



Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus

Emilie Delavenne

► To cite this version:

Emilie Delavenne. Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2012. Français. NNT : 2012BRES0085 . tel-02358823

HAL Id: tel-02358823

<https://theses.hal.science/tel-02358823v1>

Submitted on 12 Nov 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.



université de bretagne
occidentale



THESE / UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le titre de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : Biologie et Santé

Spécialité : Microbiologie

Ecole Doctorale SICMA

présentée par

Emilie DELAVENNE

préparée au Laboratoire Universitaire de
Biodiversité et Ecologie Microbienne (EA 3882)

Propriétés antifongiques de bactéries lactiques isolées de laits crus

Thèse soutenue le 16 mars 2012

devant le jury composé de :

Françoise LEROI

Chercheur, IFREMER, Nantes / Rapporteur

Sylvie LORTAL

Directrice de recherche, INRA, Rennes / Rapporteur

Christophe LACROIX

Professeur, ETH, Zurich, Suisse / Examineur

Françoise IRLINGER

Ingénieur de recherche, INRA, Grignon / Examineur

Georges BARBIER

Professeur, Université de Brest / Président du Jury

Gwenaëlle LE BLAY

Professeur, Université de Brest / Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, à Plouzané. Elle s'inscrit dans le projet FUNGINIB, élaboré par Gwenaëlle Le Blay, ma directrice de thèse, et financé par l'Agence Nationale de la Recherche. La bourse de thèse m'a été attribuée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je tiens à remercier Françoise Leroi, Sylvie Lortal, Christophe Lacroix et Françoise Irlinger, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie du jury chargé d'évaluer ce travail. Je leur suis reconnaissante du temps et de l'énergie qu'ils y auront consacrés.

Je remercie Georges Barbier, directeur du LUBEM, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour l'aide qu'il a su m'apporter au cours de ces trois années passées ici.

Gwenaëlle, merci pour l'énergie que tu as dépensée pour me faire venir à Brest, et pour m'avoir ensuite si bien accueillie ! Mon arrivée en territoire inconnu n'aurait pas pu se faire dans de meilleures conditions. Je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance pour la confiance que tu m'as accordée en me laissant travailler sur ce projet. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour tes enseignements et pour ton investissement dans l'écriture des articles et dans la correction de mon manuscrit. J'ai conscience que travailler avec toi a été une grande chance pour moi. Merci pour ta gentillesse et ton professionnalisme. Je te souhaite beaucoup de plaisir et de réussite dans tes nouvelles fonctions.

J'ai aussi eu la chance incroyable de travailler dans un laboratoire où l'ambiance au quotidien était des plus agréables. J'exprime donc ma profonde gratitude à l'ensemble du personnel. Et je pense à Jérôme en particulier : tu tiens un rôle important dans cette bonne humeur générale. Ton caractère avenant m'a permis de venir te poser beaucoup de questions, même les plus idiotes. Merci pour ta disponibilité, pour toute l'aide que tu m'as apportée et pour tous les conseils judicieux que tu m'as donnés. Je tiens également à t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton enthousiasme et ta façon de positiver en toute circonstance. Ce sont des atouts très précieux et le meilleur moteur qui soit ! Et merci aussi, c'est important, pour tous les bons moments passés en dehors du laboratoire.

Je tiens également à manifester toute ma gratitude aux locataires du bureau voisin : merci Audrey pour ta jovialité, et pour tous les biens précieux services que tu m'as rendus, dans le projet, mais aussi en dehors (je parle au nom de Zéphyr également). Bien sûr, merci à toi aussi, Franck, pour la part active que tu as eu dans la thèse. Merci de partager ton métier et tes idées avec passion.

Gaëtan B., Loïc, Jean-Luc, merci à vous aussi. Vos petites blagues (qui rapidement n'ont plus fonctionné...) m'ont fait bien rire, après avoir, bien sûr, fait leur petit effet ! Sans vous, rien n'aurait été pareil. Loïc, si tu y tiens vraiment, apporte-moi l'affiche, je te le signerai cet autographe ! Jean-Luc : merci aussi pour ton aide et ta gentillesse. J'ai adoré t'écouter raconter tes (trop nombreuses ?) mésaventures. J'en rie encore, et ne me lasserai jamais de les réentendre.

Laetitia, je suis heureuse d'avoir fait ta connaissance (ainsi que celle de ta petite Léa). Je te dirai simplement merci d'être passée par le LUBEM, et merci pour toutes les discussions et tous les bons moments partagés avec toi.

Sandy, je tiens à te remercier pour tous les petits moments passés en ta compagnie. Ta capacité à nouer des contacts avec les gens m'a permis de facilement parler avec toi.

Merci à Marie : grâce à ton large savoir sur les champignons, tu m'as guidée au départ pour m'aider à m'y retrouver dans un domaine totalement inconnu pour moi. Tes conseils ont été bien utiles pour aider ce projet à démarrer. Merci à Sylvie pour les centaines de litres de milieux de culture et les milliers de boîtes qu'elle m'a préparés ! Merci aussi à Christophe pour m'avoir si souvent dépannée en nombreux produits et milieux de culture, sans lesquels j'aurais été bien ennuyée...

Danielle et Stella, je vous remercie pour votre gentillesse et pour m'avoir toujours rendu service quand je vous sollicitais, surtout lorsque le moment n'était pas forcément bien choisi.

Je pense également à ceux avec qui j'ai partagé le bureau ou avec qui je n'ai pas eu le temps de le faire. Vanessa, garde toujours ta bonne humeur et ton rire communicatif ! C'est ce qui contribue à conserver une bonne ambiance dans un lieu. Youenn, je suis contente que tu aies permis au laboratoire de bactériologie de voir d'autres têtes que la mienne... Dans l'ordre des futures soutenances : Antoine, Youenn, Vanessa et Kevin, je vous souhaite le meilleur pour la suite de votre thèse.

Une pensée également pour tous les stagiaires qui ont mis le pied à un moment ou à un autre dans ce projet. Dans l'ordre chronologique, Audrey, Katia, Adeline et Rached, merci pour votre aide, votre gentillesse et votre bonne humeur.

Mes remerciements vont également à Sophie Cliquet, du LUBEM de Quimper, pour son implication dans la réalisation des travaux auxquels se consacre le quatrième chapitre de cet ouvrage.

Un merci particulier à Marie-Hélène pour sa gentillesse à mon égard.

Merci à Emmanuel et Monica pour leurs conseils sur les bactéries lactiques. J'inclue également tous les membres ou ex-membres du LUBEM à mes remerciements : Marielle, Amélie, Olivia, Florian, Valérie, Gaëtan L.F., Karim, Nolwenn, Charlotte, Stéphanie, Patrice Nodet, Pierre Colin, Laurent Esclade, ainsi que les membres de l'ESMISAB.

Merci à ma famille. Si j'en suis là, c'est aussi grâce à vous. Vous m'apportez tous, chacun à votre manière, un petit quelque chose. Des encouragements, du réconfort, du rire... Maman, toi qui m'aides à positiver en toutes circonstances, sache que chaque jour j'essaye de mettre tes conseils à l'œuvre. Papa, imaginer que tu es fier de moi suffit à me mettre du baume au cœur. Et enfin : Antoine, comment te dire à quel point je te suis reconnaissante de tout ce que tu as fait pour moi ? Au-delà de tout ce que tu m'apportes, tu m'as permis de terminer ma thèse dans des conditions sereines. Merci pour ton soutien sans faille qui m'a été d'une aide précieuse et inestimable pendant ces derniers mois.

Pour finir, je dirai simplement que les années passées à Brest ont été enrichissantes, tant d'un point de vue humain que scientifique, et qu'elles resteront gravées dans ma mémoire.

AVANT-PROPOS

Cette thèse fait partie intégrante du projet ANR-09-ALIA-005 « FUNGINIB » dont les objectifs principaux sont de développer des cultures bio-protectrices efficaces pour améliorer la conservation des produits laitiers fermentés et d'étudier les molécules actives antifongiques en ciblant les composés protéiques ainsi que la modulation de leur activité.

Le texte est structuré en quatre parties. La première partie, intitulée « **Introduction générale** », met en exergue la problématique de la recherche et résume les connaissances actuelles sur les produits laitiers fermentés, les bactéries lactiques, leurs activités antifongiques et leur intérêt en bio-conservation. Suite à cette revue bibliographique, des hypothèses sont formulées, l'objectif principal de la recherche et les différentes étapes du travail sont détaillés.

La seconde partie, intitulée « **Résultats** », est divisée en quatre chapitres correspondants aux quatre étapes du projet de recherche. Les trois chapitres ayant fait l'objet d'articles scientifiques sont rédigés en anglais et précédés d'un résumé détaillé en français.

1 – Dans un premier temps, le criblage et l'isolement systématique des colonies bactériennes ayant montré une activité antifongique sur l'un des huit milieux semi-sélectifs utilisés, et contre l'une des quatre cibles fongiques, ont permis d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques présentes dans le lait cru en fonction de l'espèce laitière (vache, chèvre, brebis), de la période d'échantillonnage, du milieu de croissance et de la cible fongique.

