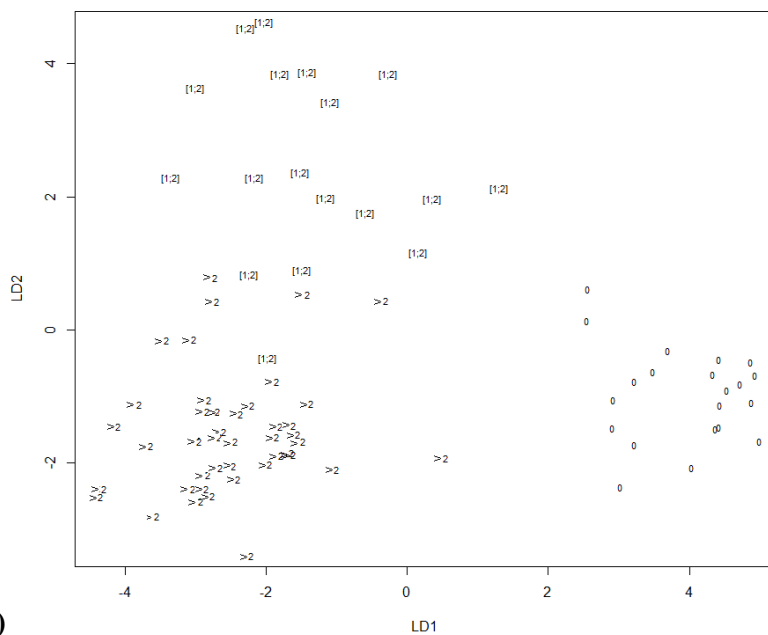
These compounds are higher in cheeses after 4 weeks of ripening (cheeses before ripening - dark colors - compared to the non-ripened cheeses - light colors). (A) acetoin, (B) acetic acid, (C) 2-pyrrolidone-2-carboxylic acid, (D) hydroxyphenyllactic acid, (E) phenyllactic acid and (F) succinic acid.



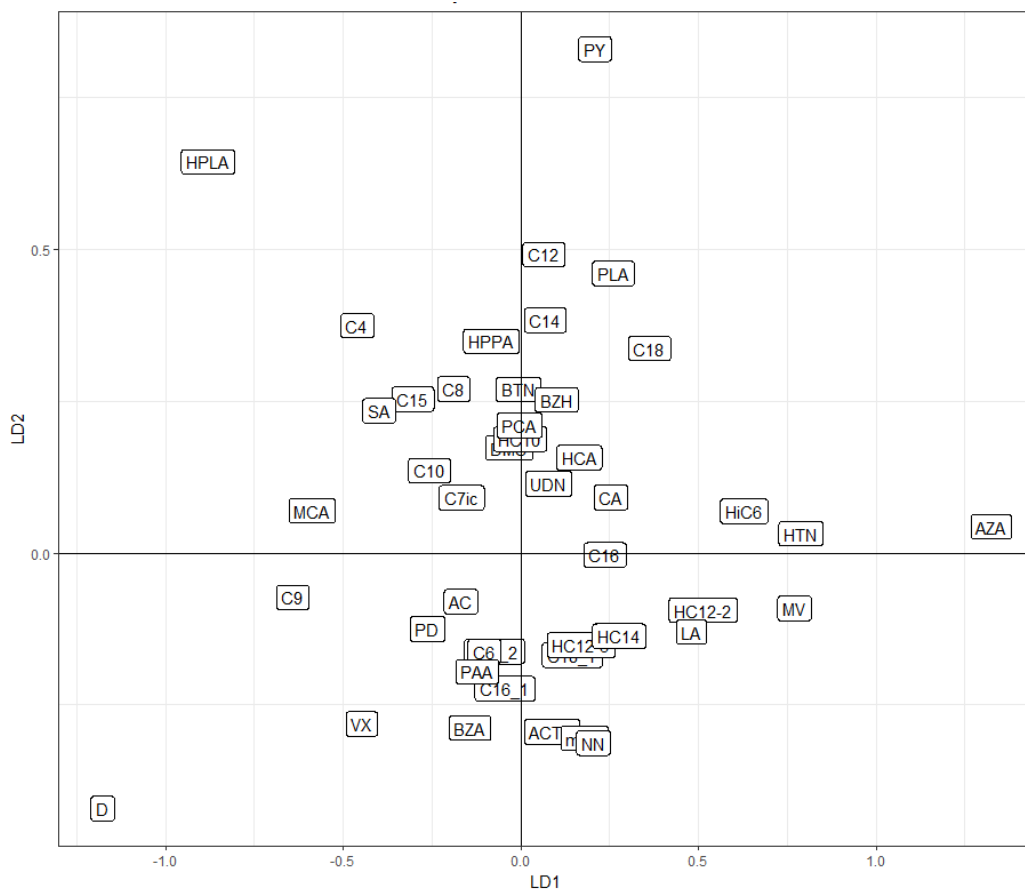


**Figure 6. Concentrations (mg/kg) of 6 compounds out of 8 that varied according to the inoculum level of the antifungal cultures in sour cream.**

A1 and A3 inoculated at 2.10<sup>7</sup>, 5.10<sup>6</sup> and 10<sup>6</sup> CFU/mL in sour cream. (A) acetic acid, (B) hydroxyphenyl propionic acid, (C) diacetyl in log<sub>10</sub> arbitrary units, (D) 3-pyrrolidone-5-carboxylic acid; (E) phenylacetic acid and (F) hydroxyphenyllactic acid



(A)



(B)

**Figure 719. Discriminant analysis map of compounds according to the inhibition of *Penicillium commune*.**

(A) Observations and (B) Variables. (0) no-inhibition, [1;2], slight inhibition, and (> 2) strong inhibition.. For abbreviations of compounds see Table 1 & 2.

- **Résultats majeurs**

- i. Identification des acides organiques, des AGL et des composés volatils**

L'utilisation de 4 méthodes chromatographiques (HPLC-UV/RI, LC-Q-ToF, GC-FID, GC-MS) a permis de détecter/quantifier 53 composés antifongiques (acides organiques, AGL et composés volatils) dans au moins 1 des 4 produits laitiers analysés (Tableaux 1 et 2 - Article 5). Les concentrations des composés varient fortement selon le produit laitier, mettant en évidence l'impact de la différence de nature physico-chimique de chaque produit et des couples temps/température de fermentation employés (Figure 2 - Article 5). Les acides lactique, acétique et citrique ont été détectés aux concentrations les plus élevées (>100 mg/kg) alors que les autres acides organiques, composés volatils et acides gras libres étaient présents à des concentrations nettement inférieures.

- ii. Composés antifongiques produits par les cultures antifongiques**

En dehors des variations marquées des concentrations des composés entre produits laitiers, le traitement des données par analyse de variance suivie de tests de comparaison de moyennes a montré des variations de concentrations de certains composés selon la culture antifongique utilisée. Ce sont 33 composés qui étaient en concentrations significativement ( $p > 0.05$ ) plus élevées en présence d'une ou plus des cultures antifongiques testées dans les produits laitiers analysés (Tableau 1 et 2 - Article 5). Parmi ces composés, 6 étaient produits par au moins une des cultures antifongiques dans les 4 produits laitiers : acides acétique, hydroxyphenyllactique, hydroxyphenylpropionique, hydrocinnamique et pyrrolidone-2-carboxylique ainsi que diacétyle.

L'ensemble des différents composés produits par les cultures antifongiques sont appelés dans ce document « cocktails de composés ». Les cocktails de composés étaient différents en nombre de composés (qualitatif) et en concentrations (quantitatif) selon la culture antifongique et le produit laitier considérés.

Chaque culture antifongique était associée à un cocktail distinct de composés antifongiques, et ce profil différait dans les 4 produits laitiers, (Figures 3 - Article 5). Les résultats des analyses statistiques ont montré que 17 composés en modèle « fromage » et 25 composés en yaourt ont été produits par A1, A2, A3, X1 et CC3, en cocktails de 7 à 16 composés selon la culture

antifongique. Ainsi les cultures A1, A2, A3 et commerciales, inoculées à  $2.10^7$  CFU/mL, ont produit 8 composés en crème fraîche et, à  $5.10^6$  UFC/mL, 13 composés en pâte pressée en cocktails de 2 à 13 composés, selon la culture antifongique.

En général, les concentrations des composés diffèrent légèrement entre les cultures antifongiques. La culture antifongique A1 a produit la plupart des composés à des teneurs ~1.5 à 6 fois plus élevées que celle des témoins dans les 4 produits laitiers. L'acide acétique était produit par la culture A1 à la concentration la plus élevée comparativement aux autres cultures antifongiques dans les 4 produits laitiers (de 2,5 à 6 fois plus élevée comparativement aux témoins, selon le produit laitier). De plus, dans les fromages à pâte pressée, les cultures A1, A3 et commerciales ont produit 20 à 28 fois plus d'acide pyruvique comparé au témoin. Dans la crème fraîche, A3 a produit seulement l'acide hydroxyphenyllactique qui est aussi produit par A1 alors que dans les autres 3 produits laitiers, les cultures A1, A2, A3 et commerciales avait entre 3 et 12 composés en commun. Indépendamment du produit laitier, A1 et A3 produisent 22 composés en commun sur un total de 30 composés produits par les 2 cultures.

Dans la crème fraîche, le niveau de population des cultures antifongiques A1 et A3 était à la concentration de 8 composés produits par les cultures antifongiques : l'acétoïne, le diacétyle, le phényle acétate, le volatil non-identifié (VX) et les acides acétique, pyrrolidone-2-carboxylique, hydroxyphenylpropionique et hydroxyphenyllactique. Les concentrations de 7 et 5 de ces composés sont apparues proportionnelles aux populations, respectivement, d'A1 et A3 (Figure 6 - Article 5).

La quantification des composés dans les fromages au début ( $Ch_i$ ) et après 4 semaines ( $Ch_f$ ) d'affinage a montré un effet du temps d'affinage sur la production des composés antifongiques. Pendant le temps d'affinage, 15 composés ont vu leurs concentrations augmenter d'1,5 à 15 fois plus par rapport au point  $Ch_i$ . Parmi ces composés, 7 ont aussi augmenté dans les fromages témoins, mais leur augmentation a été plus marquée dans les produits avec adjonction des cultures antifongiques.

### **iii. Composés antifongiques potentiellement support de l'activité antifongique**

Dans la première partie de cette thèse, il a été montré que l'activité antifongique variait selon la cible. En conséquence, l'AD sur l'ACP de tous les composés et des 4 produits laitiers a été faite par cible fongique dans lesquels les cocktails de composés, corrélés à l'inhibition de *P. commune* et *M. racemosus*, sont différents. Par exemple, parmi les 7 et 4 composés corrélés



respectivement à une forte inhibition de *P. commune* et *M. racemosus*, le diacétyle et VX sont les seuls en commun (Tableau 4 - Article 5).

Comme montré dans la partie I, l'inhibition des cibles fongiques, comme la production de composés, varient selon le produit laitier. Le tableau 4 de l'article 5 montre les différents cocktails de composés corrélés à l'inhibition de *P. commune* et *M. racemosus*, séparément et par produit laitier.

Les 33 composés produits par les cultures A1, A2, A3, X1, X2 et/ou CC3 dans les produits laitiers par rapport aux témoins sont des composés potentiellement support de l'activité antifongique. Ceci est conforté par les analyses discriminantes qui ont montré que la plupart de ces 33 composés étaient corrélés à une inhibition moyenne et forte inhibition de *P. commune* et *M. racemosus*.

- ***Impact scientifique***

Parmi les 52 composés identifiés/quantifiés par les 4 méthodes chromatographiques utilisées, 33 composés ont été produits par les cultures antifongiques A1, A2, A3, X1, X2 et/ou CC3 en quantités significativement plus élevées par rapport aux témoins. De plus, chacune des cultures antifongiques a produit un cocktail allant de 2 à 16 de ces composés, selon le produit laitier.

Les composés qui ont été le plus souvent trouvés dans les différents cocktails sont les acides acétique, hydroxyphenyllactique, pyruvique, phényllactique, succinique et décanoïque ainsi que le diacétyl, la 2-nonanone, le composé volatil VX et quelques acides gras non-saturés. La teneur en acide lactique, le composé le plus abondant dans les 4 produits laitiers, ne variait pas significativement en présence des cultures antifongiques, sauf pendant l'affinage. Cependant, d'après la littérature, il joue un rôle important dans l'activité antifongique globale, qui résulte d'une synergie entre les molécules.

L'étude de différentes cultures antifongique dans 4 produits laitiers a confirmé l'impact, aux niveaux qualitatifs et quantitatifs, du milieu de croissance sur la production de composés antifongiques.

Cette étude a fourni une vue étendue de la diversité des cocktails de composés produits par les cultures antifongiques utilisées comme ferment additionnels dans les produits laitiers. Mais il faut noter que tous ces composés ont été aussi retrouvés dans les produits laitiers contrôles.

Finalement, la plupart des composés corrélés à une inhibition moyenne et forte inhibition de *P. commune* et *M. racemosus* font partie des cocktails produits par les cultures antifongiques. Néanmoins, leur part respective dans l'activité antifongique de différentes cultures antifongiques reste encore à déterminer.

---

## **Chapitre III. Discussion générale et perspectives de travail**

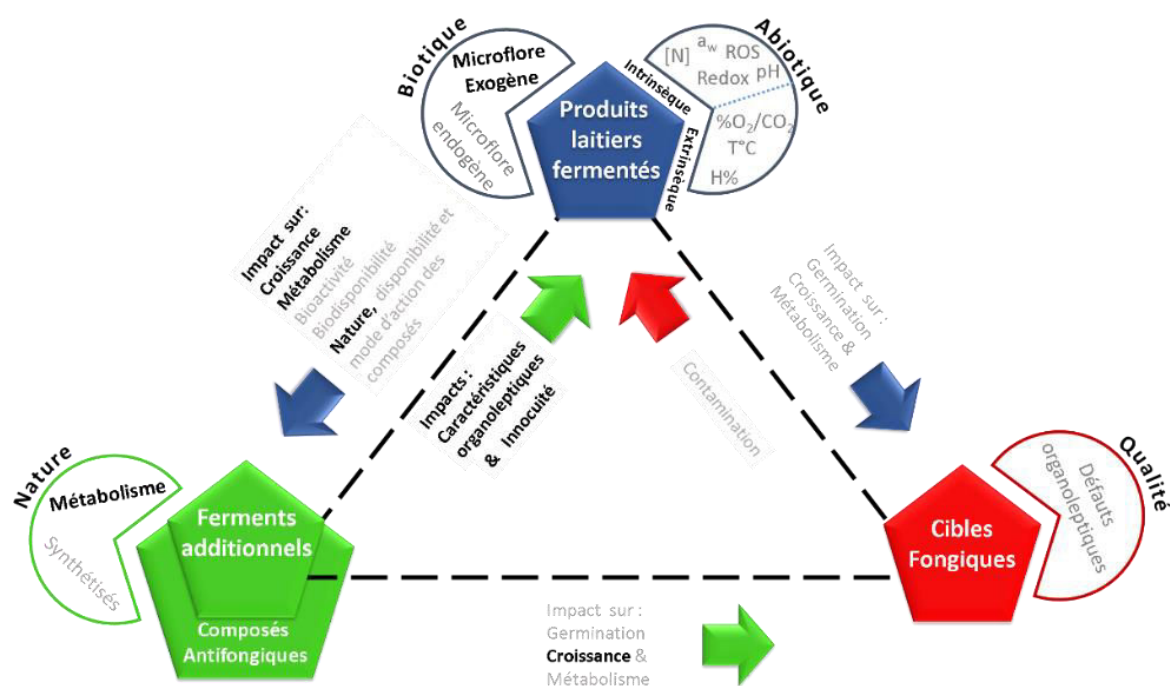
---

Dans un contexte de risques de contamination fongique des produits laitiers, de pertes économiques et de gaspillage alimentaire associés, mais aussi d'attentes sociétales pour plus de « naturalité » des produits alimentaires (par exemple concept *clean label*), la bioprotection est une alternative d'intérêt croissant qui a été l'objet d'étude de cette thèse. L'utilisation de bactéries lactiques en tant que cultures additionnelles pour remplacer des conservateurs chimiques vise à maintenir la qualité et à étendre la durée de vie des produits laitiers fermentés, en luttant contre les contaminations fongiques. Ainsi, les travaux réalisés ont démontré l'activité antifongique de cultures combinant des souches de lactobacilles en explorant, d'une part, leur capacité à inhiber des contaminants fongiques dans des produits finis obtenus à l'échelle pilote et, d'autre part, à produire une variété de composés antifongiques dans différents produits laitiers.