Ce premier chapitre, intitulé "Biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans des échantillons de laits crus de vache, de brebis et de chèvre, récoltés sur une période d'une année", a fait l'objet d'une publication dans *The International Journal of Food Microbiology*.

2 – La première étude ayant révélé des dépendances entre taxons bactériens et cibles fongiques, nous avons, dans un second temps, utilisé une technique innovante, la chromatographie liquide à haute-pression en condition dénaturante (D-HPLC), pour évaluer la biodiversité des champignons dans les mêmes échantillons de laits crus. L’objectif secondaire était de mettre en évidence un lien potentiel entre la présence de champignons dans les laits crus et l’expression d’une activité antifongique par les bactéries lactiques dans ce même écosystème.

Ce second chapitre, intitulé “Diversité fongique dans des échantillons de lait de vache, de chèvre et de brebis”, a fait l’objet d’une publication dans *The International Journal of Food Microbiology*.

3 – Parmi plus de 700 isolats ayant été identifiés sur la base du séquençage partiel du gène codant pour l’ARNr 16S, onze lactobacilles ont été sélectionnés pour être caractérisés de façon plus approfondie (taxonomie, caractéristiques technologiques, résistances aux antibiotiques) et évaluer leur potentiel à lutter contre les altérations fongiques dans les produits laitiers fermentés en utilisant le yaourt comme modèle facilement reproductible au laboratoire.

Ce troisième chapitre, intitulé “Caractérisation de lactobacilles antifongiques isolés du lait cru et évaluation de leur potentiel en tant que cultures bio-protectrices du yaourt”, a fait l’objet d’une publication dans *Food Control* (soumis).

4 – Les deux souches les plus actives, potentiellement candidates pour la bio-conservation du yaourt, ont finalement été intégrées dans un plan d’expérience, avec pour objectif de déterminer l’influence de différents facteurs, intervenant dans la production et la contamination des yaourts, sur leur activité inhibitrice contre *Y. lipolytica*. Ce quatrième chapitre est intitulé “Modulation de l’activité antifongique de *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I *in situ*”.

La troisième partie, intitulée « **Discussion générale** », reprend les résultats les plus marquants de cette étude, les discute, évalue leur impact sur la bio-conservation des produits laitiers fermentés et décrit les perspectives pour des travaux futurs.

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	2
ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION GENERALE	
Problématique	4
Revue bibliographique.....	6
I. Les produits laitiers fermentés	8
II. Altération fongique des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais	41
III. Moyens de prévention des contaminations fongiques	46
IV. Recherche de souches lactiques antifongiques.....	73
Objectifs et démarche expérimentale	77
RESULTATS	
Chapitre I	80
Biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans des échantillons de laits crus de vache, de brebis et de chèvre, récoltés sur une période d'une année	
Chapitre II	93
Diversité fongique dans des échantillons de lait de vache, de chèvre et de brebis	
Chapitre III.....	102
Caractérisation de lactobacilles antifongiques isolés du lait cru et évaluation de leur potentiel en tant que cultures bio-protectrices du yaourt	
Chapitre IV	136
Modulation de l'activité antifongique de <i>Latobacillus harbinensis</i> K.V9.3.1Np et <i>Lb. rhamnosus</i> K.C8.3.1I <i>in situ</i>	
DISCUSSION GENERALE.....	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE	191

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Diversité et origine des bactéries retrouvées dans le lait cru de vache	14
Figure 2 : Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques	17
Figure 3 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Listeria</i> , <i>Staphylococcus</i> et <i>Bacillus</i>	19
Figure 4 : Aperçu schématique des différents composés cellulaires et des différentes techniques utilisés pour l'identification des bactéries lactiques	25
Figure 5 : Principales étapes du métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques citrate-positives	28
Figure 6 : Schéma proposé pour l'évaluation de la résistance antimicrobienne d'une souche bactérienne utilisée dans l'alimentation	34
Figure 7 : Représentation de la proto-coopération entre <i>S. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> dans le yaourt	38
Figure 8 : Diagramme général de fabrication du yaourt	40
Figure 9 : Résumé des connaissances actuelles sur les principaux composés antifongiques produits par les bactéries lactiques	68
Figure 10 : Arbre décisionnel pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire	72

Tableaux

Tableau 1 : Classification des bactéries lactiques selon leur métabolisme	16
Tableau 2 : Classement phylogénétique des genres <i>Lactobacillus</i> et <i>Pediococcus</i>	21
Tableau 3 : Bactéries lactiques recommandées pour l'obtention du statut QPS	31
Tableau 4 : Exemples de laits fermentés existant à travers le monde	36

ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
AFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés
AGCL : Acides Gras à Chaîne Longue
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (anciennement AFSSA)
ARDRA : Analyse des fragments de Restriction de l'ADN Ribosomique Amplifié
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adenosine-5'-triphosphate
CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CNIEL : Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière.
DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
D-HPLC : Chromatographie Liquide à Haute-Pression en condition Dénaturante
DLC : Date Limite de Consommation
DO : Densité Optique
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EFFCA : European Food and Feed Cultures Association
EFSA : European Food Safety Authority
EPS : Exopolysaccharides
FEEDAP : The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed
GRAS : Generally Recognized as Safe
G3P : D-glycéraldéhyde-3-phosphate
HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Points
IDF : International Dairy Federation
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
MALDI-TOF : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice - spectromètre de masse à Temps de Vol
MAP : Modified Atmosphere Packaging
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NCFB : National Collection of Food Bacteria
PFGE : Electrophorèse en Champ Pulsé
QPS : Qualified Presumption of Safety
RAPD : Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphe
Rep-PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne Palindromique Extragénique Répétitive
RFLP : Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction
SDS-PAGE : Électrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium
SOD-Mn : superoxyde dismutase à manganèse
UHT : Ultra-Haute Température

INTRODUCTION GENERALE

Problématique

Les enjeux économiques associés aux produits laitiers fermentés (beurre, crème fraîche, fromages, laits fermentés et yaourts) se situent maintenant à l'échelle mondiale. En France, l'industrie laitière représente le deuxième plus gros chiffre d'affaires de l'industrie agroalimentaire. Celui-ci est dû à un marché national important avec une consommation de fromages et de laits fermentés parmi les plus fortes au monde (*ca* 45 kg/habitant/an), mais également à une activité exportatrice en forte expansion (CNIEL, 2011). Les produits laitiers fermentés, qui existent depuis des millénaires, sont de plus en plus consommés à travers le monde, y compris dans des pays comme la Chine où ils n'étaient pas présents traditionnellement, et où ils sont maintenant appréciés tant du point de vue gustatif que pour leurs effets positifs sur la santé.

Cependant, la sensibilité des produits laitiers fermentés aux contaminations fongiques peut limiter leur durée de vie, et par conséquent leur capacité d'exportation. Les altérations fongiques, qui peuvent survenir à toutes les étapes de la fabrication jusqu'à la consommation, sont responsables d'importantes pertes économiques pour les entreprises du secteur laitier (Mayoral *et al.*, 2005). La présence de champignons d'altération entraîne une détérioration importante de la qualité visuelle et des propriétés organoleptiques des produits, ce qui les rend impropres à la consommation.

Certains conservateurs chimiques (sorbate de potassium [E202], natamycine [E235], etc.) sont parfois utilisés afin d'améliorer la stabilité microbiologique et augmenter la date limite de consommation (DLC) des produits laitiers fermentés (Gould, 1996 ; Davidson, 2001 ; Smith and Hong-Shum, 2003). Cependant, de nombreuses cibles fongiques développent des résistances à ces conservateurs (Brul and Coote, 1999 ; Viljoen, 2001). De plus, la législation européenne (Directives 89/107/CEE et 95/2/CE) tend à réduire leur utilisation en raison de la nocivité associée à la consommation de certains additifs chimiques tels que le benzoate de sodium (McCann *et al.*, 2007). Enfin, les additifs alimentaires véhiculent une mauvaise image auprès des consommateurs qui désirent des produits dépourvus de conservateurs chimiques tout en

privilégiant la praticité de produits alimentaires possédant de longues durées de conservation. Ces différents facteurs favorisent la recherche de nouvelles stratégies pour améliorer la stabilité microbiologique de ces aliments.

La bio-conservation apparaît comme une alternative prometteuse susceptible de répondre aux exigences imposées par le marché des produits laitiers fermentés. La bio-conservation consiste à ajouter des microorganismes et/ou leurs métabolites à un produit alimentaire afin d'inhiber la croissance de microorganismes indésirables et de prolonger ainsi sa durée de conservation (Holzapfel et al., 1995 ; Ross et al., 2002 ; Rodgers, 2008 ; Privat and Thonart, 2011).

Dans ce contexte, notre intérêt s'est porté sur la recherche de bactéries lactiques pouvant être utilisées comme cultures protectrices dans des produits laitiers fermentés. Ces produits, connus depuis l'antiquité, sont reconnus pour leurs qualités sanitaire et organoleptique. Ainsi les bactéries lactiques contribuent à la saveur de ces aliments et assurent une certaine stabilité microbiologique par la production d'acide lactique et d'autres antimicrobiens (Stiles, 1996 ; Caplice and Fitzgerald, 1999). Depuis quelques années, le potentiel antifongique de nombreuses souches de bactéries lactiques a été mis en évidence et révèle toute l'étendue de la capacité d'inhibition de ces bactéries (Schnürer and Magnusson, 2005).