L'activité antifongique est un système faisant intervenir 3 acteurs, comme l'illustre la Figure 18 pour le système et les aspects considérés dans le cadre de cette thèse. Ces trois acteurs sont : (i) les cultures antifongiques sélectionnées et utilisées comme ferments additionnels (l'agent antifongique), (ii) les cibles fongiques visées et (iii) les produits laitiers fermentés (l'aliment). Les résultats de cette thèse ont montré que l'activité antifongique est un phénomène complexe qui varie selon : (i) la souche antifongique ou les combinaisons de souches considérées, (ii) la population atteinte par ces cultures antifongiques, (iii) la nature et la concentration des composés antifongiques produits, (iv) la cible fongique et (v) la nature du produit laitier.

Ce Chapitre III discute les résultats obtenus et présente des perspectives de recherche de l'ensemble des résultats. Il est structuré en trois parties : la stratégie de criblage de souches actives, puis des aspects concernant chacun des trois acteurs de l'activité antifongique, et enfin les contraintes liées à la commercialisation des cultures bioprotectrices.





**Figure 20. Diagramme représentant les interactions possibles entre les cultures antifongiques en tant que ferments additionnels producteurs des composés antifongiques, les cibles fongiques et les produits laitiers fermentés dans un contexte de bioprotection. Les aspects étudiés dans cette thèse sont indiqués en noir et en gras. ROS: espèce d'oxygène réactif, [N]: teneur en nutriments, H%: hygrométrie (adapté de Leyva-Salas et al., 2017)**

### i. Stratégie de sélection des souches à activité antifongique dans des matrices lactières

La première partie de la thèse (**Partie 1 du Chapitre II**) visait à sélectionner des cultures antifongiques efficaces applicables comme ferments additionnels dans des produits laitiers. Alors que le potentiel antifongique de divers micro-organismes a été largement rapporté dans la littérature, des études récentes ont montré qu'une perte significative de l'activité antifongique a souvent été observée entre les études *in vitro* dans des milieux synthétiques (*e.g.* MRS) et les conditions *in situ* dans des produits alimentaires (*e.g.*, yaourt, pain au levain) (Delavenne et al., 2013b; Le Lay et al., 2016c). En conséquence, dans l'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* de cette thèse, nous avons choisi d'utiliser des matrices lactières avec une méthode de criblage à haut-débit. Travailler directement avec un produit laitier aurait été l'idéal mais n'aurait pas été compatible avec les nombreux paramètres évalués dans les étapes *in vitro* de sélection des cultures antifongiques (*i.e.* nombreuses souches, plusieurs niveaux d'inoculum, cibles fongiques, matrices lactières et ferments acidifiants). Travailler dans des matrices les plus proches possibles des produits laitiers nous paraissait une alternative d'intérêt et compatible

avec les exigences de haut-débit afin de faciliter le passage du criblage *in vitro* aux études *in situ*. Nous avons donc utilisé un fromage modèle développé par (Garnier et al., 2018)), constitué d'un rétentat d'ultrafiltration de lait, emprésuré et ensemencé avec un ferment acidifiant (composition après fermentation : pH de 4,6, 6% de matière grasse et 21,5% de matière sèche) et distribué en plaque de 24 puits. Nous avons également utilisé une deuxième matrice en adaptant l'approche au yaourt (composition après fermentation : pH de 5,0, 1,6% de matière grasse et 15% de matière sèche). Les produits laitiers étant usuellement conservés à des températures réfrigérées, nous avons décidé d'incuber nos plaques de fromage modèle et de yaourt, après inoculation avec les cibles fongiques, respectivement à 12°C et 10°C, des températures proches de celle des réfrigérateurs des consommateurs mais qui permettent une croissance relativement rapide des champignons, qui sont, pour la plupart, psychrotrophes (Pitt and Hocking, 2009b). Ces conditions de croissance peuvent être considérées comme le « pire des cas » en comparaison des conditions de chaîne du froid en milieu industriel. La croissance des 4 cibles fongiques (*i.e.* *P. commune*, *M. racemosus*, *G. geotrichum* et *Y. lipolytica*) dans les matrices laitières a été évaluée avant de commencer le criblage afin de valider les matrice et les conditions d'incubation. Cette validation nous a permis de définir la cinétique de suivi pour chaque cible fongique. Cette méthode nous a permis de tester, *in vitro*, le potentiel antifongique de 32 souches et 13 combinaisons de souches contre 4, et jusqu'à 10 cibles fongiques, à différents niveaux d'inoculum, dans 2 matrices laitières et avec 5 ferments acidifiants, résultant en un total d'environ 6000 essais réalisées.

Pour se rapprocher encore de la réalité, nous avons évalué l'efficacité et l'applicabilité des cultures antifongiques sélectionnées *in situ* sur des produits laitiers fabriqués à l'échelle pilote, à savoir crème fraîche et fromage à pâte pressée à croûte morgée. Travailler avec deux matrices laitières différentes, aussi bien *in vitro* qu'*in situ*, a permis d'évaluer l'activité antifongique des cultures dans différentes conditions biotiques et abiotiques (Figure 18). En effet, ces quatre produits laitiers se distinguent par leur composition et leur procédé de préparation, notamment au niveau des ferments acidifiants, températures et temps d'incubation appliqués. Le choix d'étudier l'activité antifongique dans des produits très différents visait à sélectionner des souches montrant une activité antifongique efficace dans une variété des produits finis présentant des caractères physico-chimiques variés. Les cultures antifongiques sélectionnées se sont révélées très actives à l'échelle pilote, cette stratégie a donc prouvé la robustesse de cette approche de sélection de cultures antifongiques.

Dans la deuxième partie (Partie II du Chapitre « Résultats »), les quatre matrices ont été analysées pour étudier les composés produits par les cultures sélectionnées et donc potentiellement supports de l'activité antifongique observée. L'activité antifongique variait selon le produit laitier, il était donc important d'un point de vue mécanistique d'identifier les composés potentiellement impliqués. Le mécanisme d'action des bactéries lactiques est associé à la production de divers composés et repose probablement sur un effet synergétique. Ces composés ont été classés en acides organiques, acides gras, composés volatils et/ou composés protéiques (Crowley et al., 2013b). Nous avons identifié les composés antifongiques potentiellement supports de l'activité de trois cultures antifongiques sélectionnées au cours de cette étude (A1, A2, A3), ainsi que de cultures commerciales (X1, X2 et CC3), dans les quatre produits laitiers testés. L'identification de ces composés dans plusieurs produits a permis d'avoir une vue étendue de leur diversité et de l'impact des facteurs intrinsèques de la matrice sur l'activité antifongique. Néanmoins, le choix de travailler dans des matrices laitières a aussi des limites. Par exemple, la matrice laitière limite les possibilités d'identifier des peptides, une catégorie de composés qui n'a pas été recherchée dans cette thèse et qui pourrait jouer dans l'activité antifongique. Ce choix ajoute également un niveau de complexité dans l'établissement du rôle des composés identifiés dans l'activité antifongique, sachant que bon nombre de ces composés sont déjà produits par les ferments acidifiants.

## **ii. Modulation de l'activité antifongique selon les souches antifongiques et les combinaisons des souches**

Les bactéries lactiques et propioniques sont naturellement présentes dans les produits laitiers (Pfeiler and Klaenhammer, 2007), elles ont un long historique d'utilisation sans risque dans l'alimentation humaine et sont connues pour produire une grande variété de composés antifongiques. Ainsi, dans la première partie de cette thèse, 23 souches de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*, et 9 souches de bactéries propioniques ont été sélectionnées parmi 500 souches criblées en tant que fermentats dans le cadre d'une thèse précédente (Garnier, 2017). Développer des cultures antifongiques à ajouter en tant que ferments additionnels limite le choix des souches en particulier par rapport aux souches utilisées pour la production de fermentats, par exemple. Ainsi, les 32 souches ont été sélectionnées d'après leur compatibilité avec les conditions de fabrication des produits laitiers : i) mise à l'écart des espèces hétérofermentaires strictes pour éviter la production de CO<sub>2</sub>, ii) choix d'espèces susceptible de se développer à basse températures et mésophiles pour apporter une

flexibilité par rapport aux différentes conditions de fermentation mises en œuvre dans la fabrication des produits laitiers fermentés et iii) choix d'espèces connues pour être antifongiques. De plus, les études précédentes ayant montré que l'activité antifongique varie selon la souche au sein d'une même espèce, nous avons sélectionné plusieurs souches pour la plupart des espèces sélectionnées. Bien entendu, les organismes fongiques, levures et moisissures, n'ont pas non plus été retenus en tant qu'agents antifongiques potentiels dans ce contexte.

Parmi les souches criblées, 13 des 15 souches les plus actives appartenaient au genre *Lactobacillus*, dont *L. brevis* (n=1), *L. buchneri* (n=1), *L. casei* (n=2), *L. harbinensis* (n=1), *L. plantarum* (n=3), et *L. rhamnosus* (n=5). Comme discuté dans la Partie I du chapitre « Résultats », toutes ces espèces avaient été précédemment rapportées dans la littérature comme ayant une activité antifongique. Globalement, et en accord avec de récentes études (Cortés-Zavaleta et al., 2014; Le Lay et al., 2016c; Russo et al., 2017), ces résultats confirment le caractère souche-dépendant de l'activité antifongique. A titre d'exemple, dans le modèle fromage, la souche *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113, présente dans l'une des combinaisons efficaces A3, inhibe totalement *P. commune* alors que la souche *L. rhamnosus* CIRM-BIA930 n'a montré aucune inhibition de cette cible. Les bactéries appartenant aux genres *Leuconostoc* et *Propionibacterium* ont montré une faible activité antifongique, probablement parce que les températures et temps d'incubation appliqués n'ont pas permis leur développement suffisant dans les matrices laitières. Vérifier le niveau de croissance de ces bactéries permettrait de confirmer cette hypothèse.

Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont les principales bactéries non levains qui se développent naturellement dans les produits laitiers (Gobbetti et al., 2015). En plus, certaines espèces sont considérées « nomades » (Figure 9, Chapitre I) comme *L. rhamnosus* et *L. plantarum*. En effet, des souches criblées, les plus efficaces appartiennent aux espèces *L. harbinensis*, *L. plantarum* et *L. rhamnosus*. A l'avenir, pour développer des ferments de bioprotection pour des produits laitiers, la sélection des souches à cribler pourrait être réduite à ces espèces en augmentant leur nombre de souches. A titre d'exemple, l'espèce *L. harbinensis*, isolée pour la première fois en 2005 à partir de légumes fermentés (Miyamoto et al., 2005), a montré une activité antifongique en yaourt ((Delavenne et al., 2015) et la souche L172 incluse dans cette thèse est une des plus efficaces.

Concernant la combinaison de souches, des études antérieures avaient montré que la combinaison de bactéries lactiques et/ou propioniques antifongiques augmentait l'inhibition des cibles fongiques par rapport aux souches en culture pure (El-Shafei et al., 2008; Fernandez et al., 2017; Schwenninger and Meile, 2004). Nous avons donc sélectionné 5 souches de lactobacilles, à savoir *L. brevis* L128, *L. harbinensis* L172, *L. plantarum* L244 et *L. rhamnosus* CIRM-BIA1112 et CIRM-BIA1113, pour évaluer leur activité antifongique en combinaisons binaires et ternaires. Parmi les 13 combinaisons testées, 4 combinaisons binaires présentaient une augmentation de l'intensité d'inhibition de certaines cibles par rapport aux souches en culture pure. Contrairement à ce qui était attendu, les combinaisons ternaires ont montré une légère perte de l'intensité d'inhibition de certaines cibles fongiques. La quantification de la population de chaque souche après fermentation pour les combinaisons testées pourrait donner des pistes pour déterminer si l'absence d'amélioration de l'activité antifongique en combinaison était due au mauvais développement d'une des souches. Pour ce faire, il aurait été nécessaire de développer des milieux sélectifs de dénombrement ou des tests spécifiques en biologie moléculaire pour différencier les souches en combinaisons et les ferments acidifiants. La mise au point d'une méthode de biologie moléculaire aurait été chronophage, mais sur la base des résultats de l'évaluation de l'antibiorésistance des souches (cf. Article 4), une méthode de dénombrement des souches en combinaison dans des modèles laitiers a été mise au point dans le cadre d'un stage de Master 2 que j'ai co-encadré. Néanmoins, cette méthode n'est pas applicable au yaourt parce que le ferment acidifiant contient une espèce de *Lactobacillus* qui n'est pas inhibée dans les milieux développés comme c'est le cas des lactocoques utilisés comme ferments acidifiants dans le modèle fromage. Cette méthode est donc applicable pour dénombrer de façon élective *L. plantarum* L244, *L. harbinensis* L172 et *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 quand elles se trouvent en combinaisons binaires dans le modèle fromage. Ces milieux devraient permettre une meilleure appréhension du comportement des souches sélectionnées durant la production du fromage.

Parmi les combinaisons testées, quatre combinaisons (A1, A2, A3 et A4) ont montré le même spectre d'action (nature et nombre de cibles inhibées) que les souches en culture individuelle mais une augmentation de la durée d'inhibition. Après avoir écarté deux des combinaisons (A2 et A4) contenant la souche *L. brevis* L128 capable de produire des amines biogènes, deux combinaisons ont été finalement retenues pour évaluer leur efficacité et leur applicabilité en tant que cultures antifongiques à l'échelle pilote. Ces deux combinaisons associaient *L. plantarum* L244 avec, respectivement, *L. harbinensis* L172 (A1) ou *L. rhamnosus* CIRM-



BIA1113 (A3). Pour ces deux combinaisons, les deux souches se développaient de façon équivalente, comme le suggèrent les résultats de dénombrements sur le milieu LAMVAB utilisé pour quantifier leur population globale, et sur lequel les deux souches de ces combinaisons forment des colonies d'aspect différent, comme l'ont confirmé par la suite les résultats des dénombrements en modèle fromage grâce aux milieux avec antibiotiques développés. Si les combinaisons n'ont pas permis d'étendre le spectre d'action, nous avons souhaité les conserver car il existe une grande variété de produits laitiers et le fait d'utiliser un ferment de bioprotection contenant deux souches efficaces apporte plus de flexibilité, parce que cela augmente les chances de voir au moins une des souches se développer et montrer une activité contre les contaminations fongiques. Il est à noter que les espèces formant les 2 combinaisons sont mésophiles ; pour certains cas particuliers, il pourrait être intéressant de développer spécifiquement des ferments adaptés à ces procédés de fabrication.