Dans ce contexte, l'objectif général du projet était d'obtenir une culture simple ou mixte de bactéries lactiques pouvant être utilisée pour la bio-conservation de produits laitiers fermentés comme les yaourts et les laits fermentés. De façon plus fondamentale, les objectifs étaient (i) d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques et celle des champignons dans des échantillons de lait cru ; (ii) de rechercher l'existence éventuelle d'un lien entre l'expression de l'activité antifongique des bactéries lactiques et la présence de champignons dans un même échantillon puis (iii) d'évaluer l'activité antifongique de souches isolées du lait dans une matrice laitière et de déterminer l'effet modulateur de la variation de paramètres technologiques sur cette activité.

Revue bibliographique

I.	Les produits laitiers fermentés	8
A.	Histoire et évolution des procédés de fermentation lactique	8
B.	Industrie laitière	10
C.	Les bactéries lactiques.....	11
1.	Habitats et exigences nutritionnelles.....	12
2.	Métabolisme	15
3.	Phylogénie et méthodes d'identification	19
D.	Les ferments lactiques.....	25
1.	Propriétés technologiques	25
a)	Production d'acide lactique.....	26
b)	Production de composés aromatiques.....	27
c)	Production d'exopolysaccharides	29
d)	Résistances aux bactériophages.....	29
2.	Innocuité	30
a)	Amines biogènes	32
b)	Acide D-lactique	32
c)	Résistances aux antibiotiques.....	33
E.	Yaourt et laits fermentés	35
II.	Altération fongique des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais.....	41
A.	Microorganismes impliqués	41
B.	Enjeux économiques et sanitaires	44
III.	Moyens de prévention des contaminations fongiques.....	46
A.	Bonnes pratiques d'hygiène.....	46
B.	Traitements physiques	47
C.	Conservateurs chimiques	49
D.	Concept de technologie des barrières	51

E.	Bio-conservation des yaourts et des laits fermentés	51
1.	Antifongiques naturellement présents dans les produits laitiers	53
2.	Cultures protectrices.....	55
a)	Levures.....	56
b)	Bactéries	56
3.	Réglementation concernant l'utilisation de cultures protectrices pour l'alimentation humaine	70
IV.	Recherche de souches lactiques antifongiques	73
A.	Recherche de souches antifongiques / Criblage (<i>in vitro</i>).....	74
B.	Evaluation de l'activité <i>in situ</i>	75

I. Les produits laitiers fermentés

A. Histoire et évolution des procédés de fermentation lactique

La fermentation est une technique très ancienne, qui en plus de permettre la conservation des aliments, améliore leurs propriétés organoleptiques et nutritionnelles. Les bactéries lactiques, mises en jeu lors des fermentations lactiques, acidifient les aliments par la production d'acides organiques. Cette production d'acides, et plus particulièrement d'acide lactique, est accompagnée de la production d'autres composés antimicrobiens (dioxyde de carbone, peroxyde d'hydrogène, bactériocines, etc.) qui, avec l'épuisement des nutriments initialement disponibles, vont limiter le développement des microorganismes pathogènes ou d'altération et améliorer ainsi la qualité sanitaire des aliments fermentés (Stiles, 1996 ; Caplice and Fitzgerald, 1999 ; Drouault and Corthier, 2001). Les bactéries lactiques jouent également un rôle favorable sur la qualité organoleptique des aliments en améliorant leur saveur et leur texture *via*, entre autres, la synthèse de composés aromatiques et de polysaccharides (Drouault and Corthier, 2001 ; Tailliez, 2001). Parallèlement, certaines bactéries lactiques améliorent la qualité nutritionnelle des aliments par la biosynthèse de vitamines (folate et riboflavine par exemple) et l'hydrolyse de divers substrats, ce qui peut améliorer leur digestibilité (protéines, stachyose, raffinose, verbascose, lactose, etc.), ou réduire leur allergénicité (β -lactoglobuline), leur toxicité (glycosides cyanogéniques) ou bien encore leurs propriétés anti-nutritionnelles (polyphénols, acide phytique et tannins) (Holzapfel, 2002 ; Hugenholtz *et al.*, 2002 ; Ross *et al.*, 2002 ; Wouters *et al.*, 2002 ; Leroy and De Vuyst, 2004 ; Heuberger, 2005 ; Pescuma *et al.*, 2009).

Partout dans le monde, il existe une grande diversité d'aliments fermentés dont les processus de fabrication ont évolué au cours du temps. Ils peuvent être d'origine végétale, à base de fruits (olives, vin), de légumes (choucroute) et de céréales (pain, bière) ou d'origine animale comme les salaisons (saucissons) et les produits laitiers.

Les aliments et les boissons lactofermentés peuvent être produits à partir de laits de vaches, de chèvres, de chamelles, de yack, de juments (koumis), de bufflonnes (mozzarella), ou d'autres

mammifères. La très grande diversité d'aspects, de textures et de saveurs de ces aliments est liée d'une part aux microorganismes impliqués, mais aussi aux processus de fabrication utilisés.

Les premières preuves de fermentation du lait, impliquant fort probablement des bactéries lactiques, remontent à 6000 ans avant J.-C. Elles consistent en la découverte, principalement en Egypte, en Mésopotamie et dans le bassin méditerranéen, d'ustensiles et de contenants ayant servi à la fabrication de produits laitiers fermentés. De nombreux documents et monuments historiques font référence à la production de fromage, de yaourt et de beurre. Ces procédés de fabrication seraient apparus avec le début de l'élevage des ruminants (moutons, chèvres et vaches) et de l'agriculture, nés au Moyen-Orient (Chamba, 2009). Des preuves de fabrication de fromages datant de 6000 ans avant J.-C. ont été retrouvées en Egypte (Bernardeau *et al.*, 2006). Des stèles, des hiéroglyphes et des gravures datant de la période ptolémaïque (323-30 av. J.-C.) attestent de la fabrication de produits laitiers fermentés. Les Egyptiens élevaient alors des chèvres et des moutons, et déjà, le lait non destiné à la consommation immédiate, était fermenté en un produit final similaire au fromage blanc. En Mésopotamie, la production de produits laitiers fermentés est également recensée dans des textes archaïques irakiens datés d'environ 3200 ans avant J.-C. (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Bernardeau *et al.*, 2006). Dans des textes sacrés, comme la Bible, et dans la mythologie grecque, on trouve également des références aux laits fermentés (koumis, kéfir) et aux fromages (Chamba, 2009). Entre le huitième siècle avant J.-C. et le cinquième siècle après J.-C., les légions romaines ont joué un rôle important dans la propagation de l'art de la fabrication du fromage dans toute l'Europe (Bernardeau *et al.*, 2006). La fabrication du fromage s'est améliorée au Moyen-âge, dans les monastères notamment. De réputation malsaine à la Renaissance, le fromage redevient populaire à la fin du 19^{ème} siècle, date à laquelle l'emploi de ferments lactiques se développe. Louis Pasteur est le premier, en 1861, à découvrir l'implication d'organismes vivants dans les procédés de fermentations alimentaires. Il est suivi par Vilhelm Storch au Danemark, Hermann Weigmann en Allemagne et H.W. Conn aux Etats-Unis, qui identifèrent à leur tour le rôle des bactéries lactiques dans l'acidification du lait. En 1896, Vilhelm Storch breveta des ferments lactiques pour la production de fromage et de lait fermenté

(Holzapfel, 1997 ; Stiles and Holzapfel, 1997 ; Jespersen and Josephsen, 2004 ; Bernardeau *et al.*, 2006 ; Chamba, 2009).

Parallèlement à l'urbanisation, la fabrication des produits laitiers s'est industrialisée grâce à la maîtrise des procédés de fabrication (type de ferments, opérations unitaires, etc.) et à une meilleure connaissance de leurs impacts sur les caractéristiques organoleptiques des produits laitiers, ainsi qu'au développement de la mécanisation et du froid artificiel (Caplice and Fitzgerald, 1999). Ainsi, les fermentations, restées longtemps spontanées, ont pu être réalisées à plus grande échelle et de manière mieux contrôlée (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Bernardeau *et al.*, 2006). Cette industrialisation a notamment été favorisée par l'amélioration de la sécurité sanitaire des produits laitiers fermentés grâce au traitement thermique du lait et à la sélection de ferments stables (Chamba, 2009). L'apparition de nouvelles technologies telles que la machine à traire fabriquée par Colvin en 1862 (Deblanc *et al.*, 2010) ou le séparateur centrifuge à crème mis au point par Gustaf de Laval en 1878 (Sutherland , 2009) ont également participé au développement de l'industrie laitière.