Le mécanisme d'action des bactéries lactiques antifongiques repose sur la production de composés antifongiques et de phénomènes de synergie entre ces composés (Crowley et al., 2013b). Différentes méthodes chromatographiques ont donc été mises en œuvre pour identifier les composés potentiellement antifongiques, notamment les acides organiques et les acides gras (par une approche ciblée via HPLC, LC-Q-ToF et GC-FID), et les composés volatils (par une approche non ciblée via *Head Space*-GC-MS). Au total, 53 composés ont été détectés dans au moins un des quatre produits laitiers étudiés dont 33 ont été produits par les cultures A1, A2, A3, X1 et/ou CC3 à des concentrations significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevées que celles retrouvées dans les produits témoins. Nous avons montré que la production de composés antifongiques variait qualitativement et quantitativement selon la culture antifongique utilisée. Les cultures A1 et A3 ajoutées dans les quatre produits laitiers ont, quant à elles, produit en commun 22 composés dans au moins un des produits. Ces composés pourraient avoir été produits par la souche commune aux deux combinaisons, à savoir *L. plantarum* L244. Pour confirmer cette hypothèse et déterminer la contribution de chaque souche à l'activité antifongique en combinaison, il aurait été intéressant de quantifier les composés antifongiques produits individuellement par chacune des souches composant les combinaisons dans au moins un des produits. Pour avoir plus d'informations sur les composés supports de l'activité antifongique, l'analyse d'au moins un des produits avec une des souches criblées non antifongique aurait permis de comparer les « cocktails » des composés produits par cette souche comparativement à ceux des cultures efficaces.

### iii. Modulation de l'activité antifongique selon la population des cultures antifongiques

Afin de déterminer les niveaux d'inoculum optimaux pour les cultures antifongiques sélectionnées, mais aussi d'évaluer leur effet sur la croissance bactérienne et l'efficacité de l'activité antifongique, différents niveaux ont été testés *in vitro* (modèle fromage et yaourt) et *in situ* (crème fraîche), et la population a été dénombrée après fermentation (crème fraîche et fromage à pâte pressée). Des études antérieures ont montré que l'activité antifongique est modulée par la population des cultures antifongiques, qui dépend du niveau d'inoculum et de la croissance bactérienne durant la fermentation (Cosentino et al., 2018; Delavenne et al., 2015; Lačanin et al., 2017; Schwenninger and Meile, 2004). Au cours de cette étude, nous avons également observé cette modulation de l'activité antifongique par les niveaux d'inoculum *in vitro* et *in situ*, ce qui nous a permis de déterminer l'inoculum optimal des combinaisons, qui varie dans une large gamme de  $10^6$  à  $2.10^7$  UFC/mL, selon la matrice laitière et la cible fongique. Par exemple, A1 en crème fraîche inhibait *P. commune* et *R. mucilaginosa* à  $5.10^6$  et  $2.10^7$  UFC/mL avec la même intensité, alors que l'intensité d'inhibition de *M. racemosus* augmentait avec le niveau d'inoculum ( $10^6$ ,  $5.10^6$  ou  $2.10^7$  UFC/mL). Concernant la croissance des cultures dans le même exemple, elles ont augmenté d'1 log UFC/mL quel que soit le niveau d'inoculum, ce qui permet conclure que pour inhiber fortement (24 jours) *P. commune* et *M. racemosus*, une population finale de  $10^7$  est nécessaire. L'incubation des crèmes inoculées pendant une plus longue période (>22 h à 23°C) permettrait de déterminer la population maximale des cultures antifongiques. La croissance de 2 logs UFC/mL observée dans le fromage pourrait résulter des conditions de fermentation plus favorables (48 h à 23°C puis 24h à 12°C), mais d'autres caractéristiques technologiques et physico-chimiques de cette matrice pourraient aussi jouer un rôle positif sur la croissance. Il serait d'intérêt de tester des niveaux d'inoculum plus élevés pour déterminer si l'intensité de l'activité antifongique d'A1 contre *M. racemosus* peut continuer à augmenter. Bien entendu, ces approches ne seraient qu'à visée exploratoire car certainement incompatibles d'un point de vue économique avec les applications en industrie laitière. Pour des raisons de logistique et temps, nous n'avons testé qu'un seul niveau d'inoculum en fromage à pâte pressée qui correspond à celui conseillé par le fournisseur de la culture commerciale CC3 ( $5.10^6$  UFC/mL). Tester en fromage des niveaux d'inoculum plus élevés ( $2.10^7$  UFC/mL de lait par exemple) permettrait de déterminer si les populations atteintes et l'activité antifongique peuvent être augmentées. Cependant, la

population atteinte dans le fromage était déjà de  $10^8$  UFC/g, soit une population équivalente à celle atteinte en crème fraîche pour le niveau d'inoculum le plus élevé. L'activité antifongique n'est pas donc modulée que par la population des cultures antifongique mais aussi des composés produits par cette population (comme discuté dans le point suivant) et la matrice (aspect discuté plus loin dans ce chapitre).

#### **iv. Modulation de l'activité antifongique selon la nature et concentration des composés antifongiques produits**

L'effet du niveau d'ensemencement sur les composés antifongiques produits n'a été évalué qu'en crème fraîche, du fait de sa facilité de réalisation. Les résultats ont montré qu'il existe un lien entre la population et la production des composés antifongiques, et ce aussi bien qualitativement que quantitativement. Ainsi, les concentrations de certains composés produits par A1 et ou A3 dans la crème fraîche, comme l'acétoïne, le diacétyle et les acides acétique, 2-pyrrolidone-5-carboxylique, hydroxyphenyllactique et hydroxyphenylpropionique, sont directement proportionnelles à la population. Ces composés font partie du « cocktail » des composés potentiellement responsables de l'activité antifongique de ces cultures. La plus forte concentration de ces composés est observée aux niveaux de populations les plus élevées. Par exemple, le « cocktail » des composés produits par A1 avec une croissance jusqu'à  $5.10^7$  CFU/mL (inoculum  $5.10^6$  UFC/mL), aux concentrations quantifiées est suffisant pour inhiber fortement *P. commune* et *R. mucilaginosa* en crème fraîche. Cependant, la contribution de ces composés dans l'inhibition des cibles fongiques serait à confirmer dans un premier temps pour ensuite déterminer si l'inhibition des cibles est effectivement modulée par leurs concentrations. Ainsi, il serait d'intérêt de tester le cocktail produit par A1 inoculé à  $5.10^6$  UFC/mL aux concentrations retrouvées contre *P. commune* ou *R. mucilaginosa*. La contribution pourrait ensuite être déterminée à partir d'approches additive ou soustractive. Pour réaliser l'approche additive comme celle employée par (Le Lay et al., 2016a), on peut ajouter des composés par famille : acides organiques à concentrations élevées (*e.g.* acide acétique), acide gras et composés volatils. L'approche soustractive consisterait, sur la base d'un cocktail complet, à enlever 1 composé à la fois et à réévaluer l'activité antifongique. Une chute d'activité antifongique indiquerait que le composé écarté est un élément clé dans l'activité antifongique, alors qu'une absence de variation de l'activité indiquerait que ce composé ne contribue pas à l'activité du cocktail et peut-être écarté. Le choix d'une matrice adéquate pour réaliser de tels essais est complexe pour de nombreuses raisons : les 33 composés trouvés dans les cocktails

produits par les cultures antifongiques se trouvent déjà, à des concentrations plus faibles, dans le produit témoin, et il existe d'autres composés antifongiques que ceux quantifiés au cours de cette thèse (*e.g.* des peptides). Un des choix serait de travailler avec une des matrices laitières facile à manipuler comme la crème fraîche ou le modèle fromage. Différents cocktails de composés contribuent potentiellement à la forte inhibition observée de *M. racemosus* et *P. commune*, comme le suggèrent les résultats des analyses discriminantes (cf. Tableau 4 de l'Article 5). Les composés corrélés à une forte inhibition diffèrent selon la cible considérée. Ces cocktails de composés pourraient compléter les études de la vérification des composés supports de l'activité antifongique pour identifier un cocktail capable d'inhiber les deux cibles fongiques ainsi qu'un cocktail pour chaque cible fongique. La détermination des CMI des composés identifiés comme support de l'activité antifongique contre ces cibles fongiques dans les matrices laitière donnerait également des informations complémentaires d'intérêt.

L'activité antifongique des bactéries lactiques repose sur la métabolisation de nutriments et la production de composés pendant les fermentations. Ces composés correspondent aux acides lactique et acétique, retrouvés en fortes concentrations (0.1 à 15 kg/kg) dans nos essais, ainsi qu'à d'autres composés produits par différentes voies métaboliques (0.5 à 100 mg/kg). Par exemple les acides phényllactique et hydroxyphényllactique sont issus du catabolisme des acides aminés, certains acides gras (*e.g.* C18:0, C18:2) sont issus de l'hydrolyse de la matière grasse, et le diacétyle issu du métabolisme du pyruvate et la 2-heptanone du métabolisme des acides gras libres (cf. Tableau 1 de l'Article 5). Comme indiqué précédemment, les cocktails identifiés varient selon la matrice et la culture antifongique ; en effet, chaque culture produit un « cocktail » de composés différents en termes de nombre, de nature et de concentration. La nature des composés est plus variable que la concentration entre cultures antifongiques dans une même matrice. Néanmoins, comme discuté plus loin dans ce chapitre, le produit laitier impacte la nature de ces cocktails.

Pour étudier la production de composés antifongiques, plusieurs approches sont envisageables : métabolomique visant à quantifier un ensemble de molécules y compris de nature peptidique, et d'autres techniques -omiques comme la génomique et la transcriptomique. L'approche métabolomique a été utilisée dans cette thèse en combinant des méthodes ciblée et non ciblée. Un exemple d'exploration non ciblée des composés antifongique est celle utilisée par (Honoré et al., 2016) par laquelle les auteurs ont déterminé l'empreinte métabolique de trois souches de *Lactobacillus paracasei* contre *Penicillium sp. nov.* DCS 1541 et *Penicillium solitum* DCS 302 dans un milieu chimiquement défini. Cette étude a confirmé que 28 composés sont

probablement impliqués dans l'activité antifongique dont 16 non identifiés. Dix des composés identifiés ont été ciblés dans notre étude.

Concernant les composés de nature protéique, plusieurs souches de *L. brevis*, *L. pentosus* et *L. plantarum* ont été rapportées comme productrices de composés protéiques (*i.e.* peptides, dipeptides cycliques et bactériocines) responsables de l'activité antifongique observée (Atanassova, 2003; Chen et al., 2018; Delgado et al., 2016; Okkers et al., 1999). Les composés de nature protéique peuvent être identifiés par des approches de métabolomique axée sur les peptides comme la nano LC- MS/MS. Néanmoins, il existe une véritable difficulté à identifier des peptides dans un produit laitier fermenté du fait de sa complexité en termes de système protéolytique (enzymes du lait, enzymes éventuellement ajoutées et enzymes du microbiote), qui génère un très grand nombre de peptides. Une approche non ciblée serait nécessaire pour identifier tous les peptides spécifiquement produits par les cultures antifongiques, en comparaison avec les produits témoins. Plus simplement, il est possible de rechercher parmi les peptides identifiés la présence de peptides déjà décrits pour leur activité antifongique. Dans les travaux de thèse de Garnier, 2017, dans le fermentat de *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 un peptide issu de l'hydrolyse de la caséine  $\alpha$ -s<sub>2</sub> a été identifié et son activité antifongique contre *M. racemosus* UBOCC-A-109155 et *R. mucilaginosa* UBOCC-A-216004 a été démontrée. Néanmoins, si les cultures antifongiques produisent des peptides non connus précédemment, il serait nécessaire de procéder à des étapes de fractionnement et d'évaluer l'activité antifongique des fractions ainsi obtenues, avec le risque, comme dans toute approche de fractionnement, de ne pas observer d'inhibition avec une fraction purifiée si l'activité antifongique résulte de synergies.

Il est à noter qu'une approche de génomique comparative entre souches antifongiques et non antifongiques, au sein d'une même espèce, pourrait également permettre de rechercher des gènes appartenant au génome spécifique des souches antifongiques, susceptibles de coder pour les activités associées à la production des composés actifs. Il serait également envisageable d'étudier l'ensemble des gènes exprimés via des méthodes de transcriptomique en comparaison avec une souche de la même espèce non antifongique ; cette approche a été utilisée dans d'autres études pour explorer des composés spécifiques comme les bactériocines (Nes and Johnsberg, 2004). Cibler des gènes connus pour être impliqués dans la production de composés d'intérêt pourrait être un autre moyen de cribler le potentiel antifongique des cultures.



Le mécanisme d'action individuel des acides organiques, acides gras, certains volatils et protéines a été décrit mais leur mécanisme en synergie, *in situ* a été peu étudié. L'étude de (Mieszkin et al., 2017) a montré la réponse de la levure *Y. lipolytica* à l'exposition à un mélange de composés antifongiques. D'un point de vue cognitif, il serait d'intérêt d'envisager une approche similaire en comparant, par exemple par des approches de transcriptomique et/ou protéomique, la réponse de la cible fongique exposée ou non aux cultures de bioprotection ou directement aux cocktails de composés.

#### **v. Modulation de l'activité antifongique selon la cible fongique**

Les résultats du criblage ont également permis d'identifier des degrés variables de sensibilité des cibles fongiques. En effet, *G. geotrichum* UBOCC-A-216001 et *Y. lipolytica* UBOCC-A-216005 se sont révélées les souches les plus difficiles à inhiber, alors que *P. commune* UBOCC-A-116003 était la plus sensible des cibles testées, indépendamment des produits laitiers. Le caractère cible-dépendant de l'activité antifongique a été aussi montré par d'autres études (Cosentino et al., 2018; Delavenne et al., 2013b; Fernandes and Carter, 2017; Inglin et al., 2015; Le Lay et al., 2016c).

Ces résultats soulignent également l'importance de bien définir le spectre d'activité des cultures antifongiques lors du criblage, en évaluant une large gamme de cibles fongiques et surtout en choisissant des cibles représentatives des contaminants fongiques des produits laitiers ou d'autres produits. C'est ainsi que nous avons choisi d'évaluer le spectre d'action antifongique de quelques combinaisons antifongiques sélectionnées (A1 et A3) et des souches correspondantes i) tout d'abord contre 4 cibles choisies pour leur fréquence dans les contaminations des produits laitiers, ii) puis contre 6 cibles additionnelles également retrouvées dans des produits laitiers contaminés (Garnier et al., 2016). Les 6 cibles additionnelles ont montré une sensibilité beaucoup plus élevée aux souches antifongiques que les 4 premières cibles. Ces résultats ont mis en avant la robustesse de l'approche de criblage retenue. L'évaluation de l'activité antifongique contre 10 cibles, auxquelles viennent s'ajouter les contaminants fongiques naturels inhibés lors du test d'usage, a permis de vérifier le large spectre d'action des combinaisons sélectionnées.

Nous avons mis en œuvre dans cette thèse un ensemble de dix cibles fongiques d'espèces différentes, qui nous a permis de déterminer que la sensibilité à l'activité antifongique est espèce-dépendante. Concernant la souche-dépendance, il a déjà été rapporté que l'activité

antifongique de l'acide phényllactique contre différentes souches de *P. polonicum*, *Aspergillus flavus*, *A. crysogenum*, *A. niger* et *P. citrinum* variait selon la souche fongique considérée (Lavermicocca et al., 2003). Nous n'avons choisi qu'un représentant par espèce de cibles, ce qui interroge sur leur représentativité au sein de l'espèce, même si nous avons en partie contrecarré cette problématique en travaillant avec des souches réellement contaminants de produits laitiers il reste à évaluer l'effet au niveau souche. Pour compléter notre étude, il pourrait cependant être d'intérêt d'étudier l'activité antifongiques des cultures sélectionnées contre d'autres souches des champignons trouvés très résistants comme *Galactomyces geotrichum* et *Yarrowia lipolytica*, moyennement sensibles comme *R. mucilaginosa* et très sensibles comme *Penicillium commune* et *Didimella pinodella*.

Il est important de noter que l'activité antifongique a été évaluée *in vitro* et en challenge test en utilisant 50 spores déposées en surface (ou 2 UFC/g incorporés dans la masse pour les levures), ce qui représente à nouveau, comme dans le cas des températures, le « pire des cas ». En effet, ce niveau de contamination est extrêmement élevé comparativement aux contaminations "naturelles" usuellement observées (une à 2 spores ou cellules par pot ou fromage tout au plus). Le degré de contamination pourrait moduler l'efficacité de l'activité antifongique ; en effet, plus faible est la contamination, plus facile il est d'inhiber la cible. Les tests d'usage ont permis de vérifier l'activité antifongique vis-à-vis de contaminations « naturelles ». Dans 40 à 100% des cas selon les produits, les contaminants naturels ont effectivement été inhibés.