Aujourd'hui, on trouve à travers le monde une large gamme de produits laitiers fermentés, issus de fabrications artisanales et industrielles avec ou sans ajout de ferments lactiques. De nos jours, la majorité des produits laitiers fermentés sont produits à base de lait pasteurisé. Le lait cru est cependant toujours utilisé et est souvent associé à des produits présentant une plus grande diversité sensorielle (Montel *et al.*, 2003). Ainsi, en Europe, dans les filières fromagères artisanales et industrielles, de nombreux fromages, tels que le Camembert, le Beaufort ou le Roquefort, sont toujours fabriqués à partir de laits crus. Il existe également des fromages tels que le Ragusano (Licitra *et al.*, 2007) ou l'Alberquilla (Abriouel *et al.*, 2008) obtenus sans ajout délibéré de ferments.

B. Industrie laitière

Les produits laitiers sont d'une importance économique considérable en France. En 2010, l'industrie laitière était la deuxième industrie agroalimentaire en France en terme de chiffre

d'affaire, et en 2009, les ventes de l'industrie laitière française ont représenté 22,2 milliards d'euros. Avec une production annuelle de 1,6 millions de tonnes de yaourts et de laits fermentés, et 1,8 millions de tonnes de fromages, la France est le second producteur européen de laits fermentés et de fromages. Les français se classent parmi les plus gros consommateurs dans le monde des produits laitiers fermentés frais que sont les yaourts, les laits fermentés, les laits emprésurés et les fromages frais. La consommation annuelle par habitant atteint 23,9 kg pour le fromage et plus de 20 kg pour les laits fermentés (CNIEL, 2011).

L'économie de ce secteur peut également fructifier grâce à son essor international. Trois grands groupes laitiers français (Danone, Lactalis et Bongrain) se classent parmi les 15 groupes leaders mondiaux (Calvez, 2006). L'exportation de nombreux produits laitiers représente un apport économique important, avec, en 2010, un solde du commerce extérieur de laits et produits laitiers de 3,4 milliards d'euros (CNIEL, 2011), et une exportation de 235 673 tonnes de yaourts et 639 500 tonnes de fromages (CNIEL, 2011). Et les ventes tendent encore à augmenter avec la forte augmentation de la demande asiatique pour le lait et les produits laitiers. Parmi les divers produits laitiers fermentés, les yaourts à boire sont les leaders dans la croissance du marché alimentaire (Douaud, 2007).

Afin de préserver sa place économique, et favoriser son développement à l'international, le secteur laitier français doit toujours innover en proposant notamment des produits qui répondent aux attentes des consommateurs et dont la stabilité microbiologique améliore leur capacité d'exportation.

C. Les bactéries lactiques

Le terme bactéries lactiques a été défini pour la première fois en 1919 par Orla-Jensen (Orla-Jensen, 1919). Il ne désigne pas une classe phylétique mais un ensemble de bactéries à Gram positif, catalase négative, non sporulantes, immobiles et qui produisent majoritairement de l'acide lactique par la fermentation de composés glucidiques (Desmazeaud, 1983 ; Pfeiler et Klaenhammer, 2007).

1. Habitats et exigences nutritionnelles

Les bactéries lactiques sont apparues il y a trois milliards d'années, mais leur diversité génétique a connu une rapide expansion 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 (Taillez, 2001). Ainsi, les bactéries lactiques entretiennent une relation étroite avec les humains et les animaux. Elles colonisent non seulement le tractus gastro-intestinal et les muqueuses des mammifères, mais se retrouvent également dans leur environnement. Elles sont notamment retrouvées dans le lait et les produits laitiers fermentés, et dans bien d'autres aliments fermentés tels que les saucissons, la choucroute, les olives et le pain, dans les matières végétales intactes ou avariées et dans les ensilages. Elles sont donc prédominantes au sein du microbiote naturel de nombreux aliments fermentés et y jouent un rôle de conservation ou d'altération (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Bernardeau *et al.*, 2006).

Les bactéries lactiques ont des besoins nutritionnels complexes. Elles sont exigeantes en vitamines, bases azotées, minéraux, glucides ou bien encore en dérivés d'acides nucléiques (Desmazeaud, 1983 ; Taillez, 2001 ; Bernardeau *et al.*, 2006). Elles sont incapables d'effectuer la synthèse d'acides aminés à partir d'une source azotée plus simple et ne peuvent donc se développer que sur des milieux riches en acides aminés. Certaines possèdent des protéinases, des aminopeptidases ou des exopeptidases permettant l'utilisation des acides aminés, peptides ou protéines exogènes. Les bactéries lactiques sont donc retrouvées dans des écosystèmes riches où ces différents éléments sont disponibles. Le lait représente un milieu de croissance favorable à certaines bactéries lactiques qui y trouvent notamment une source importante d'azote, qu'elles puisent dans la fraction azotée non protéique de cet aliment (Desmazeaud, 1983).

A l'origine, le lait est stérile dans la mamelle des animaux sains, il n'est contaminé qu'après sa sortie du trayon. En raison de la très grande variété des sources de contamination et de sa composition, le lait est susceptible d'être contaminé par une large gamme de microorganismes. La diversité microbienne présente dans le lait cru est donc la conséquence des pratiques appliquées en aval, mais également en amont de la traite. Ainsi les méthodes d'élevage (pâtures,

stabulations, alimentation, etc.), de traite (tonte du pis, lavage des trayons, éjection du premier jet, etc.), de nettoyage du matériel en contact avec le lait, et de stockage (durée et température de stockage) vont avoir un impact considérable sur la nature, la diversité et la concentration des différentes populations microbiennes présentes dans le lait (Michel *et al.*, 2001 ; Verdier-Metz *et al.*, 2009). Lorsque ces pratiques sont réalisées dans de bonnes conditions hygiéniques, le lait cru contient une population microbienne totale de l'ordre de 10^3 à 10^5 UFC/ml (Odet, 1999 ; Faye and Loiseau, 2000 ; Beresford and Williams, 2004). Cette population microbienne est très diversifiée et peut contenir une centaine de genres bactériens différents (Raats *et al.*, 2011).

On peut séparer les microorganismes présents en trois groupes fonctionnels selon leur impact en industrie laitière : (i) les microorganismes potentiellement pathogènes tels que les souches d'*Escherichia coli* pathogènes, les espèces du genre *Brucella*, les staphylocoques à coagulase positive, les streptocoques, les salmonelles, les espèces du genre *Yersinia*, les espèces du genre *Campylobacter* et *Listeria monocytogenes* ; (ii) les microorganismes responsables d'altération comme les coliformes, les bactéries sporulées, les *Pseudomonas* spp., les moisissures et les levures ; et (iii) les microorganismes utiles ou technologiques représentés par les bactéries lactiques (lactocoques, lactobacilles, leuconostocs), les bactéries propioniques et les microorganismes de surface (levures, microcoques, bactéries corynéformes, etc.) (Hermier *et al.*, 1992). Les bactéries lactiques représentent généralement de 20 à 30 % des bactéries totales isolées du lait, mais ces chiffres peuvent être soumis à variation en fonction de la saison, de la provenance (chèvre, vache, brebis) ou des conditions de stockage (Michel *et al.*, 2001 ; Wouters *et al.*, 2002 ; Beresford and Williams, 2004 ; Verdier-Metz *et al.*, 2009 ; Raats *et al.*, 2011). La majorité appartient au genre *Enterococcus*, mais on retrouve également de nombreux représentants des bactéries appartenant aux genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (Medina *et al.*, 2001 ; Badis *et al.*, 2004 ; Callon *et al.*, 2007 ; Franciosi *et al.*, 2009). Le lait est la principale source de microorganismes dans le fromage fabriqué à partir de lait cru et dans les produits laitiers fabriqués par fermentation spontanée (Wouters *et al.*, 2002 ; Beresford and Williams, 2004). Ainsi toutes les bactéries lactiques présentes dans le lait cru peuvent être présentes dans les produits laitiers

fermentés obtenus par fermentation spontanée. Ces bactéries lactiques proviennent de l'alimentation (eau, végétaux et leurs produits dérivés comme l'ensilage), des animaux (tractus digestif, épiderme) et des locaux (sol, stabulations, air) (Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004 ; Kagkli *et al.*, 2007 ; Mofredj *et al.*, 2007 ; Vacheyrou *et al.*, 2011) (Figure 1).

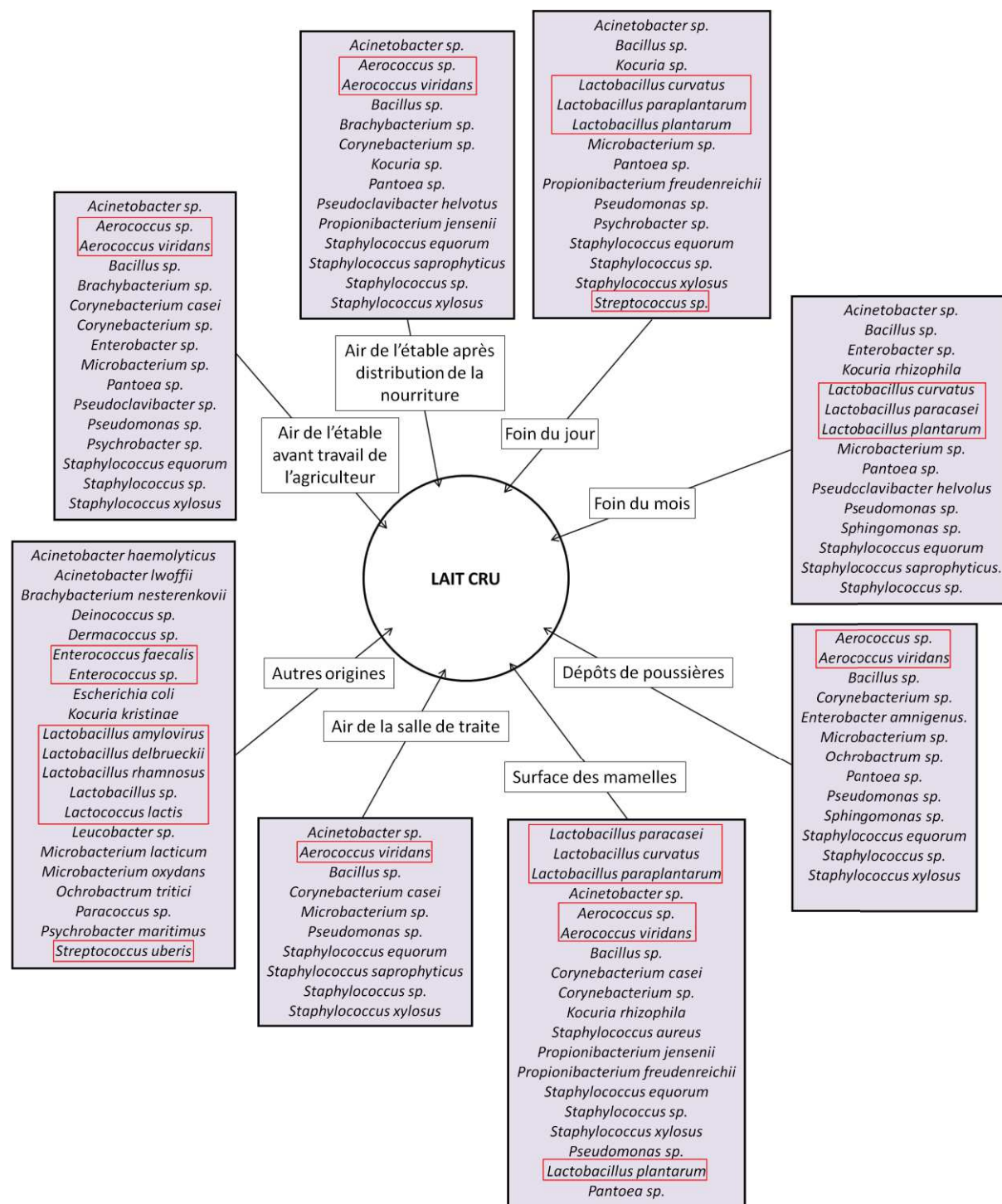


Figure 1. Diversité et origine des bactéries retrouvées dans le lait cru de vache. Les bactéries lactiques sont encadrées en rouge (adaptée d'après Vacheyrou et al. (2011)).

2. Métabolisme

Les bactéries lactiques sont des microorganismes chimio-organohétérotrophes strictement fermentaires qui synthétisent leur ATP par phosphorylation au niveau du substrat. Elles sont classées en trois groupes distincts selon les voies métaboliques utilisées pour fermenter les glucides. On rencontre, d'une part, les bactéries lactiques homofermentaires (majoritairement associées à quelques espèces du genre *Lactobacillus*) dont le produit majeur de la fermentation du glucose est l'acide lactique et d'autre part, les bactéries lactiques hétérofermentaires qui produisent de l'éthanol et/ou de l'acide acétique en plus de l'acide lactique. Celles-ci sont partagées entre les hétérofermentaires facultatives qui ne produisent pas de CO₂ à partir de la fermentation du glucose et les hétérofermentaires strictes qui en produisent. Ces dernières comprennent les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* ainsi que quelques espèces du genre *Lactobacillus* (Tableau 1). Les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives comprennent quelques espèces du genre *Lactobacillus* et la plupart des espèces des genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*. Les bactéries homofermentaires strictes possèdent une fructose-1,6-disphosphate aldolase, enzyme clef de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas) qui catalyse la scission entre le -C3 et le -C4 du β-D-fructose-1,6-diphosphate en D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et dihydroxyacétone phosphate, aboutissant à la production quasi-exclusive d'acide lactique (Figure 2). 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 clive le xylulose-5-phosphate en G3P et en acétyl phosphate, lesquels conduisent respectivement à la synthèse d'acide lactique et d'éthanol ou d'acide acétique. Les bactéries lactiques hétérofermentaires strictes étant dépourvues de fructose-1,6-disphosphate aldolase intervenant dans la glycolyse, métabolisent les hexoses par la voie des pentoses phosphates et produisent donc du CO₂ par la décarboxylation du 6-phosphogluconate (Figure 2).

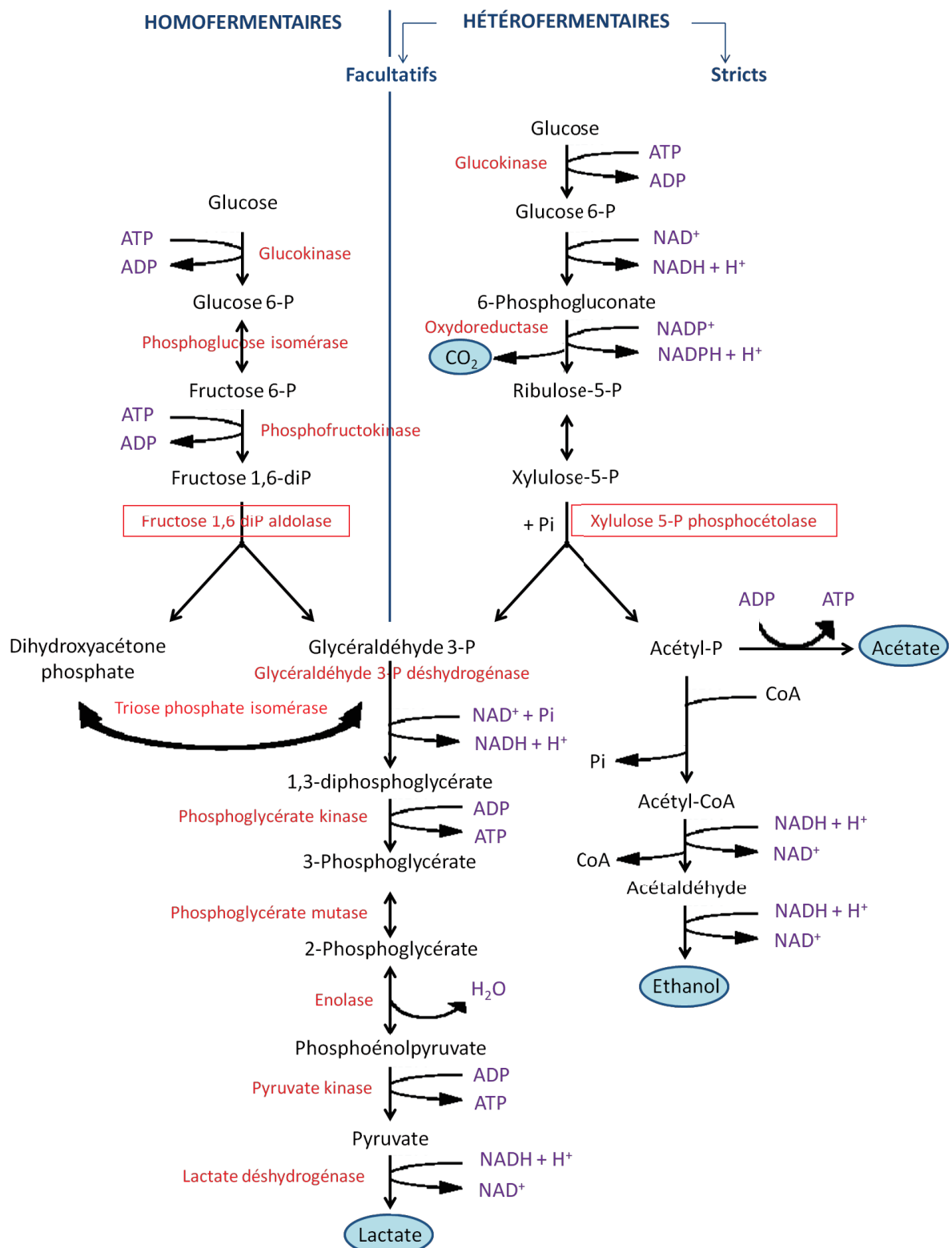


Figure 2. Voies homofermentaire et hétérofermentaire de la dégradation des glucides par les bactéries lactiques. Les enzymes sont indiquées en rouges et les enzymes limitantes sont encadrées. Les produits issus de ces réactions sont entourés en bleu.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives, possédant les enzymes des deux voies métaboliques, métabolisent les hexoses préférentiellement par la glycolyse et les pentoses par la voie des pentoses phosphates (Tailliez, 2004 ; Loubière and Cocaign-Bousquet, 2009). Les bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives, contrairement aux bactéries homofermentaires, sont capables de métaboliser à la fois les hexoses et les pentoses, et ne produisent pas de CO₂ à partir de la fermentation du glucose, contrairement aux bactéries hétérofermentaires strictes.