Par ailleurs, la méthode d'évaluation employée dans le contexte de la thèse pour évaluer la croissance des cibles fongiques est semi-quantitative. Elle utilise une évaluation donnant i) un score de 0 à 3 (de non-inhibé à totalement inhibé) et ii) une valeur en termes de jours d'inhibition totale avant croissance visible du mycélium. Néanmoins, cette évaluation est dépendante de la personne et doit donc être réalisée par la même personne ou après formation et lecture en doublon. Les seules données quantitatives correspondent à l'inhibition de *R. mucilaginosa*, qui a été dénombrée. La détermination des populations des cibles fongiques ou d'autres moyens pour la quantification de l'inhibition des cibles sont possibles: par exemple, mesure de la croissance radiale des champignons en surface, mesure de la biomasse par dosage en HPLC de l'ergostérol ou par méthode de qPCR (Bleve et al., 2003; Chiocchio and Matković, 2011; Le Dréan et al., 2010). La mise en place de ces outils, bien que d'intérêt, n'était pas compatible avec la durée de la thèse et son dimensionnement. D'un point de vue pratique, par exemple, les surfaces des produits laitiers ne sont pas toujours très lisses mais surtout les puits n'ont pas la taille suffisante pour mesurer la croissance radiale, impliquant un changement de

taille des contenants. Pour la qPCR, il aurait fallu développer la méthode pour chacune des cibles. Si ceci n'était pas réalisable car contraire à l'approche haut débit utilisée, à l'avenir nous pourrions nous focaliser sur un nombre réduit de facteurs (cibles, cultures antifongiques) pour envisager ce type d'étude.

Les champignons, principalement sous forme de spores aéroportées (sexuées ou asexuées), peuvent se déposer et se développer à différents stades de la vie des produits, pendant les étapes de transformation, de conditionnement, stockage et distribution (Pitt and Hocking, 2009b). Nous avons pris comme hypothèse de travail, une contamination des produits laitiers stériles immédiatement après leur fabrication (*e.g.* conditionnement). Le test d'usage est une évaluation de l'activité antifongique lors de la découpe pour le fromage après affinage ou chez le consommateur. Les activités antifongiques observées au cours du challenge test et du test d'usage sont des informations complémentaires mais non comparables du fait des taux de contamination différents. La comparaison de l'activité antifongique observée en inoculant les cibles fongiques soit dans le lait de fabrication, soit après quelques jours de stockage/affinage, aurait permis d'évaluer l'intérêt des solutions antifongiques en termes de prévention tout au long de la vie du produit. La plupart des études sur l'activité antifongique *in situ* dans des produits laitiers suivent la méthode employée dans cette thèse. Parmi celles-ci, une seule a montré que la cible (dans ce cas *Penicillium. chrysogenum* inhibé par une combinaison de trois lactobacilles utilisée comme culture additionnelle) était plus inhibée lorsque le champignon était inoculé avant fermentation que lors d'une inoculation après fermentation du fromage *Caciotta* (Cosentino et al., 2018).

#### **vi. Modulation de l'activité antifongique selon la nature du produit laitier**

L'inhibition de cibles fongiques par les cultures sélectionnées diffère dans les quatre milieux laitiers considérés, et ce indépendamment de la cible fongique considérée. Lors du criblage, les souches étudiées ont montré une activité antifongique plus élevée dans le fromage modèle que dans le yaourt. Lors de l'évaluation à l'échelle pilote, les combinaisons sélectionnées ont montré plus d'activité antifongique dans la crème fraîche que dans le fromage à pâte pressée. Globalement, l'activité antifongique la plus élevée a été observée dans la crème fraîche, suivie par le fromage modèle et le yaourt, et la plus faible dans le fromage à pâte pressée. Ces résultats démontrent clairement l'effet de la matrice sur l'inhibition des cibles fongiques par les cultures sélectionnées. Cet effet peut provenir de différents facteurs biotiques et abiotiques.

Les facteurs abiotiques intrinsèques de la matrice (comme la composition et le pH) impactent qualitativement et quantitativement les composés produits et par conséquent l'activité antifongique des cultures (Figure 18). L'influence de composition de la matrice a très peu été rapportée dans la littérature. En particulier, le rôle du pH est fondamental, comme montré dans de précédentes études (Belguesmia et al., 2014; Cortés-Zavaleta et al., 2014). L'activité antifongique des acides dépend du pH. Quand ce dernier est proche du pKa de l'acide, les acides sont sous forme dissociée et diffusent rapidement à travers la membrane fongique ce qui provoque une rupture de la membrane (Theron and Lues, 2011). Dans notre étude, l'activité antifongique des cultures la plus élevée a été observée dans la crème fraîche, qui a le pH le plus acide de tous les produits testés (pH 4,2 contre de 4,7 à 5,2 dans les autres produits). La matière grasse pourrait également jouer un rôle en piégeant les composés lipophiles en limitant leur disponibilité pour la bioprotection (Pohl et al., 2011). De plus, comme l'activité antifongique résulte d'une synergie, les composés produits par les ferments acidifiants, comme l'acide lactique, pourraient aussi jouer un rôle dans l'activité antifongique des cultures bioprotectrices. Pour déterminer l'effet de la matrice sur l'activité antifongique manifestée par les cultures sélectionnées, il serait d'intérêt de faire varier le pH, le contenu en matière grasse et en protéines, et la matière sèche d'une matrice facile à modifier. L'évaluation de l'inhibition des cibles, le suivi de la croissance des cultures antifongiques et la quantification des composés antifongiques supports permettraient ainsi de mieux appréhender les interactions entre la matrice et l'activité antifongique. Au cours des dernières années, des études ont montré l'amélioration de l'activité antifongique par ajout de précurseurs de composés antifongiques, par exemple l'ajout de glycérol pour la production du composé antifongique reutérine par *L. reuteri* INIA P572 en fromage, ou l'ajout d'acide phénylpyruvique pour permettre la surproduction d'acide phényllactique (Armaforte et al., 2006; Bustos et al., 2018; Cortés-Zavaleta et al., 2014; Gómez-Torres et al., 2016; Li et al., 2014b; Valerio et al., 2016). L'étude des voies métaboliques des cultures serait un moyen d'optimiser l'activité antifongique par ajout de précurseurs compatibles qui n'affecteraient pas la technologie ni la flaveur des produits. Néanmoins, les aspects réglementaires sont à prendre en compte pour l'ajout de ce type d'additifs dans des produits laitiers traditionnels.

Les facteurs abiotiques extrinsèques des produits comme le procédé de fabrication, les conditions de stockage ou le conditionnement peuvent aussi impacter l'activité antifongique. Dans le cas spécifique des essais en fromage à pâte pressée, ceux-ci ont mis en avant que, dans un système de bioprotection, l'activité antifongique observée peut varier de façon marquée

entre des produits de composition proche, comme montré dans la partie I. De tels essais évaluant l'activité antifongique à l'échelle pilote sont rarement rapportés, les essais étant le plus souvent réalisés dans des matrices simples comme le yaourt. Nos résultats mettent en évidence d'une part la complexité à contrôler tous les paramètres dans un système de bioprotection en conditions réelles et ils illustrent d'autre part les impacts majeurs que peuvent avoir des différences modérées de composition, dans un même type de produit, sur l'activité antifongique observée.

Concernant les facteurs biotiques de la matrice susceptibles d'impacter l'activité antifongique, les matrices laitières contiennent des ferments acidifiants, et éventuellement des ferments d'affinage comme ceux de la morge, mais aussi potentiellement des micro-organismes non levains issus du lait cru ou de l'environnement. Un total de 5 ferments acidifiants a été utilisé dans les tests *in vitro* et *in situ*. Quant à la morge appliquée sur les fromages produits à l'échelle pilote, elle était composée de *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* et *Brevibacterium linens*. Des bactéries lactiques non levains (NSLAB) sont présentes dans de nombreux produits industriels. L'ensemble de ces micro-organismes est susceptible de produire des composés antifongiques et il est également possible qu'il y ait des interactions entre les cultures antifongiques et ces micro-organismes (*e.g.* compétition pour les substrats carbonés, synergie des composés). Au cours des travaux réalisés, aucun impact des ferments acidifiants n'a été observé sur les cultures antifongiques. Dans des productions réelles, il serait d'intérêt d'étudier l'impact de la part nonensemencée du microbiote, composée principalement de NSLAB, sur l'activité antifongique.

#### **vii. Contraintes liées à la mise sur le marché des cultures bioprotectrices**

Pour qu'une culture bioprotectrice puisse être commercialement utilisable, elle ne doit pas présenter de risques pour la santé humaine et l'innocuité des souches sélectionnées doit donc être garantie. Sur la base de la démarche QPS (*Qualified Presumption of Safety* ou présomption d'innocuité reconnue) (Bourdichon et al., 2012) appliquée aux micro-organismes utilisées en alimentation animale, les éventuels risques pour la sécurité, à savoir pour les LAB, la résistance acquise aux antibiotiques et la production d'amines biogènes, ont été testés pour chacune des souches présélectionnées. A la suite des résultats obtenus, 2 des combinaisons fortement antifongiques, associant *L. brevis* L128 avec, respectivement, *L. plantarum* L244 (A2) ou *L. harbinensis* L172 (A4), ont dû être écartées du fait que la souche de *L. brevis* possédait des gènes impliqués dans la production d'amines biogènes (*tyrdc* et *agdi*, associés respectivement



à la production de tyramine et de putrescine). Dans le cadre de cette thèse, nous avons évalué l'innocuité des combinaisons les plus antifongiques après toutes les étapes de criblage et comme étape préliminaire à une application *in situ*, réduisant ainsi le nombre de souches à tester. Néanmoins, réaliser cette évaluation avant l'étape de criblage aurait réduit le nombre des essais.

Les essais à l'échelle pilote réalisés n'ont pas seulement permis de valider l'activité antifongique des cultures sélectionnées *in situ*, mais aussi d'évaluer d'autres contraintes comme celles liées à l'ajout des cultures en tant que ferments additionnels dans une matrice alimentaire donnée. Ces contraintes peuvent concerner la viabilité des cultures bioprotectrices, leur facilité d'ajout dans le processus et leur impact sur les ferments acidifiants, et sur les caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques attendues du produit. La viabilité des cultures bioprotectrices dans la matrice et leur impact sur le ferment acidifiant ont été étudiée et abordé précédemment dans ce chapitre. Le suivi du pH et de la matière sèche ont permis d'écarter l'impact des cultures antifongiques sur ces deux paramètres. Néanmoins, les cultures A1 et A3 inoculées à  $2.10^7$  UFC/mL dans la crème fraîche ont montré une post-acidification pendant le stockage plus forte que dans les crèmes témoins (chute de pH à 4,03 au lieu de 4,23 dans les témoins). Il faut noter cependant que cette post-acidification a été observée dans des conditions extrêmes (après 4 semaines à 10°C) et que les solutions commerciales vendues à l'heure actuelle provoquaient la même post-acidification. Cette post-acidification a été aussi perçue dans les analyses sensorielles, les crèmes inoculées avec  $5.10^6$  et  $2.10^7$  UFC/mL d'A1 et A3 ayant été notées comme plus acides.

Comme indiqué ci-dessus, les ferments additionnels peuvent aussi impacter les caractéristiques organoleptiques de l'aliment et les essais *in situ* ont directement fourni des informations relatives à ce sujet. Selon son métabolisme, une culture antifongique peut avoir un impact positif, neutre ou négatif. Les micro-organismes antifongiques hétérofermentaires peuvent ainsi conduire à la production de CO<sub>2</sub> affectant directement l'aspect du produit (formation de bulles ou de poches de gaz) alors que d'autres candidats microbiens peuvent présenter des activités enzymatiques intenses) affectant directement la texture du produit et son aspect global. Dans ce contexte, la sélection des cultures antifongiques devrait viser la neutralité organoleptique. Pour définir et quantifier l'impact organoleptique des cultures sélectionnées dans la crème fraîche et les fromages, nous avons réalisé des évaluations sensorielles par une méthode de tri libre, qui a permis de déterminer si les produits avec cultures antifongiques différaient significativement ( $p < 0.02$ ) des produits témoins et, le cas échéant, selon les descripteurs libres des juges. Les produits avec cultures antifongiques ont été perçus différents des produits

témoins, sauf dans le cas de la crème fraîche inoculée avec A1 à  $10^6$  UFC/mL. Les produits avec cultures antifongiques étaient généralement décrits comme « acides », « piquants », « goût fort » par rapport aux produits témoins décrits comme « fades », « doux », ou « neutres ». Malgré ces descripteurs, les produits contenant des cultures antifongiques n'étaient pas rejetés par les juges, suggérant leur acceptabilité. Cependant, d'autres tests d'analyse sensorielle impliquant des panels de consommateurs seraient nécessaires confirmer ce point, comme par exemple des tests d'acceptabilité. Les termes comme « plus acide », « goût fort » suggèrent également que ces cultures antifongiques pourraient être utilisées dans de nouveaux produits dans la gamme, où des notes plus typées seraient recherchées. Comme pour le phénomène de post-acidification, il est intéressant de souligner que les produits avec cultures commerciales de références (X1 et CC3) ont été aussi détectés comme différents, indiquant que nos cultures antifongiques présentent a priori la même applicabilité. Il faut également souligner que le niveau d'inoculation de la culture pour observer une activité efficace peut être non-applicable d'un point de vue organoleptique mais également d'un point de vue économique. Nous pouvons donc conclure qu'A1 et A3 inoculées entre  $10^6$  et  $5.10^6$  UFC/mL sont fortement efficaces, applicables à un large spectre de cibles fongiques et de produits. Elles montrent une activité antifongique égale voire supérieure aux cultures commerciales, une flexibilité technologique et sont sans impact sur les ferments acidifiants, sur les caractéristiques physico-chimiques pendant la fabrication et le stockage et sur les caractéristiques organoleptiques.