Dans le lait, les bactéries lactiques métabolisent principalement le lactose (clivé en glucose et galactose) et le citrate (McSweeney and Fox, 2004). D'autres éléments tels que la caséine et les acides aminés dérivés de la caséine ainsi que la fraction azotée non protéique sont cependant utiles à leur croissance.

Les bactéries lactiques sont des microorganismes aérotolérants. Elles possèdent une chaîne respiratoire incomplète, avec une cytochrome oxydase dépourvue d'hème, et pour certaines, une absence de quinones. L'oxygène, qui n'est pas éliminé par la respiration, se combine avec les radicaux libres et entraîne la formation de molécules extrêmement toxiques (superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyles) qui oxydent les lipides, les protéines et les acides nucléiques, affectant ainsi le métabolisme et la croissance des bactéries lactiques (Duwat *et al.*, 2001). Le peroxyde d'hydrogène formé ne peut pas être totalement éliminé par les bactéries lactiques qui ne possèdent pas de catalase mais une pseudo-catalase dépourvue de noyau hème (Stiles and Holzapfel, 1997). Certaines sont cependant tolérantes à l'oxygène car elles possèdent des peroxydases permettant d'éliminer le peroxyde d'hydrogène formé et une superoxyde dismutase à manganèse (SOD-Mn) assurant l'élimination des radicaux libres oxygénés (superoxyde) (Desmazeaud, 1983 ; Tailliez 2001). Pour d'autres espèces, la présence d'hème (*Lactococcus lactis*) et parfois de quinones (*Streptococcus agalactiae*) suffit à rétablir une chaîne respiratoire ainsi qu'une activité catalase fonctionnelle en présence d'oxygène. Dans ces conditions, leur métabolisme respiratoire leur permet de survivre et de produire de la biomasse en présence d'oxygène (Duwat *et al.*, 2001).

3. Phylogénie et méthodes d'identification

Les bactéries lactiques sont des microorganismes qui présentent un faible pourcentage en guanine et en cytosine (33-55 %), elles font partie des *Firmicutes*. Ces bactéries englobent plusieurs genres, dont les représentants sont en forme de coque à l'exception de *Lactobacillus*, de *Carnobacterium* et de certaines espèces de *Weissella*, qui sont en forme de bâtonnet. On y rencontre notamment les genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weissella* (Figure 3) parmi lesquels huit sont utilisés en agroalimentaires (Stiles and Holzapfel, 1997 ; Pot, 2008).

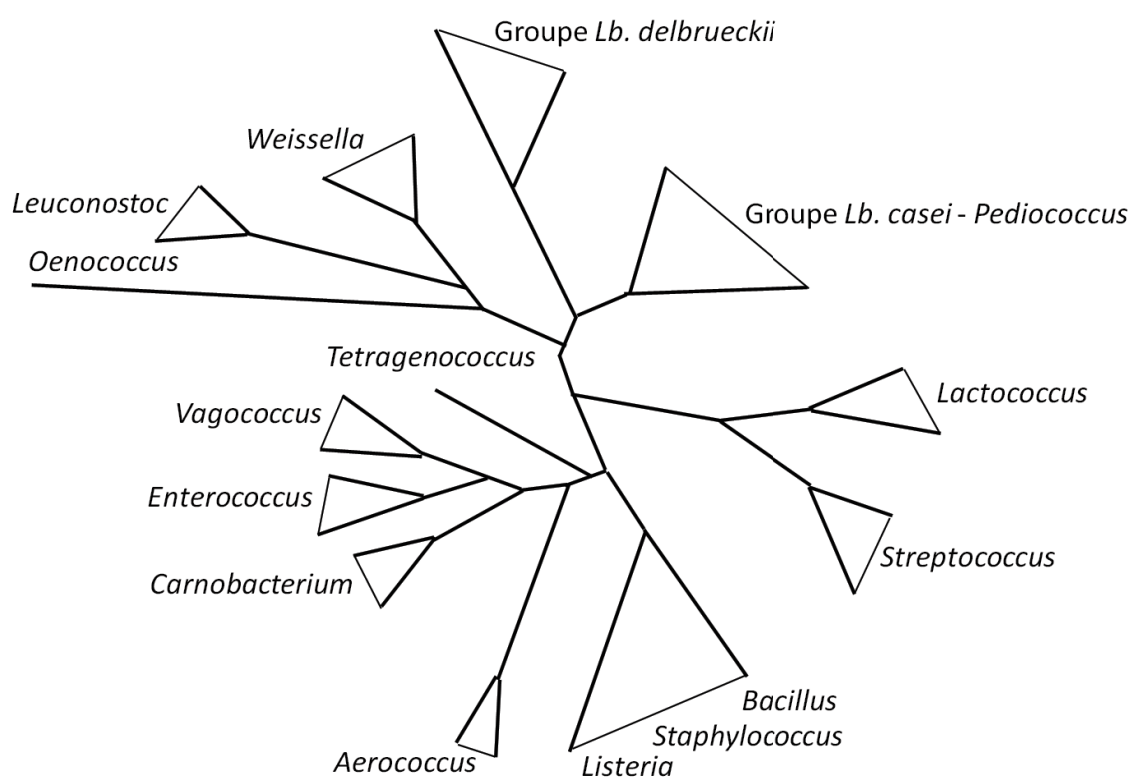


Figure 3. Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Listeria*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (d'après Axelsson (2004)). Les distances évolutives sont calculées par comparaison des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S.

L'identification et la classification des bactéries lactiques sont complexes et ceci est d'autant plus vrai pour les lactobacilles car les espèces au sein d'un groupe sont souvent étroitement proches.

Autrefois, les espèces du genre *Lactobacillus* étaient classées en trois grands groupes phylogénétiques (*Lb. delbrueckii*, *Lb. casei*-*Pediococcus* et le groupe des *Leuconostoc* qui contenait aussi quelques lactobacilles) (Collins *et al.*, 1991) (Figure 3). Les nouvelles méthodes de classification ont permis de réévaluer ces groupes et les espèces qu'ils comprennent pour finalement aboutir aujourd'hui à une nouvelle classification comportant plus d'une dizaine de groupes (Felis and Dellaglio, 2007 ; Pot, 2008) (Tableau 2).

L'identification et la différenciation des espèces appartenant au groupe *Lb. casei* s'avèrent souvent délicates. Ce groupe contient des espèces très controversées. Les différentes souches du groupe *Lb. casei* sont phylogénétiquement étroitement reliées et il y a eu beaucoup d'erreur d'identification de souches commerciales (Holzapfel *et al.*, 2001 ; Desai *et al.*, 2006). *Lb. paracasei* reste à ce jour l'objet de polémiques, certains considérant qu'il s'agit d'un synonyme hétérotypique de *Lb. casei* (Dellaglio *et al.*, 1991 ; Dicks *et al.*, 1996 ; Dellaglio *et al.*, 2002). L'espèce *Lb. paracasei* regroupe aujourd'hui plusieurs anciennes sous-espèces de *Lb. casei* : *Lb. casei* subsp. *alactosus* et *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* (aujourd'hui *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*) ainsi que *Lb. casei* subsp. *tolerans* (aujourd'hui *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*), qui présentent entre elles des similarités d'ADN élevées, et une similarité d'ADN de seulement 10 à 20 % avec la souche type *Lb. casei* subsp. *casei* ATCC 393 (Pot, 2008). Bien que ces propositions aient été rejetées par la Commission judiciaire du Comité International pour la Systématique des Procaryotes en 2005, certains considèrent que la souche type de *Lb. casei* devrait être la souche ATCC 334 au lieu de la souche ATCC 393, qui semble plus proche de l'espèce *Lb. zeae* (Dellaglio *et al.*, 1991 ; Dicks *et al.*, 1996 ; Dellaglio *et al.*, 2002 ; Acedo-Félix and Pérez-Martinez, 2003). Malgré tout, le nom d'espèce *Lb. casei* reste aujourd'hui réservé aux deux souches types NCFB 161 (= ATCC393) et NCFB 173, et le nom d'espèce *Lb. paracasei* existe toujours. Par contre, la souche *Lb. rhamnosus* ATCC 15820 est aujourd'hui la souche type de l'espèce *Lb. zeae* (Dicks *et al.*, 1996).

Tableau 2. Classement phylogénétique des genres *Lactobacillus* et *Pediococcus* selon Felis and Dellaglio (2007).

Groupe	Espèces
Groupe <i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. acetotolerans</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. amylolyticus</i> , <i>Lb. amylophilus</i> , <i>Lb. amylophobicus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. fornicalis</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. hamsteri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. iners</i> , <i>Lb. intestinalis</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. kalixensis</i> , <i>Lb. kefiranofermentans</i> , <i>Lb. kitasatonis</i> , <i>Lb. psittaci</i> , <i>Lb. sobrius</i> , <i>Lb. ultunensis</i>
Groupe <i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. acidipiscis</i> , <i>Lb. agilis</i> , <i>Lb. algidus*</i> , <i>Lb. animalis</i> , <i>Lb. apodemi</i> , <i>Lb. aviarius</i> , <i>Lb. equi</i> , <i>Lb. mali</i> , <i>Lb. murinus</i> , <i>Lb. nageli</i> , <i>Lb. ruminis</i> , <i>Lb. saerimneri</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. satsumensis</i> , <i>Lb. vini</i>
Groupe <i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. antri</i> , <i>Lb. coleohominis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. frumenti</i> , <i>Lb. gastricus</i> , <i>Lb. ingluviei</i> , <i>Lb. mucosae</i> , <i>Lb. oris</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. secaliphilus</i> , <i>Lb. vaginalis</i>
Groupe <i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. diolivorans</i> , <i>Lb. farraginis</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. parafarraginis</i> , <i>Lb. parakefir</i> associés à <i>Lb. acidifarinae</i> , <i>Lb. namurensis</i> , <i>Lb. spicheri</i> et <i>Lb. zymae</i> (qui forment un groupe robuste)
Groupe <i>Lb. alimentarius</i> / <i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. kimchii</i> , <i>Lb. mindensis</i> , <i>Lb. nantensis</i> , <i>Lb. paralimentarius</i> , <i>Lb. tucseti</i> , <i>Lb. versmoldensis</i>
Groupe <i>Lb. casei</i>	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. zeae</i>
Groupe <i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. fuchuensis</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. sakei</i>
Groupe <i>Lb. fructivorans</i>	<i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. homohiochii</i> , <i>Lb. lindneri</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>
Groupe <i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. bifementans</i> , <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Lb. rennini</i> , peu solidement associés avec <i>Lb. composti</i>
Groupe <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i>
Groupe <i>Lb. perolens</i>	<i>Lb. perolens</i> , <i>Lb. harbinensis</i> , <i>Lb. paracollinoides</i>
Groupe <i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. hammesii</i> , <i>Lb. parabrevis</i>
Groupe <i>Pediococcus dextronicus</i>	<i>Pediococcus dextronicus</i> , <i>Lb. concavus</i> , <i>Lb. oligofermentans</i>
<i>Pediococcus</i> (2 clusters, non associés)	<i>P. cellicola</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. inopinatus</i>
	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. stilesii</i>
Couples	<i>Lb. rossiae</i> – <i>Lb. siliginis</i> , <i>Lb. vaccinofermentans</i> – <i>Lb. suebicus</i> , <i>Lb. manihotivorans</i> – <i>Lb. collinoides</i>
Espèces seules	<i>Lb. kunkeei</i> , <i>Lb. malefermentans</i> , <i>Lb. pantheris</i> , <i>Lb. sharpeae</i> , <i>Paralactobacillus selangorensis</i>

* *Lb. algidus* n'est pas toujours associé à ce groupe.

Avec l'évolution de la biologie moléculaire et la faible discrimination des méthodes d'identification phénotypiques, la taxonomie moderne des bactéries lactiques se base désormais sur une approche polyphasique, qui consiste à compléter les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques par les résultats de techniques moléculaires (Klein *et al.*, 1998).

Plus précisément, une taxonomie précise doit passer par plusieurs méthodes d'identification, avec ou sans mise en culture.

Différentes techniques phénotypiques sont utilisées pour l'identification des lactobacilles. L'observation de la morphologie et l'évaluation des profils de fermentation des glucides font partie des techniques les plus connues (Pot, 2008). Cependant, l'analyse des isomères de l'acide lactique et celle de la composition du peptidoglycane de la paroi cellulaire sont aussi utilisées (Felis and Dellaglio, 2007), tout comme l'évaluation de la mobilité électrophorétique de la lactate déshydrogénase ou l'analyse des protéines cellulaires par SDS-PAGE (Durlu-Özkaya *et al.*, 2001 ; Zamfir *et al.*, 2006 ; Pot, 2008 ; Voulgari *et al.*, 2010) ou par MALDI-TOF (Guillot *et al.*, 2003 ; Van Veen *et al.*, 2010) (Figure 4).

La plupart des identifications bactériennes passent désormais par l'utilisation de techniques génotypiques. L'hybridation ADN-ADN est la méthode qui présente la meilleure résolution dans l'identification et la classification des bactéries lactiques et c'est la seule méthode d'identification valable selon les recommandations du Comité International pour la Systématique des Prokaryotes. Cependant, cette méthode est coûteuse et longue à mettre en place. Aussi on lui préfère couramment d'autres techniques telles que le profilage plasmidique, l'évaluation du contenu en bases guanine et cytosine ou l'analyse comparative des séquences d'ARNr16S/23S. La plupart des méthodes moléculaires ciblent le gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène, d'environ 1540 paires de bases, est composé de séquences conservées, communes à des unités de taxon élevées, et des séquences variables, spécifiques d'espèces. Les séquences conservées sont utiles pour la comparaison de bactéries phylogénétiquement éloignées tandis que les séquences variables permettent l'identification de bactéries au niveau de l'espèce, du genre et de la famille, par comparaison avec des séquences présentes dans des bases de données. Lorsque l'alignement de séquences amplifiées donne un pourcentage d'identité inférieur à 97 %, on considère que les deux bactéries n'appartiennent pas à la même espèce. Il existe des amorces universelles permettant d'amplifier la quasi-totalité de ce gène pour presque toutes les eubactéries.

Certaines méthodes sont basées sur l'amplification d'une partie seulement de ce gène ou de la région intergénique entre ce gène et le gène codant pour l'ARNr 23S. Il existe notamment des

amorces spécifiques permettant l'amplification d'un fragment de l'ADNr16S uniquement pour l'espèce ou le genre ciblé(e). Les espèces *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *lactis* et *bulgaricus*, *Lb. acidophilus* et *Lb. casei* ont pu être différenciées par cette méthode. L'amplification spécifique de la région intergénique a également montré son efficacité dans l'identification de *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. graminis* et *Lb. pentosus* (Pot, 2008 ; Rachman *et al.*, 2009). La région intergénique présente en effet des polymorphismes de longueur et de séquence d'une espèce à l'autre.

L'identification basée uniquement sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S ne semble à ce jour plus suffisamment fiable pour identifier les espèces du genre *Lactobacillus*. Ce gène ne permet pas de fournir une bonne résolution au niveau de l'espèce et de la sous-espèce. Ainsi, différentes espèces de bactéries lactiques, et particulièrement de lactobacilles ont des séquences totalement identiques ou presque. Notamment, il est difficile de noter des différences significatives entre les espèces qui ont divergé récemment, telles que les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* et *Lb. pentosus*, ou *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. zeae* (Felis and Dellaglio, 2007). Aussi, les valeurs de similarité d'ADNr 16S peuvent être utilisées uniquement comme critère d'exclusion ou pour définir une appartenance à un groupe (Felis and Dellaglio, 2007 ; Pot, 2008). L'identification des bactéries lactiques peut alors faire appel au séquençage de gènes de ménage tels que les gènes codant pour la sous-unité de la phénylalanine ARNt synthase (*pheS*) (Berger *et al.*, 2007), pour la sous-unité de l'ARN polymérase (*rpoA*) (Naser *et al.*, 2005 ; Naser *et al.*, 2007), pour la recombinaise A (*recA*) ou encore pour la protéine chaperone GroEL (Bringel *et al.*, 2005). D'autres techniques peuvent être utilisées, telles que la RFLP (ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction, qui consiste à couper l'ADN génomique avec une enzyme de restriction puis à séparer les fragments obtenus par électrophorèse sur gel, à les transférer sur une membrane et à les hybrider avec une sonde marquée ciblant par exemple les régions conservées des gènes codant pour les ARNr 16S et 23S) (Gatti *et al.*, 2004 ; Pot, 2008), la Rep-PCR (amplification de séquences répétitives palindromiques et comparaison de profils de bandes après séparation par électrophorèse) (Gevers *et al.*, 2001 ; Kostinek *et al.*, 2007 ; Tamang *et al.*, 2008), ou

l'ARDRA (amplification du gène codant pour l'ARNr 16S, restriction de l'amplicon, comparaison de profils de restriction avec des souches de référence) (Aquilanti *et al.*, 2007) (Figure 4).