### ***Conclusion générale***

L'objectif de cette thèse était de caractériser l'activité antifongique de cultures applicables en tant que ferment de bioprotection dans des produits laitiers. Nous avons établi une approche robuste qui pourrait être appliquée pour la sélection d'autres cultures bioprotectrices antifongiques pour les produits laitiers, mais aussi pour d'autres produits sensibles aux contaminations fongiques. Les différentes étapes de cette approche pourraient être adaptées (*e.g.* nombre de souches criblées, de cibles fongiques, de matrices laitières *in vitro* et *in situ*, d'essais à échelle pilote...) selon les besoins et les contraintes de budget et de temps. L'approche de sélection des cultures antifongiques a été imaginée sur la base de questions scientifiques concernant le criblage d'une sélection des souches, l'intérêt de la combinaison de souches, l'applicabilité et l'efficacité en conditions réelles (Q1 à Q3) (Figure 15, 16 et 17, Annexes 1, Partie 1 du Chapitre II). Les résultats obtenus ont permis de démontrer que l'inhibition des cibles fongiques variait selon de nombreux facteurs : la souche antifongique seule ou en

combinaison, le niveau d'inoculation des cultures antifongiques, la cible fongique, le type de matrice laitière et des facteurs abiotiques. Au-delà de l'aspect « sélection des cultures antifongiques » se posaient également des questions plus fondamentales sur les composés supports de l'activité observée (Q4). La détermination qualitative et/ou quantitative des composés potentiellement supports de l'activité antifongique a permis de caractériser l'activité antifongique d'un point de vue mécanistique. La connaissance des cocktails de composés identifiés, après vérification de leur contribution respective à l'activité antifongique, pourraient permettre de chercher à augmenter le rendement d'un ou plusieurs métabolites naturellement produits par nos cultures (*e.g.* acide phényllactique). Comme montré dans le Tableau 9 (Chapitre I) et dans les études avant 2013 rapportées par (Crowley et al., 2013b), l'activité antifongique *in situ* des bactéries lactiques est généralement évaluée dans un seul produit laitier, majoritairement dans le yaourt. Peu d'études ont identifié les composés antifongiques *in situ*, on notera cependant l'étude de (Mieszkin et al., 2017), dans laquelle les composés produits par *L. harbinensis* K.V9.3.1Np en yaourt ont été identifiés par HPLC.. Dans cette thèse, nous avons étudié l'activité antifongique *in vitro et in situ* dans quatre produits laitiers au total. Comme l'activité antifongique observée variait fortement selon le produit et la culture antifongique, nous avons cherché à identifier les composés antifongiques dans ces quatre produits laitiers, et ce avec plusieurs techniques chromatographiques. De part ces aspects, cette thèse a couvert un champ étendu et à la fois approfondi au niveau mécanistique sur l'activité antifongique-

Les résultats ont ainsi montré que la culture antifongique A1 combinant les souches *L. harbinensis* L172 et *L. plantarum* L244 présentait l'activité antifongique la plus intéressante. En effet, elle a montré de fortes activités antifongiques dans les quatre produits laitiers testés, contre les trois cibles fongiques testées, *P. commune*, *M. racemosus* et *R. mucilaginosa*. Les essais à l'échelle pilote dans deux produits très différents, crème fraîche et fromage à pâte pressée, ont montré que cette culture était applicable dans différent types de produits laitiers. Bien que la culture A3 de *L. plantarum* L244 et *L. rhamnosus* CIRM-BIA1113 ait montré une activité antifongique moins marquée lors des challenge tests sur les cibles fongiques sélectionnées, son activité contre la flore fongique environnementale était intéressante et elle pourrait donc être utilisée en complément d'autres approches. De façon notable, les cultures A1 et A3 ont montré une activité antifongique égale voire supérieure, en termes de spectre d'action et d'intensité d'inhibition, aux 3 cultures commerciales (X1, X2 et CC3) utilisées comme références.

A l'avenir, il pourrait être d'intérêt de combiner plusieurs approches de bioprotection, en particulier dans le contexte des produits laitiers. En effet, des fermentats de bactéries lactiques, propioniques et champignons développés pour la bioprotection de produits laitiers dans le cadre du projet PROFIL ont également démontré leur efficacité, dans les mêmes conditions de production à échelle pilote. Les fermentats et les cultures additionnelles développées dans le projet PROFIL permettent de proposer une large gamme de techniques de bioprotection adaptée aux produits laitiers. Ainsi par exemple, en fabrication des fromages, les fermentats issus de la culture de *P. jensenii* CIRM-BIA1774, testée seule ou combinée à des cultures de *Mucor lanceolatus* UBOCC-A-109193 ou de *L. rhamnosus* CIRM-BIA1952 ont montré une forte inhibition, vis-à-vis des mêmes cibles fongiques et aucun impact organoleptique (Garnier, 2017), alors que les cultures antifongiques y sont moins efficaces. A l'inverse, dans la crème fraîche, l'activité antifongique de cultures comme A1 s'est révélée aussi efficace que le sorbate, alors que l'utilisation de fermentats y entraîne un impact très négatif sur les propriétés organoleptiques.

## **Références**



- Abejón Mukdsi, M. C., Maillard, M.-B., Medina, R. B., and Thierry, A. (2018). Ethyl butanoate is synthesised both by alcoholysis and esterification by dairy lactobacilli and propionibacteria. *LWT* 89, 38–43. doi:10.1016/j.lwt.2017.10.012.
- Ahmad Rather, I., Seo, B. J., Rejish Kumar, V. J., Choi, U.-H., Choi, K.-H., Lim, J. H., et al. (2013). Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett. Appl. Microbiol.* 57, 69–76. doi:10.1111/lam.12077.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., and Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24, 559–570.
- Armaforte, E., Carri, S., Ferri, G., and Caboni, M. F. (2006). High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. *J. Chromatogr. A* 1131, 281–284. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.095.
- Atanassova, M. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 63–73. doi:10.1016/S0168-1605(03)00054-0.
- Atlan, D., Beal, C., and Champomier-Verges, M. (2008). Metabolisme et ingenierie metabolique. *Bact. Lact. Genet. Aux Ferments*, 271–509.
- Aunbjerg, S. D., Honoré, A. H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F. K., Benfeldt, C., et al. (2015). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 46–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.007.
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2016a). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006.
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Peyer, L. C., Furey, A., Coffey, A., et al. (2016b). Antifungal activities of three different *Lactobacillus* species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1701–1711. doi:10.1007/s00253-015-7051-x.
- Bai, F.-L., and Li, J.-R. (2014). Advanced research on antifungal Lactic acid bacteria of food bio-protective agent. *Mod. Food Sci. Technol.* 30, 311–319.
- Banks, J. M., and Williams, A. G. (2004). The role of the nonstarter lactic acid bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 145–152. doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00150.x.
- Barman, S., Ghosh, R., Sengupta, S., and Mandal, N. C. (2017). Longterm storage of post-packaged bread by controlling spoilage pathogens using *Lactobacillus fermentum* C14 isolated from homemade curd. *PLOS ONE* 12, e0184020. doi:10.1371/journal.pone.0184020.
- Bartkiene, E., Bartkevics, V., Lele, V., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Mickiene, R., et al. (2018). A concept of mould spoilage prevention and acrylamide reduction in wheat

- bread: Application of lactobacilli in combination with a cranberry coating. *Food Control* 91, 284–293. doi:10.1016/j.foodcont.2018.04.019.
- Beal, C., and Sodini, I. (2003). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Tech. Ing. Bioprocédés*.
- Belguesmia, Y., Rabesona, H., Mounier, J., Pawtowsky, A., Le Blay, G., Barbier, G., et al. (2014). Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellan–xanthan beads during batch fermentation. *Food Control* 36, 205–211. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.028.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., and Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274. doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., and Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Contrib. Saf. Assess. Technol. Microflora Found Fermented Dairy Prod.* 126, 278–285. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015.
- Bian, X., Muhammad, Z., Evivie, S. E., Luo, G.-W., Xu, M., and Huo, G.-C. (2016). Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control* 66, 183–189. doi:10.1016/j.foodcont.2016.02.004.
- Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., and Torriani, S. (2003). Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4116–4122. doi:10.1128/AEM.69.7.4116-4122.2003.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., et al. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030.
- Brisson, G., and Singh, H. (2013). “Milk composition, physical and processing characteristics,” in *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*, eds. R. C. Chandan and A. Kilara (Oxford: John Wiley & Sons), 21–48. doi:10.1002/9781118481301.ch2.
- Broberg, A., Jacobsson, K., Strom, K., and Schnurer, J. (2007). Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5547–5552. doi:10.1128/AEM.02939-06.
- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E. K., and Furey, A. (2012). Rapid identification, by use of the LTQ Orbitrap hybrid FT mass spectrometer, of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2983–2995. doi:10.1007/s00216-012-5955-1.
- Brosnan, B., Coffey, A., Arendt, E. K., and Furey, A. (2014). The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures. *Talanta* 129, 364–373. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.006.

- Brul, S., and Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1–17.
- Burger, J., Kirchner, M., Bramanti, B., Haak, W., and Thomas, M. G. (2007). Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 3736–3741. doi:10.1073/pnas.0607187104.
- Bustos, A. Y., Font de Valdez, G., and Gerez, C. L. (2018). Optimization of phenyllactic acid production by *Pediococcus acidilactici* CRL 1753. Application of the formulated bio-preserver culture in bread. *Biol. Control* 123, 137–143. doi:10.1016/j.biocontrol.2018.05.017.
- Castro, S. M., Kolomeytseva, M., Casquete, R., Silva, J., Queirós, R., Saraiva, J. A., et al. (2017). Biopreservation strategies in combination with mild high pressure treatments in traditional Portuguese ready-to-eat meat sausage. *Food Biosci.* 19, 65–72. doi:10.1016/j.fbio.2017.05.008.
- Cempírková, R. (2008). Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech J. Anim. Sci.* 52, 387–393. doi:10.17221/2325-CJAS.
- Chamba, J., and Irlinger, F. (2004). Secondary and adjunct cultures. *Cheese Chem. Phys. Microbiol.* 1, 191–206.
- Chandan, R. C. (2006). History and consumption trends. *Manuf. Yogurt Fermented Milks* 1, 5–400.
- Chandan, R. C., and Kilara, A. eds. (2013). *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks: Chandan/Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. Oxford: John Wiley & Sons doi:10.1002/9781118481301.
- Chandi, G. K., and Gill, B. S. (2011). Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: a review. *Int. J. Food Prop.* 14, 503–513.
- Chen, Z., Li, X., and Gao, H. (2018). Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus plantarum* ALAC-4 isolated from Inner Mongolian traditional fermented dairy food. *Int. J. Dairy Technol.* 71, 223–229. doi:10.1111/1471-0307.12426.
- Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., et al. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46, 91–97. doi:10.1016/j.foodcont.2014.05.011.
- Chiocchio, V., and Matković, L. (2011). Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. *J Argent Chem Soc* 98, 10–15.
- Clément, M., Tremblay, J., Lange, M., Thibodeau, J., and Belhumeur, P. (2008). Purification and Identification of Bovine Cheese Whey Fatty Acids Exhibiting *in vitro* Antifungal Activity. *J. Dairy Sci.* 91, 2535–2544. doi:10.3168/jds.2007-0806.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1–20.

- CNIEL (2017). L'économie laitière en chiffres. *Ed. 2017*.
- CNIEL (2018). L'économie laitière en chiffres. *Ed. 2018 CNIEL*.
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., and Gobbetti, M. (2011). Antifungal Activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during Sourdough Fermentation: Identification of Novel Compounds and Long-Term Effect during Storage of Wheat Bread. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 3484–3492. doi:10.1128/AEM.02669-10.
- CODEX Alimentarius Commission (2003). CODEX Alimentarius Commission (2003). CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. Disponible sur. *Codex Stan 243-2003*. Available at: : [www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS\\_243e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf).
- Coélet, V., Gueguen, M., and Vernoux, J. P. (2004). In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *J. Dairy Res.* 71, 451–460. doi:10.1017/S0022029904000469.
- Collins, M., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J., Martinez-Murcia, A., et al. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77, 5–12.
- Coppola, S., Blaiotta, G., and Ercolini, D. (2008). “Dairy Products,” in *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*, eds. L. Cocolin and D. Ercolini (New York, NY: Springer New York), 31–90. doi:10.1007/978-0-387-74520-6\_2.
- Corrieu, G., and Luquet, F.-M. (2008). *Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments*. Lavoisier Available at: <https://books.google.fr/books?id=-f9gAQAQBAJ>.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 253–256.
- Corsetti, A., Rossi, J., and Gobbetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 1–10. doi:10.1016/S0168-1605(01)00567-0.
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., and García, H. S. (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* 173, 30–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016.
- Cosentino, S., Viale, S., Deplano, M., Fadda, M. E., and Pisano, M. B. (2018). Application of Autochthonous *Lactobacillus* Strains as Biopreservatives to Control Fungal Spoilage in Caciotta Cheese. *BioMed Res. Int.* 2018, 1–10. doi:10.1155/2018/3915615.
- Coton, E., and Coton, M. (2009). Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiol.* 26, 52–57. doi:10.1016/j.fm.2008.07.009.

- Coton, E., and Leguerinel, I. (2014). “ECOLOGY OF BACTERIA AND FUNGI IN FOODS I Effects of pH,” in *Encyclopedia of Food Microbiology* (Elsevier), 577–586. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00439-0.
- Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., et al. (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* 29, 88–98. doi:10.1016/j.fm.2011.08.020.
- Crow, V., Curry, B., Christison, M., and Hellier, K. (2002). Raw milk flora and NSLAB as adjuncts. *Aust. J. Dairy Technol.* 57, 99.
- Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013a). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004.
- Crowley, S., Mahony, J., and van Sinderen, D. (2013b). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33, 93–109. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004.
- Curioni, P. M. G., and Bosset, J. O. (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *Int. Dairy J.* 12, 959–984. doi:10.1016/S0958-6946(02)00124-3.
- da Silva Sabo, S., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., and de Souza Oliveira, R. P. (2017). Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. *Food Res. Int.* 99, 762–769. doi:10.1016/j.foodres.2017.05.026.
- Dagnas, S., Gauvry, E., Onno, B., and Membré, J.-M. (2015). Quantifying Effect of Lactic, Acetic, and Propionic Acids on Growth of Molds Isolated from Spoiled Bakery Products. *J. Food Prot.* 78, 1689–1698. doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-046.
- Dalgleish, D. G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter* 7, 2265–2272. doi:10.1039/C0SM00806K.
- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M., and Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2011–2020.
- de Bok, F. A. M., Janssen, P. W. M., Bayjanov, J. R., Sieuwerts, S., Lommen, A., van Hylckama Vlieg, J. E. T., et al. (2011). Volatile Compound Fingerprinting of Mixed-Culture Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6233–6239. doi:10.1128/AEM.00352-11.
- De Jong, C., and Badings, H. T. (1990). Determination of free fatty acids in milk and cheese procedures for extraction, clean up, and capillary gas chromatographic analysis. *J. High Resolut. Chromatogr.* 13, 94–98. doi:10.1002/jhrc.1240130204.
- Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J., and Le Blay, G. (2015). Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np and



- Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1I in yogurt. *Food Microbiol.* 45, 10–17. doi:10.1016/j.fm.2014.04.017.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., and Le Blay, G. (2013a). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* 30, 206–213. doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.043.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., and Le Blay, G. (2013b). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* 30, 206–213. doi:10.1016/j.foodcont.2012.06.043.
- Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., and Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 185–190. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.003.
- Delgado, J., Owens, R. A., Doyle, S., Asensio, M. A., and Núñez, F. (2016). Manuscript title: antifungal proteins from moulds: analytical tools and potential application to dry-ripened foods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6991–7000. doi:10.1007/s00253-016-7706-2.
- Desmaures, N., Bora, N., and Ward, A. C. (2015). “Smear Ripened Cheeses,” in *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses*, eds. N. Bora, C. Dodd, and N. Desmaures (Cham: Springer International Publishing), 1–18. doi:10.1007/978-3-319-10464-5\_1.
- Doyle, M. P., and Buchanan, R. L. eds. (2013). “Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds,” in *Food Microbiology* (American Society of Microbiology), 765–801. doi:10.1128/9781555818463.ch30.
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., et al. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S27–S48. doi:10.1093/femsre/fux030.
- Duboc, P., and Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *First Int. Symp. Exopolysaccharides Lact. Cid Bact. Fundam. Appl.* 11, 759–768. doi:10.1016/S0958-6946(01)00119-4.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2016). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA J.* 14. doi:10.2903/j.efsa.2016.4522.
- El-Shafei, K., Mam, A. E.-G., Dabiza, N., Sharaf, O. M., and Effat, B. A. (2008). A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* P-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in Kareish cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 58. Available at: journal.pan.olsztyn.pl/fd.php?f=1095 [Accessed September 8, 2017].
- European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Technical guidance-Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 6, 732.

- Falguni, P., Shilpa, V., and Mann, B. (2010). Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 70–76. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00553.x.
- FAO (2016). The Global Dairy Sector: Facts. *FAO*. Available at: <https://www.fil-idf.org/wp-content/uploads/2016/12/FAO-Global-Facts-1.pdf>.
- Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8, 44.
- Felis, G., Salvetti, E., and Torriani, S. (2015). Systematic of lactic acid bacteria: current status. *Biotechnol. Lact. Acid Bact. Nov. Appl.*, 25–32.
- Fellows, P. (2000). *Food processing technology: principles and practice*. 2nd ed. Cambridge, England : Boca Raton, FL: Woodhead Pub. ; CRC Press.
- Fernandes, K. E., and Carter, D. A. (2017). The Antifungal Activity of Lactoferrin and Its Derived Peptides: Mechanisms of Action and Synergy with Drugs against Fungal Pathogens. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00002.
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., and Fliss, I. (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control* 78, 350–356. doi:10.1016/j.foodcont.2017.03.007.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. (2016). *Fundamentals of Cheese Science*. Springer US Available at: <https://books.google.fr/books?id=vCLkDAAAQBAJ>.
- Fricker, M., Skånseng, B., Rudi, K., Stessl, B., and Ehling-Schulz, M. (2011). Shift from farm to dairy tank milk microbiota revealed by a polyphasic approach is independent from geographical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 145, S24–S30.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 51–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001.
- Garnier, L. (2017). Production d'ingrédients laitiers fonctionnalisés par des microorganismes producteurs de composés antifongiques.
- Garnier, L., Leyva Salas, M., Pinon, N., Wiernasz, N., Pawtowski, A., Coton, E., et al. (2018). Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *J. Dairy Sci.* doi:10.3168/jds.2017-13518.
- Garnier, L., Valence, F., and Mounier, J. (2017). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* 5, 42. doi:10.3390/microorganisms5030042.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., et al. (2016). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026.

- Gellrich, K., Meyer, H., and Wiedemann, S. (2014). Composition of major proteins in cow milk differing in mean protein concentration during the first 155 days of lactation and the influence of season as well as short-term restricted feeding in early and mid-lactation. *Czech J. Anim. Sci.* 59, 97–106.
- Gerez, C. L., Torino, M. I., Obregozo, M. D., and Font de Valdez, G. (2010). A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. *J. Food Prot.* 73, 758–762.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., and Fox, P. F. (2015). Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 167–178. doi:10.1016/j.tifs.2015.07.016.
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., and Garde, S. (2016). Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 232, 103–110. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031.
- Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., et al. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiol.* 64, 219–225. doi:10.1016/j.fm.2017.01.006.
- Gould, G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 51–64. doi:10.1016/0168-1605(96)01133-6.
- Greco, E., El-Aguizy, O., Ali, M. F., Foti, S., Cunsolo, V., Saletti, R., et al. (2018). Proteomic Analyses on an Ancient Egyptian Cheese and Biomolecular Evidence of Brucellosis. *Anal. Chem.* 90, 9673–9676. doi:10.1021/acs.analchem.8b02535.
- Hammes, W. P., and Hertel, C. (2006). “The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*,” in *The Prokaryotes*, eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (New York, NY: Springer US), 320–403. doi:10.1007/0-387-30744-3\_10.
- Hashem, M., Alamri, S. A., Alrumman, S. A., and Moustafa, M. F. (2016). Suppression of phytopathogenic fungi by plant extract of some weeds and the possible mode of action. *Br Microbiol Res J* 15, 1–13.
- Head, I. M., Saunders, J. R., and Pickup, R. W. (1998). Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. *Microb. Ecol.* 35, 1–21. doi:10.1007/s002489900056.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365s–373s. doi:10.1093/ajcn/73.2.365s.
- Honoré, A. H., Aunbjerg, S. D., Ebrahimi, P., Thorsen, M., Benfeldt, C., Knøchel, S., et al. (2016). Metabolic footprinting for investigation of antifungal properties of *Lactobacillus paracasei*. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 83–96. doi:10.1007/s00216-015-9103-6.

- Huang, Y., Wilson, M., Chapman, B., and Hocking, A. D. (2010). Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. *Food Microbiol.* 27, 33–36. doi:10.1016/j.fm.2009.07.017.
- Hughenoltz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 165–178.
- Hui, Y. H., and Evranuz, E. Ö. eds. (2012). *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hui, Y. H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W.-K., and Stanfield, P. S. (2004). *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. Available at: <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203913550> [Accessed July 26, 2018].
- Huis in't Veld, J. H. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 1–18.
- IDF (1992). General Standard of Identity for Fermented Milks. *Bruss. Int. Dairy Fed.* Standard no. 163.
- IDF (2017). The World Dairy Situation 2017. Bulletin of the International Dairy Federation 489/2017. *IDF Bulletin of the IDF No. 489/ 2017*. Available at: <https://store.fil-idf.org/wp-content/uploads/2017/10/2017WDSs-preview.pdf> [Accessed July 26, 2018].
- Inglis, R. C., Stevens, M. J. A., Meile, L., Lacroix, C., and Meile, L. (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114, 26–29. doi:10.1016/j.mimet.2015.04.011.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., et al. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT* 89, 307–314. doi:10.1016/j.lwt.2017.10.061.
- Kailasapathy, K. (2015). “Chemical Composition, Physical, and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients,” in *Dairy Processing and Quality Assurance*, eds. R. C. Chandan, A. Kilara, and N. P. Shah (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.), 77–105. doi:10.1002/9781118810279.ch04.
- Kanno, C. (1990). Secretory membranes of the lactating mammary gland. *Protoplasma* 159, 184–208. doi:10.1007/BF01322601.
- König, H., and Fröhlich, J. (2017). “Lactic Acid Bacteria,” in *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, eds. H. König, G. Uden, and J. Fröhlich (Cham: Springer International Publishing), 3–41. doi:10.1007/978-3-319-60021-5\_1.
- Kurmann, J. A., Rašić, J. L., and Kroger, M. (1992). *Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J., and Karpíšková, R. (2017). Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as

- bioprotective cultures in dairy products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33. doi:10.1007/s11274-017-2354-y.
- Ladero, V., Martín, M. C., Redruello, B., Mayo, B., Flórez, A. B., Fernández, M., et al. (2015). Genetic and functional analysis of biogenic amine production capacity among starter and non-starter lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* 241, 377–383. doi:10.1007/s00217-015-2469-z.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., and Visconti, A. (2003). Antifungal Activity of Phenyllactic Acid against Molds Isolated from Bakery Products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 634–640. doi:10.1128/AEM.69.1.634-640.2003.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., and Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. Technol.* 92, 455–468. doi:10.1007/s13594-011-0051-4.
- Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., and Barbier, G. (2010). Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 138, 100–107. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.013.
- Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Choiset, Y., et al. (2016a). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020.
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., et al. (2016b). *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control* 60, 247–255. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.034.
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G., et al. (2016c). *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control* 60, 247–255. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.034.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). **FactoMineR** : An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Softw.* 25. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- Ledenbach, L. H., and Marshall, R. T. (2009). “Microbiological Spoilage of Dairy Products,” in *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages*, eds. W. H. Sperber and M. P. Doyle (New York, NY: Springer New York), 41–67. doi:10.1007/978-1-4419-0826-1\_2.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78. doi:10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- Levata-Jovanovic, M., and Sandine, W. E. (1996). Citrate Utilization and Diacetyl Production by Various Strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*1. *J. Dairy Sci.* 79, 1928–1935.



- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., and Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 5, 37. doi:10.3390/microorganisms5030037.
- Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M., et al. (2018). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01787.
- Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., et al. (2014a). Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control* 43, 57–64. doi:10.1016/j.foodcont.2014.02.045.
- Li, L., Shin, S.-Y., Lee, K. W., and Han, N. S. (2014b). Production of natural antimicrobial compound D-phenyllactic acid using *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 whole cells involving highly active D-lactate dehydrogenase. *Lett. Appl. Microbiol.* 59, 404–411. doi:10.1111/lam.12293.
- Linares, D. M., Cruz Martin, M., Ladero, V., Alvarez, M. A., and Fernandez, M. (2011). Biogenic Amines in Dairy Products. *Crit. Rev. FOOD Sci. Nutr.* 51, 691–703. doi:10.1080/10408398.2011.582813.
- Lind, H., Jonsson, H., and Schnürer, J. (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria--contribution of organic acids. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 157–165. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.020.
- Lortal, S., and Boudier, J. (2011). La valorisation de la matière première lait, évolution passée et perspectives. *Innov. Agron.* 13, 1–12.
- Lucas, P., Landete, J., Coton, M., Coton, E., and Lonvaud-Funel, A. (2003). The tyrosine decarboxylase operon of *Lactobacillus brevis* IOEB 9809: characterization and conservation in tyramine-producing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 65–71. doi:10.1016/S0378-1097(03)00787-0.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., and Meca, G. (2017). In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Sci. Technol.* 81, 128–135. doi:10.1016/j.lwt.2017.03.053.
- Lynch, K. M., Pawlowska, A. M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A., et al. (2014). Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 34, 167–173. doi:10.1016/j.idairyj.2013.07.017.
- Lyons, K., Swann, G., Levett, C., Lyons, K., Swann, G., and Levett, C. (2015). Produced but never eaten: a visual guide to food waste. *The Guardian*. Available at: <https://www.theguardian.com/environment/ng-interactive/2015/aug/12/produced-but-never-eaten-a-visual-guide-to-food-waste> [Accessed January 26, 2017].
- Macori, G., and Cotter, P. D. (2018). Novel insights into the microbiology of fermented dairy foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 172–178. doi:10.1016/j.copbio.2017.09.002.

- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 129–135. doi:10.1016/S0378-1097(02)01207-7.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr. Opin. Biotechnol.* 44, 94–102. doi:10.1016/j.copbio.2016.11.010.
- Martley, F. G., and Crow, V. L. (1993). Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *Int. Dairy J.* 3, 461–483. doi:10.1016/0958-6946(93)90027-W.
- Mather, I. H., and Keenan, T. W. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 3, 259–273.
- McSweeney, P. L., and Fox, P. F. (2009). *Advanced dairy chemistry: volume 3: lactose, water, salts and minor constituents*. Springer.
- McSweeney, P., Ottogalli, G., and Fox, P. (2017). “Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview,” in *Cheese* (Elsevier), 781–808. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4.
- Mieszkin, S., Hymery, N., Debaets, S., Coton, E., Le Blay, G., Valence, F., et al. (2017). Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk. *Int. J. Food Microbiol.* doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.013.
- Miyamoto, M., Seto, Y., Hai Hao, D., Teshima, T., Bo Sun, Y., Kabuki, T., et al. (2005). *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables ‘Suan cai’ in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 688–694. doi:10.1016/j.syapm.2005.04.001.
- Mounier, J. (2015). “Microbial Interactions in Smear-Ripened Cheeses,” in *Diversity, Dynamics and Functional Role of Actinomycetes on European Smear Ripened Cheeses*, eds. N. Bora, C. Dodd, and N. Desmasures (Cham: Springer International Publishing), 155–166. doi:10.1007/978-3-319-10464-5\_6.
- Muhialdin, B. J., Hassan, Z., Bakar, F. A., and Saari, N. (2016). Identification of antifungal peptides produced by *Lactobacillus plantarum* IS10 grown in the MRS broth. *Food Control* 59, 27–30. doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.022.
- Nes, I. F., and Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 100–104. doi:10.1016/j.copbio.2004.02.001.
- Nionelli, L., Pontonio, E., Gobetti, M., and Rizzello, C. G. (2018). Use of hop extract as antifungal ingredient for bread making and selection of autochthonous resistant starters for sourdough fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 173–182. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.002.
- Nwodo, U., Green, E., and Okoh, A. (2012). Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14002–14015. doi:10.3390/ijms131114002.

- Odet, G. (1999). "Qualité bactériologique des fromages au lait cru," in *Cahiers de nutrition et de diététique*, 47–53.
- Ogier, J.-C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the Bacterial Microflora in Dairy Products by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3691–3701. doi:10.1128/AEM.68.8.3691-3701.2002.
- Okkers, D. J., Dicks, L. M. T., Silvester, M., Joubert, J. J., and Odendaal, H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 726–734. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00918.x.
- Pederson, C. S. (1971). Microbiology of food fermentations. *Microbiol. Food Ferment.*
- Pfeiler, E. A., and Klaenhammer, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol.* 15, 546–553. doi:10.1016/j.tim.2007.09.010.
- Piper, P. W. (2011). "Resistance of Yeasts to Weak Organic Acid Food Preservatives," in *Advances in Applied Microbiology* (Elsevier), 97–113. doi:10.1016/B978-0-12-387044-5.00004-2.
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009a). *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: Springer US Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92207-2> [Accessed March 24, 2016].
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. (2009b). *Fungi and Food Spoilage*. Boston, MA: Springer US Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-92207-2> [Accessed March 24, 2016].
- Pogačić, T., Maillard, M.-B., Leclerc, A., Hervé, C., Chuat, V., Yee, A. L., et al. (2015). A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. *Food Microbiol.* 46, 145–153. doi:10.1016/j.fm.2014.07.018.
- Pohl, C. H., Kock, J. L., and Thibane, V. S. (2011). Antifungal free fatty acids: a review. *Sci. Microb. Pathog. Curr. Res. Technol. Adv.* 1, 61–71.
- Quattrini, M., Bernardi, C., Stuknyte, M., Masotti, F., Passera, A., Ricci, G., et al. (2018). Functional characterization of *Lactobacillus plantarum* ITEM 17215: A potential biocontrol agent of fungi with plant growth promoting traits, able to enhance the nutritional value of cereal products. *Food Res. Int.* 106, 936–944. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.074.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150, 81–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., et al. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698. doi:10.1111/1574-6976.12030.

- Robinson, R. K. ed. (2002). *Dairy microbiology handbook*. 3rd ed. New York: Wiley Interscience.
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., and Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 48–54. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027.
- Ryan, L. A. M., Zannini, E., Dal Bello, F., Pawlowska, A., Koehler, P., and Arendt, E. K. (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 276–283. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.036.
- Sahu, L., and Panda, S. K. (2018). “Innovative Technologies and Implications in Fermented Food and Beverage Industries: An Overview,” in *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries*, eds. S. K. Panda and P. H. Shetty (Cham: Springer International Publishing), 1–23. doi:10.1007/978-3-319-74820-7\_1.
- Salque, M., Bogucki, P. I., Pyzel, J., Sobkowiak-Tabaka, I., Grygiel, R., Szmyt, M., et al. (2012). Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium bc in northern Europe. *Nature* 493, 522–525. doi:10.1038/nature11698.
- Sanalibaba, P., and Cakmak, G. A. (2016). Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. *Appl. Microbiol. Open Access* 2. doi:10.4172/2471-9315.1000115.
- Schmidt, M., Lynch, K. M., Zannini, E., and Arendt, E. K. (2017). Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. *Food Control*. doi:10.1016/j.foodcont.2017.11.041.
- Schwenninger, S. M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spöndli, C., Bigler, L., et al. (2008). Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. *J. Food Prot.* 71, 2481–2487.
- Schwenninger, S. M., and Meile, L. (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 229.
- Settanni, L., and Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27, 691–697. doi:10.1016/j.fm.2010.05.023.
- Shah, N., and Ravula, R. (2000). Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 55, 127.
- Shakeel, Q., Lyu, A., Zhang, J., Wu, M., Chen, S., Chen, W., et al. (2016). Optimization of the cultural medium and conditions for production of antifungal substances by *Streptomyces platensis* 3-10 and evaluation of its efficacy in suppression of clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) of oilseed rape. *Biol. Control* 101, 59–68. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.06.007.

- Siewewerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., and van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4997–5007. doi:10.1128/AEM.00113-08.
- Silva, M., and Lidon, F. (2016). Food preservatives - An overview on applications and side effects. *Emir. J. Food Agric.*, 1. doi:10.9755/ejfa.2016-04-351.
- Sjogren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J., and Kenne, L. (2003). Antifungal 3-Hydroxy Fatty Acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7554–7557. doi:10.1128/AEM.69.12.7554-7557.2003.
- Smid, E. J., and Kleerebezem, M. (2014). Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5, 313–326. doi:10.1146/annurev-food-030713-092339.
- Smit, G., Smit, B. A., and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. doi:10.1016/j.fmre.2005.04.002.
- Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. doi:10.1021/ac051437y.
- Sobrino-López, A., and Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* 18, 329–343. doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.009.
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. *J. Dairy Sci.* 88, 2289–2294. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4.
- Spreer, E., and Mixa, A. (1998). *Milk and dairy product technology*. New York: M. Dekker.
- Sriwattanachai, S., Sadiq, M. B., and Anal, A. K. (2018). Synergistic antifungal effects of thyme essential oil and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatant against *Penicillium* spp. and in situ effects. *J. Food Process. Preserv.* 42, e13400. doi:10.1111/jfpp.13400.
- Stark, J., and Tan, H. S. (2003). “Natamycin,” in *Food preservatives* (Springer, Boston, MA: Russell N.J., Gould G.W.), 179–195.
- Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8, 311–317. doi:10.1016/S0956-7135(97)00050-9.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.
- Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1–29. doi:10.1016/S0168-1605(96)01233-0.



- Streekstra, H., Verkennis, A. E. E., Jacobs, R., Dekker, A., Stark, J., and Dijksterhuis, J. (2016). Fungal strains and the development of tolerance against natamycin. *Int. J. Food Microbiol.* 238, 15–22. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.006.
- Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., and Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4322–4327. doi:10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002.
- Švec, P., Dráb, V., and Sedláček, I. (2005). Ribotyping of *Lactobacillus casei* group strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol. (Praha)* 50, 223–228. doi:10.1007/BF02931570.
- Tailliez, P. (2001). Mini-revue : les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le Lait* 81, 1–11. doi:10.1051/lait:2001101.
- Tamime, A. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, S2–S15. doi:10.1038/sj.ejcn.1601657.
- Theron, M. M., and Lues, J. F. R. (2011). *Organic acids and food preservation*. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Thierry, A., Collins, Y. F., Abeijón Mukdsi, M. C., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., and Spinnler, H. E. (2017). “Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese,” in *Cheese* (Elsevier), 423–444. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X.
- Thierry, A., Maillard, M.-B., Richoux, R., and Lortal, S. (2006). Ethyl Ester Formation Is Enhanced by Ethanol Addition in Mini Swiss Cheese with and without Added Propionibacteria. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6819–6824. doi:10.1021/jf060673m.
- Thierry, A., Pogačić, T., Weber, M., and Lortal, S. (2015). “Production of Flavor Compounds by Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods,” in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, eds. F. Mozzi, R. R. Raya, and G. M. Vignolo (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 314–340. doi:10.1002/9781118868386.ch19.
- Tungjaroenchai, W., White, C. H., Holmes, W. E., and Drake, M. A. (2004). Influence of Adjunct Cultures on Volatile Free Fatty Acids in Reduced-Fat Edam Cheeses. *J. Dairy Sci.* 87, 3224–3234. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73458-X.
- Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int. Dairy J.* 5, 877–903.
- Valdes-Stauber, N., Götz, H., and Busse, M. (1991). Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 119–130.
- Valerio, F., Di Biase, M., Lattanzio, V. M. T., and Lavermicocca, P. (2016). Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 222, 1–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.011.
- van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., van Hylckama Vlieg, J., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., et al. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria:

- predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12, 111–121. doi:10.1016/S0958-6946(01)00132-7.
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vael, C., Klare, I., Romond, M.-B., et al. (2008). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends Food Sci. Technol.* 19, 102–114. doi:10.1016/j.tifs.2007.07.013.
- Verdier-Metz, I., Gagne, G., Bornes, S., Monsallier, F., Veisseire, P., Delbès-Paus, C., et al. (2011). Cow teat skin, a potential source of microbial diversity for cheese production. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM-06229.
- Vigne, J.-D., and Helmer, D. (2007). Was milk a “secondary product” in the Old World Neolithisation process? Its role in the domestication of cattle, sheep and goats. 32.
- Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., and Qi, W. (2012). Production and Characterization of Antifungal Compounds Produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS ONE* 7, e29452. doi:10.1371/journal.pone.0029452.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., and Ryu, H.-W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. 11.
- Wood, B. J. B., and Holzapel, W. H. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston, MA: Springer US Available at: <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3080503> [Accessed August 1, 2018].
- Wyder, M.-T., Bachmann, H.-P., and Puhan, Z. (1999). Role of Selected Yeasts in Cheese Ripening: An Evaluation in Foil Wrapped Raclette Cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 32, 333–343. doi:10.1006/fstl.1999.0555.
- Yada, R. Y. (2017). *Proteins in Food Processing*. Elsevier Science Available at: <https://books.google.fr/books?id=boeZDgAAQBAJ>.
- Yang, E. J., and Chang, H. C. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 139, 56–63. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.012.
- Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Hu, X., et al. (2014). Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *J. Archaeol. Sci.* 45, 178–186. doi:10.1016/j.jas.2014.02.005.
- Yoon, M.-H. (2016). Production and antifungal effect of 3-phenyllactic acid (PLA) by lactic acid bacteria. *J. Appl. Biol. Chem.* 59, 173–178.
- Zannini, E., Waters, D. M., Coffey, A., and Arendt, E. K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 1121–1135. doi:10.1007/s00253-015-7172-2.



## **Valorisation de la thèse**

## **Publications acceptées dans des revues internationales à comité de lecture**

1. **Leyva Salas M**, Thierry A, Lemaître M, Garric G, Harel-Oger M, Chatel M, Lê S, Mounier J, Valence F, Coton E. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Mimicking Models and Their Potential as Bioprotective Cultures in Pilot Scale Applications. *Frontiers Microbiology*. 2018; 9:1787. doi: 10.3389/fmicb.2018.01787
  2. Coton M, Lebreton M, **Leyva Salas M**, Garnier L, Navarri M, Pawtowski A, Le Blay G, Valence F, Coton E, Mounier J. Biogenic amine and antibiotic resistance profiles determined for lactic acid bacteria and a propionibacterium prior to use as antifungal bioprotective cultures. *International Dairy Journal*. 2018; 85, 21-26. doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.05.001
  3. Garnier L, **Leyva Salas M**, Pinon N, Wiernasz N, Pawtowski A., Coton E, Mounier J, Valence F. Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. *Journal of Dairy Science*. 2018; 101 (6) 4971-4976. doi.org/10.3168/jds.2017-13518
  4. **Leyva Salas M**, Mounier J, Valence F, Coton M, Thierry A, Coton E. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation-A Review. *Microorganisms*. 2017; 5(3). pii: E37. doi: 10.3390/microorganisms5030037
- ***Publication à soumettre dans une revue internationale à comité de lecture***
1. **Leyva Salas M**, Mounier J, Maillard M-B, Rebours B, Valence F, Coton E, Thierry A. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products



- ***Communications orales***

1. **Leyva Salas M.**, Lemaître M., Maillard M., Valence F., Mounier J, Thierry A., Coton E. Selection of antifungal lactic acid bacteria strains in dairy models and antifungal molecule identification. *VIIIe Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne*. Camaret-sur-Mer (AFEM), France, 17-20 octobre 2017.
2. **Leyva Salas M.**, Mounier J., Maillard M., Valence F., Coton E., Thierry A. Antifungal lactobacilli combinations: identification of antifungal compounds produced in dairy products. *XIVe congrès national de la Société Française de Microbiologie (SFM)*, Paris, France, 1 - 3 octobre 2018.

- ***Communications affichées***

1. **Leyva Salas M.**, Lemaître M., Maillard M., Valence F., Mounier J, Thierry A., Coton E. Selection of antifungal lactic acid bacteria strains in dairy models and antifungal molecule identification. *Microbial Spoilers in Food*, Quimper, France, 28 juin 2017. (Présentation en *Flash Poster* également)
2. **Leyva Salas M.** Gilles Garric G., Marielle Harel-Oger M., Manon Chatel M., Lê S., Valence F., Mounier J, Thierry A., Coton E.. Antifungal lactic acid bacteria combinations as biopreservation tool in cheese production. *The 10th Cheese Symposium*, Rennes, France, 4 – 6 avril 2018
3. **Leyva Salas M.**, Valence F., Mounier J, Thierry A., Coton E. Production de molécules antifongiques par des bactéries levains dans les matrices laitières : Identification, mode d'action des molécules et interactions avec la matrice. *Journée PROFIL*, 21 septembre 2017
4. **Leyva Salas M.** Activité antifongique des bactéries dans des matrices laitières : Identification des molécules et interactions avec la matrice. *Opération de communication grand public*, STLO, Rennes, septembre 2017



## VIII<sup>e</sup> Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne

17-20 oct. 2017 Camaret-sur-Mer (France)

### **Selection of antifungal lactic acid bacteria strains in dairy models and antifungal molecule identification**

Marcia Leyva Salas<sup>1,2</sup>, Mathilde Lemaître<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Florence Valence-Bertel<sup>2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Anne Thierry<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

<sup>2</sup>UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35000 Rennes, France.

**Keywords:** *antifungal activity, adjunct culture, biopreservation, dairy products, antifungal molecules, chromatography*

Food spoilage is a major issue for the food industry, leading to important food waste and economic losses. Dairy products, despite their microbial stability, are susceptible to acid-tolerant fungal contaminants. In this context, antifungal cultures are of growing interest as an alternative to chemical preservatives or a complement tool to hurdle technologies. In order to select antifungal culture associations, 32 strains (19 *Lactobacillus*, 4 *Leuconostoc*, and 9 *Propionibacterium*) were screened, alone and in combination, and compared to commercial bioprotective cultures against 4 fungal common contaminants of dairy products (*Mucor racemosus*, *Penicillium commune*, *Yarrowia lipolytica*, and *Galactomyces geotrichum*). Since the matrix can modulate the activity of antifungal adjunct cultures, the screening was performed in cheese and yogurt-mimicking models. For three selected associations, the metabolites potentially associated with antifungal activity were investigated using 4 liquid and gas chromatographic methods. Antifungal screening allowed for the selection of 5 *Lactobacillus* strains, their use in combination showed that 3 binary associations were of interest as potential antifungal bioprotective cultures. From the metabolic point of view, 16 molecules of interest were identified and differential metabolite production was observed according to the considered model. The 3 selected associations and their metabolites are natural antifungal alternatives of interest for the dairy industry



## **Antifungal lactobacilli combinations: identification of antifungal compounds produced in dairy products**

Marcia Leyva Salas<sup>1,2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Florence Valence<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup> and Anne Thierry<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France.

<sup>2</sup>UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France.

Fungi are commonly responsible for dairy product spoilage, which leads to substantial economic losses for the dairy industry as well as consumer dissatisfaction. Lactic acid bacteria can play an active role in the bioprotection of fermented dairy product, by producing a large range of antifungal metabolites. In a previous study, 3 binary combinations of lactobacilli strains were selected from a screening of the antifungal activity of 32 strains tested as adjunct cultures in yogurt and cheese models and the applicability of 2 of them in dairy products was validated at the pilot scale in sour cream and semi-hard cheese. Thus, the aim of the present study was to investigate the compounds produced by these antifungal cultures in these dairy products with a potential role in the observed antifungal activity. Using four different analytical methods including high performance liquid chromatography and gas chromatography combined or not with mass spectrometry, 53 compounds with known antifungal activity were detected in at least one of the four dairy products analyzed. Each antifungal culture produced a cocktail of 1 to 27 compounds, depending on the product. Acetic acid, diacetyl, hydroxyphenyllactic acid, pyruvic acid, phenyllactic acid, succinic acid, decanoic acid and some long-chain unsaturated fatty acids were the most commonly identified compounds. Their concentrations markedly differed according to the considered dairy product. Lactic, acetic, and citric acids were the most abundant compounds, while most of the other compounds were present in concentrations <100 mg/kg. Thirty-one compounds were in significantly higher concentrations ( $p$ . value < 0.05) in at least one product inoculated with 1 or more of the tested antifungal cultures compared to the controls without antifungal culture. Overall, by analyzing the antifungal compounds in 4 dairy products, this study provides an expanded view of compounds produced by efficient antifungal culture



# Selection of Antifungal Lactic Acid Bacteria Combinations in Dairy Models and Antifungal Molecule Identification

Marcia Leyva Salas<sup>1,2</sup>, Mathilde Lemaître<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Florence Valence<sup>2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Anne Thierry<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Brest, EA 3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESAIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané  
<sup>2</sup> UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, 65 rue de Saint Briec, 35000 Rennes.

## Context



Dairy products are susceptible to acid-tolerant fungal contaminants



**Consequences:**  
Food waste & Economic losses



**Solution:** Antifungal cultures are of growing interest as an alternative to chemical preservatives or a complement tool to hurdle technologies

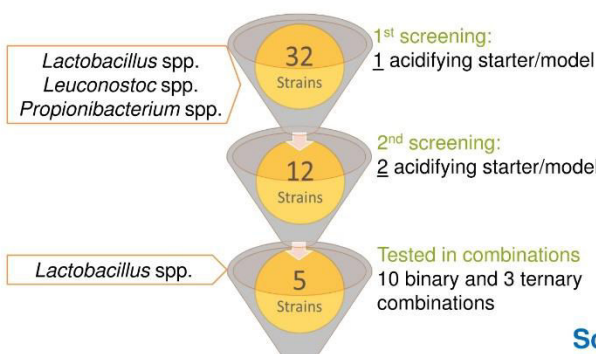
## Objective

To characterize the antifungal activity of lactic acid bacteria combinations as adjunct cultures in dairy models

## Strategy & Results

### Screening Strategy

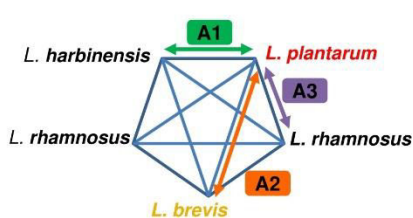
- Screening in 24 well plates
- 2 models: mimicking **Cheese & Yogurt**
- Strains added as **adjunct cultures** along with the acidifying starter



- ➔ Antifungal activity was higher in cheese than in yogurt model
- ➔ The different acidifying starters tested did not modify the antifungal activity of the 12 strains with high antifungal activity
- ➔ Antifungal activity  $\geq$  that of commercial cultures  
Species diversity potentially linked to molecule diversity

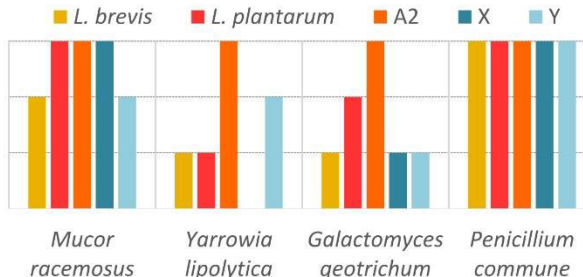
**Screening of the antifungal activity led to the selection of 5 antifungal strains**

### 13 combinations with the 5 selected lactobacilli



3 binary combinations selected because of their higher antifungal activity than the strains alone

**Antifungal score:**  
3: total  $\rightarrow$  3  
inhibition  
0: no inhibition  $\rightarrow$  0



- ➔ The 3 combinations improved both antifungal activity and action spectrum
- ➔ The 3 combinations showed a higher antifungal activity than commercial cultures against the most resistant targets: *Y. lipolytica* and *G. geotrichum*
- ➔ The 3 combinations had a broad inhibition spectrum: 6-9 fungi of the 10 tested

### Action spectrum tested against 10 spoiling fungi

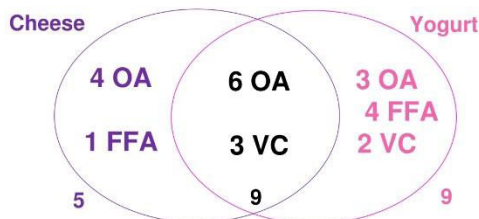
- *Mucor racemosus*
- *Penicillium commune*
- *Yarrowia lipolytica*
- *Galactomyces geotrichum*
- *Penicillium bialowiezense*
- *Phoma pinodella*
- *Candida parapsilosis*
- *Rhodotorula mucilaginosa*
- *Meyerozyma guilliermondii*
- *Trichosporon asahii*

Example of the antifungal activity against 4 fungal targets in cheese model for 2 A2 strains (individually or combined) in comparison with 2 commercial antifungal cultures (X and Y)

**The 3 binary combinations (A1, A2 & A3) exhibited high antifungal activity and broad action spectrum**

### Metabolomics using 4 chromatographic methods

- HPLC-UV/RI Organic Acids (OA)
- LC-MS  $\rightarrow$  for Organic Acids (OA)
- GC-FID  $\rightarrow$  for Fatty Acids (FFA)
- GC-MS  $\rightarrow$  for Volatile Compounds (VC)



Antifungal molecules produced in significantly higher amounts by the 3 tested combinations in comparison to the controls

➔ Different antifungal molecules produced in the tested models rises the question of the matrix effect

**Overall, 23 antifungal molecules produced in higher concentrations in the presence of at least 1 of the 3 selected antifungal combinations, compared to the control models**

## Conclusions

The screening strategy was successful to select antifungal cultures active in dairy matrices. The 3 selected combinations and their metabolites are natural antifungal alternatives of interest for the dairy industry.

## Perspectives

The observed matrix-dependent effect shows the importance of *in situ* tests. Thus, challenge-tests are in process to determine the antifungal activity of the selected combinations in pilot-scale dairy products.





### Axe 1

## Propriétés Antifongiques

Thèse

2015-2018



<sup>1</sup>Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise 29280 Plouzané

<sup>2</sup>UMR INRA - Agrocampus Ouest Science et technologie du lait et de l'œuf 65 rue de Saint Briec 35000 Rennes

### Mots-clés

Produits laitiers  
Bactéries lactiques  
Molécules antifongiques  
Levains additionnels

# Production de molécules antifongiques par des bactéries levains dans les matrices laitières : Identification, mode d'action des molécules et interactions avec la matrice

Marcia Leyva Salas <sup>1,2</sup>, Florence Valence<sup>2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Anne Thierry<sup>2</sup>, Emmanuel Coton<sup>1</sup>

## Contexte socio-économique

- Les produits laitiers sont sensibles aux contaminations fongiques



- La bioprotection répond à la demande sociétale des consommateurs pour des solutions naturelles de conservation

## Contexte scientifique

- Les bactéries lactiques et propioniques sont connues pour leur potentiel antifongique et leur statut d'innocuité.

- Beaucoup d'études de l'activité antifongique des bactéries ont été réalisées dans des milieux synthétiques mais peu d'études dans des matrices alimentaires

- Manque de connaissances sur les molécules support de l'activité antifongique et sur les facteurs affectant leur production et leur efficacité

## Objectifs

- Identifier des associations de souches utilisables dans les matrices laitières comme levains additionnels à activité antifongique
- Identifier les molécules supports de l'activité et leurs interactions avec la matrice

## Stratégie et Résultats

- Criblage *in situ* de souches à activité antifongique**

Criblage en plaque 24 puits  
32 souches de *Lactobacillus* spp.  
*Leuconostoc* spp. *Propionibacterium* spp.  
testées comme levains additionnels  
2 matrices : rétentat d'ultra filtrat de lait & yaourt  
4 cibles fongiques

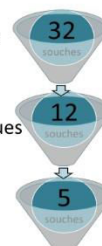


1<sup>er</sup> criblage:

1 levain technologique par matrice

2<sup>ème</sup> criblage:

2 levains technologiques par matrice

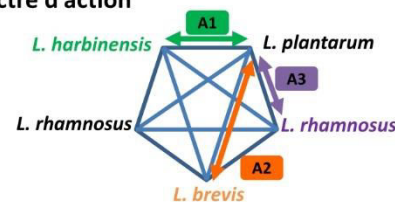


→ Sélection de 5 souches de lactobacilles à activité antifongique

- Association de souches : activité antifongique et spectre d'action**

13 associations des 5 lactobacilles  
Spectre d'action contre 10 cibles fongiques

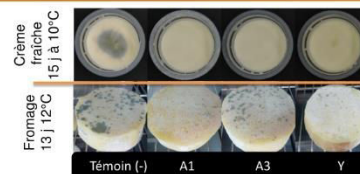
→ Forte activité antifongique et large spectre d'action des 3 associations binaires A1, A2 & A3



- Challenge-tests en crème fraîche et fromage**

Associations A1 et A3 utilisées comme levain additionnel

→ Activité antifongique des associations A1 et A3 observée dans les deux produits laitiers (plus marquée dans la crème fraîche)



Inhibition de *Penicillium commune* par A1, A3 et une culture antifongique commerciale (Y)

- Identification, mode d'action des molécules et interaction avec la matrice**

Identification des molécules produites par les associations dans les 4 matrices (yaourt, rétentat, crème fraîche et fromage) par 4 techniques chromatographiques

→ 23 molécules antifongiques retrouvées en concentrations plus élevées dans les matrices yaourt et rétentat en présence des associations que dans les témoins

## Conclusion

- La stratégie de criblage a permis de sélectionner 2 associations qui montrent une activité antifongique dans des produits réels

## Perspectives

- Identifier les molécules impliquées et évaluer leur contribution respective à l'activité
- Évaluer comment la matrice module l'efficacité des molécules antifongiques



Avec le soutien de



Financements







Marcia LEYVA



Bourse de thèse  
Région Bretagne et  
Pays de la Loire

2015-2018



UMR INRA - Agrocampus Ouest  
Science et Technologie  
du Lait et de l'Oeuf

**Equipe MicroBio**

Microbiologie des filières  
lait et oeuf

**Mots-clés**

Produits laitiers  
Bactéries lactiques  
Molécules antifongiques  
Levains additionnels

**Financiers**



**Collaborateurs**



# Activité antifongique des bactéries dans des matrices lactières : Identification des molécules et interactions avec la matrice

## Contexte socio-économique

- Les produits laitiers sont sensibles aux contaminations fongiques



Ce qui entraîne



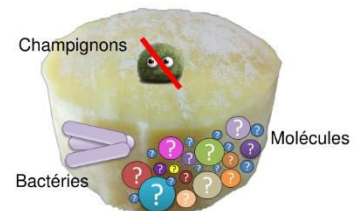
- La biopreservation répond à la demande des consommateurs pour des solutions naturelles de conservation

## Contexte scientifique

- Les bactéries lactiques et propioniques sont connues pour leur potentiel antifongique et leur statut d'innocuité.
- De nombreuses études de l'activité antifongiques des bactéries dans des milieux synthétiques
  - mais peu d'études dans des matrices alimentaires
- Les molécules produites par les bactéries antifongiques agissent en synergie
  - manque de connaissances sur les molécules principales de l'activité antifongique et sur les facteurs affectant leur production et leur efficacité

## Question de recherche

- Quelles sont les **molécules antifongiques** produites par les bactéries à activité antifongique **sélectionnées** et leurs **interactions** avec la **matrice**?



## Résultats attendus

Méthode de **criblage** de l'activité antifongique sur **matrice lactière**



**Sélectionner** des bactéries antifongiques comme levains additionnels

Identifier les **molécules antifongiques**

Déterminer l'**interaction** des molécules antifongiques avec la **matrice**

Valider l'efficacité des bactéries antifongiques à l'**échelle pilote**

## Perspectives

- Utiliser ces nouvelles bactéries antifongiques comme levains additionnels pour la préservation de produits laitiers.
- Approfondir le mécanisme d'action des molécules antifongiques sur les cibles fongiques.



# Antifungal lactic acid bacteria combinations as biopreservation tool in cheese production

Leyva Salas Marcia<sup>1,2\*</sup>, Garric Gilles<sup>2</sup>, Camier Bénédicte<sup>2</sup>, Harel-Oger Marielle<sup>2</sup>, Chatel Manon<sup>2</sup>, Lê Sebastien<sup>3</sup>, Valence Florence<sup>2</sup>, Mounier Jérôme<sup>1</sup>, Thierry Anne<sup>2</sup>, Coton Emmanuel<sup>1</sup>

## Introduction

### Context

Dairy products are susceptible to acid-tolerant fungal contaminants, causing food waste & economic losses



### Opportunity

Antifungal cultures are of growing interest as an alternative to chemical preservatives or a complement tool to hurdle technologies



### Objective

To develop lactic acid and/or propionic acid bacteria antifungal cultures for the biopreservation of dairy products

## In-vitro: screening of antifungal activity

### Strategy

#### 1 Screening approach

- 24 well plates in cheese-mimicking & yogurt models



- 32 tested strains:
  - 19 *Lactobacillus* spp.
  - 4 *Leuconostoc* spp.
  - 9 *Propionibacterium* spp.

Added as adjunct cultures along with the commercial starter

- 4 fungal targets:

*Mucor racemosus*, *Penicillium commune*, *Galactomyces geotrichum* and *Yarrowia lipolytica*

#### 2 Binary combinations of the most antifungal strains

#### 3 Safety assessment

- Biogenic amines production and antibiotic resistance evaluation

### Results

- 1 Antifungal activity higher in cheese-mimicking than in yogurt model

➤ 5 antifungal *Lactobacillus* strains selected for test in combinations

- 2 Three binary combinations showed an improvement of the antifungal activity compared to the corresponding pure cultures

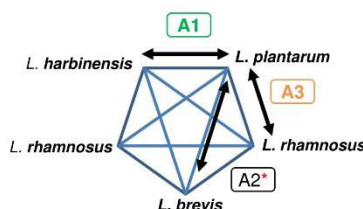


Figure 1. 10 binary combinations of the 5 selected *Lactobacillus* tested

- 3 \*A2 discarded because *L. brevis* harbors biogenic amines associated genes

➤ 2 combinations (A1 & A3) selected for evaluation in semi-hard cheese

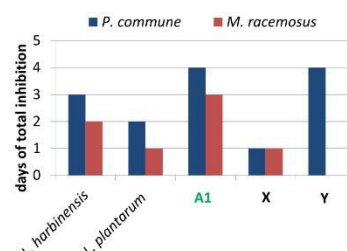


Figure 2. Illustrating the antifungal activity improvement of combination A1 against 2 fungi, compared to that of the corresponding strains in pure culture. A1 antifungal activity was  $\geq$  to that of the X and Y commercial antifungal cultures

## In-situ: evaluation in cheese at pilot scale

### Strategy

#### Semi-hard cheese manufacture at pilot scale using:

- combination A1 or A3
- or a commercial antifungal culture Z
- or without antifungal culture (control)



#### Evaluation of antifungal activity:

- 1 Challenge-test: upper cheese surface inoculated with fungal targets and growth follow-up in ripening chambers (12°C)

- 2 Durability test: antifungal activity in a naturally contaminated environment

- 3 Evaluation of organoleptic impact by a sorting task approach

### Results

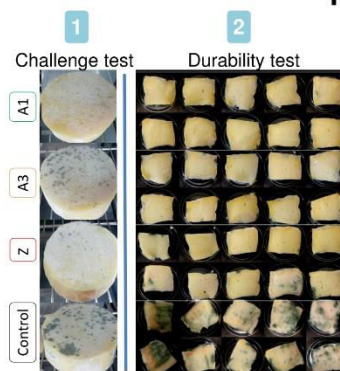


Figure 3. Inhibition of *Penicillium commune* (challenge-test) and natural contamination (durability test) after 13 days at 12°C

#### 3 Sensory analysis

Control cheeses (C1 & C2) significantly ( $p < 0.2$ ) characterized as *tasteless*, whereas cheeses A1 and Z were associated with a more *acidic*, *pungent*, and/or *bitter* flavor

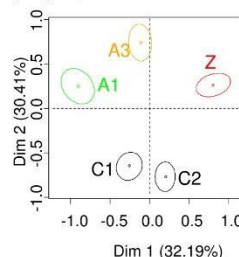


Figure 4. Correspondence analysis with confidence ellipses made from the contingency table of sensory descriptors in the different cheeses with A1, A3, Z and no antifungal culture (C1 and C2)

➤ A1 & A3 combinations exhibited antifungal activity in semi-hard cheese. Cheese A1 and A3 showed a more marked, but acceptable, flavor compared to the control cheeses and were close to cheese with the commercial antifungal culture

## Conclusions

- The screening strategy was successful to select antifungal cultures active in semi-hard cheese.
- The two selected combinations are natural antifungal alternatives of interest for the dairy industry.

## Perspectives

The production of antifungal molecules and pH decrease are the main factors contributing to lactic acid bacteria antifungal activity in foods. The identification of the antifungal molecules involved in the observed antifungal activity is thus in process.

<sup>1</sup>Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESIB, Université de Brest, EA 3882, Plouzané, France.

<sup>2</sup>UMR1253 Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France

<sup>3</sup>Applied Mathematics Department, Agrocampus Ouest, Rennes, France





**Titre :** Cultures antifongiques applicables comme ferments de bioprotection dans les produits laitiers : sélection, évaluation à l'échelle pilote et identification de composés supports de l'activité

**Mots clés :** *produits laitiers, contamination fongique, bioprotection, ferments additionnels, bactéries lactiques, composés antifongiques*

**Résumé :** La contamination fongique des produits laitiers est à l'origine de pertes économiques conséquentes et de gaspillage alimentaire. Dans un contexte de demande pour plus de « naturalité », les cultures de bioprotection et leurs métabolites représentent une alternative d'intérêt aux conservateurs chimiques pour lutter contre ces contaminants.

Les objectifs de cette thèse étaient i) de sélectionner des micro-organismes présentant une activité antifongique, pour élaborer des cultures de bioprotection applicables dans des produits laitiers, et ii) d'étudier les composés potentiellement supports de l'activité antifongique observée. Dans un premier temps, l'activité antifongique de 32 souches de bactéries lactiques et propioniques a été étudiée en modèles « fromage » et « yaourt ». L'étude de combinaisons de souches et de leur innocuité a conduit à sélectionner 2 combinaisons binaires de lactobacilles (A1 et A3). Leur efficacité et applicabilité a été évaluée à l'échelle pilote en fabrication de de crème fraîche et de fromage.

Les challenges tests et tests d'usages ont montré que selon le produit laitier, A1 et A3 ont une activité antifongique similaire ou supérieure que les cultures bioprotectrices commerciales. Selon l'inoculum ajouté, ces cultures n'impactent pas les caractéristiques technologiques et organoleptiques des produits laitiers. Des méthodes chromatographiques des composés antifongiques suivies d'analyses statistiques ont permis de mettre en évidence des « cocktails » de 2 à 17 composés, selon la matrice et la culture considérée, qui sont probablement supports de l'activité antifongique.

Ces travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes d'action de l'activité antifongique et devraient conduire au développement de cultures antifongiques pour remplacer les conservateurs dans les produits laitiers.

**Title :** Antifungal microorganisms applicable as bioprotective cultures in dairy products: Selection, pilot-scale evaluation and identification of the compounds supporting the activity

**Keywords :** *dairy products, fungal contamination, biopreservation, adjunct cultures, lactic acid bacteria, antifungal compounds*

**Abstract :** Fungal contamination of dairy products is responsible for economic losses and food waste. In a context of "preservative-free" product demand, bioprotective cultures and their metabolites represent an alternative of interest to chemical preservatives to control these spoilers.

The objective of this study was i) to select microorganisms exhibiting an antifungal activity, in order to elaborate bioprotective cultures applicable in dairy products, and ii) to study the compounds potentially supporting the observed activity. Firstly, the antifungal activity of 32 strains of lactic acid and propionic bacteria was screened in cheese model and yogurt. Strain combination study and safety assessment led to the selection of 2 binary lactobacilli combinations (A1 and A3). Their efficiency and applicability were then evaluated in pilot-scale productions of sour cream and cheese.

Challenge and shelf life tests showed that depending on the dairy product, A1 and A3 have a similar or higher antifungal activity than the commercial bioprotective cultures. In addition, depending of inoculum, A1 and A3 did not impact the technological and organoleptic characteristics. Chromatographic methods and statistical analyses allowed identifying cocktails of 2 to 17 compounds, according to the considered dairy product and culture that probably support the antifungal activity. The obtained results contribute to a better understanding of the antifungal activity action mechanisms and should lead to the development of antifungal cultures to replace preservatives in dairy products.