D'autres techniques ont pour but de différencier les souches entre elles. La RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe avec plusieurs amorces courtes de séquence de plus de 10 nucléotides définie arbitrairement, séparation des fragments amplifiés par électrophorèse puis comparaison de profils spécifiques d'espèces) (Klein *et al.*, 1998 ; Aquilanti *et al.*, 2007 ; Kostinek *et al.*, 2007 ; Tamang *et al.*, 2008) et l'AFLP (polymorphisme de longueur des fragments amplifiés, qui consiste à couper l'ADN génomique avec une endonucléase de restriction puis à amplifier sélectivement des fragments, permettant d'obtenir un profil de bandes complexe) font partie des méthodes couramment utilisées pour le typage (Foxman *et al.*, 2005 ; Pot, 2008). Cependant, la PFGE (électrophorèse en champs pulsés) reste la méthode la plus utilisée dans le typage bactérien. L'ADN est digéré par une enzyme de restriction qui a une faible fréquence de coupure. De larges fragments sont obtenus puis séparés par une technique d'électrophorèse basée sur des impulsions de champs électriques qui permettent la migration de longs fragments dans le gel. Les profils de bandes obtenus, souche-spécifiques, sont ensuite normalisés puis comparés entre eux. Cette technique est longue mais très reproductible (Brennan *et al.*, 2002 ; Rodas *et al.*, 2005 ; Pot, 2008).

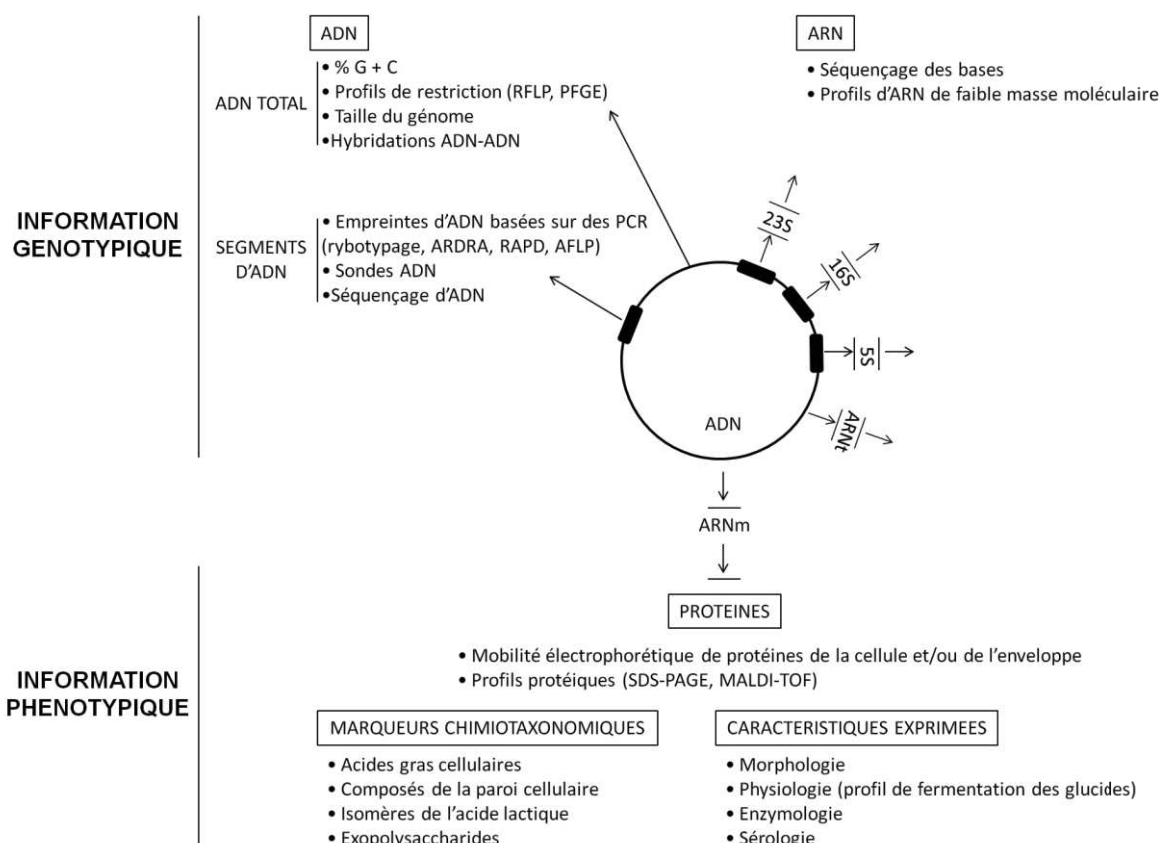


Figure 4. Aperçu schématique des différents composés cellulaires et des différentes techniques utilisés pour l'identification des bactéries lactiques (inspirée de Vandamme *et al.* (1996)).

D. Les ferments lactiques

Les ferments lactiques sont des cultures pures ou des mélanges de bactéries lactiques sélectionnées et utilisées pour la fabrication de produits fermentés. On distingue les ferments naturels, souvent des mélanges de nombreuses souches bactériennes dont la composition exacte est inconnue, des ferments mixtes, composés de cinq ou six souches soigneusement sélectionnées (Doleyres, 2003).

1. Propriétés technologiques

Les bactéries lactiques utilisées comme ferments lactiques commerciaux sont sélectionnées selon des critères technologiques (vitesse d'acidification et production d'acide lactique, résistance aux bactériophages) et organoleptiques (production de composés aromatiques, de dioxyde de carbone

et d'exopolysaccharides) propres à chaque produit fermenté. D'autres critères, relatifs à leur innocuité, sont à prendre en compte dans la sélection des souches. Ainsi, la production d'amines biogènes, d'acide D-lactique ou la présence de résistances aux antibiotiques éventuellement transférables, peuvent rendre une souche potentiellement dangereuse pour la santé humaine et donc inutilisable (Wessels *et al.*, 2004). Plus récemment, la sélection de bactéries lactiques pour leurs effets santé (souches probiotiques) ou leur propriétés antimicrobiennes (cultures bio-protectrices) s'est développée (Knorr, 1998 ; Hansen, 2002 ; Badis *et al.*, 2004 ; Leroy and De Vuyst, 2004 ; Franciosi *et al.*, 2009).

a) Production d'acide lactique

L'efficacité de la fermentation lactique repose en grande partie sur la capacité des souches à rapidement acidifier le lait par la production d'acide lactique. C'est sur ce critère que repose notamment la sélection des ferments d'acidification. Dans le yaourt, la quantité d'acide lactique libre doit être supérieure ou égale à 0,8 % au moment de la vente (Hermier *et al.*, 1992). 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. A partir d'un pH inférieur ou égal à 4,6, lorsque le point isoélectrique de la caséine est atteint, les micelles de caséine précipitent et entraînent les globules lipidiques. Ce phénomène est responsable de la formation du caillé dans les fromages, les laits fermentés et les yaourts (Lucey, 2004). L'acide lactique intervient également sur le goût des produits, de façon directe, ou par l'intermédiaire de réactions enzymatiques (Swindell *et al.*, 1996 ; Collins *et al.*, 2003 ; Tungjaroenchai *et al.*, 2004). L'acidité des produits laitiers fermentés permet d'augmenter leur durée de vie, qui passe de quelques jours pour un lait pasteurisé, à 4 semaines pour un yaourt. La diminution du potentiel d'oxydoréduction, liée à l'activité métabolique des bactéries lactiques, est une condition favorable au développement de la flore anaérobie comportant un grand nombre de souches impliquées dans l'affinage des fromages.

b) Production de composés aromatiques

La formation des arômes est un autre critère de choix dans la sélection des souches et notamment des ferments d'affinage des fromages ou des ferments d'acidification des yaourts et des laits fermentés. La glycolyse, le métabolisme du citrate, la protéolyse et la lipolyse sont les principales voies métaboliques impliquées dans la formation des composés aromatiques (Yvon and Rijnen, 2001 ; Smit *et al.*, 2005 ; Ardo, 2006). La glycolyse permet la conversion du lactose en lactate (Figure 2) et le métabolisme du citrate permet la formation de diacétyle, acétoïne et acide acétique par l'intermédiaire du pyruvate (Smit *et al.*, 2005) (Figure 5). Toutes les souches ne sont pas citrate-positives. Cette activité résulte en effet de la présence de gènes de transport du citrate, tel que le gène codant la citrate perméase, et de gènes du métabolisme du citrate, qui sont parfois portés par un plasmide, comme chez *Weissella paramesenteroides*. Chez d'autres espèces, telles que celles appartenant au 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 stable (McSweeney and Fox, 2004 ; Bekal *et al.*, 2009). La protéolyse de la caséine, qui constitue 80 % des protéines dans le lait de vache (Lucey, 2004), puis la métabolisation des peptides et des acides aminés, conduit à la formation d'alcools, d'aldéhydes, d'acides, d'esters et de composés sulfurés. Les bactéries lactiques interviennent peu dans les réactions de lipolyse, plutôt liées à l'activité des levures et des moisissures (Smit *et al.*, 2005). Cependant, l'utilisation de cette voie métabolique par les bactéries lactiques conduit à la formation d'acides gras à chaîne courte, précurseurs de méthyl-cétone, de thio-esters, de lactones et d'alcools secondaires (Collins *et al.*, 2003 ; Tungjaroenchai *et al.*, 2004 ; Smit *et al.*, 2005). Même si d'autres voies peuvent être mises en jeu, la grande partie des composés aromatiques produits par les bactéries lactiques dérive du catabolisme des acides aminés (principalement de la méthionine, de la phénylalanine, de la thréonine et des acides aminés à chaîne ramifiée) obtenus majoritairement par la protéolyse de la caséine.

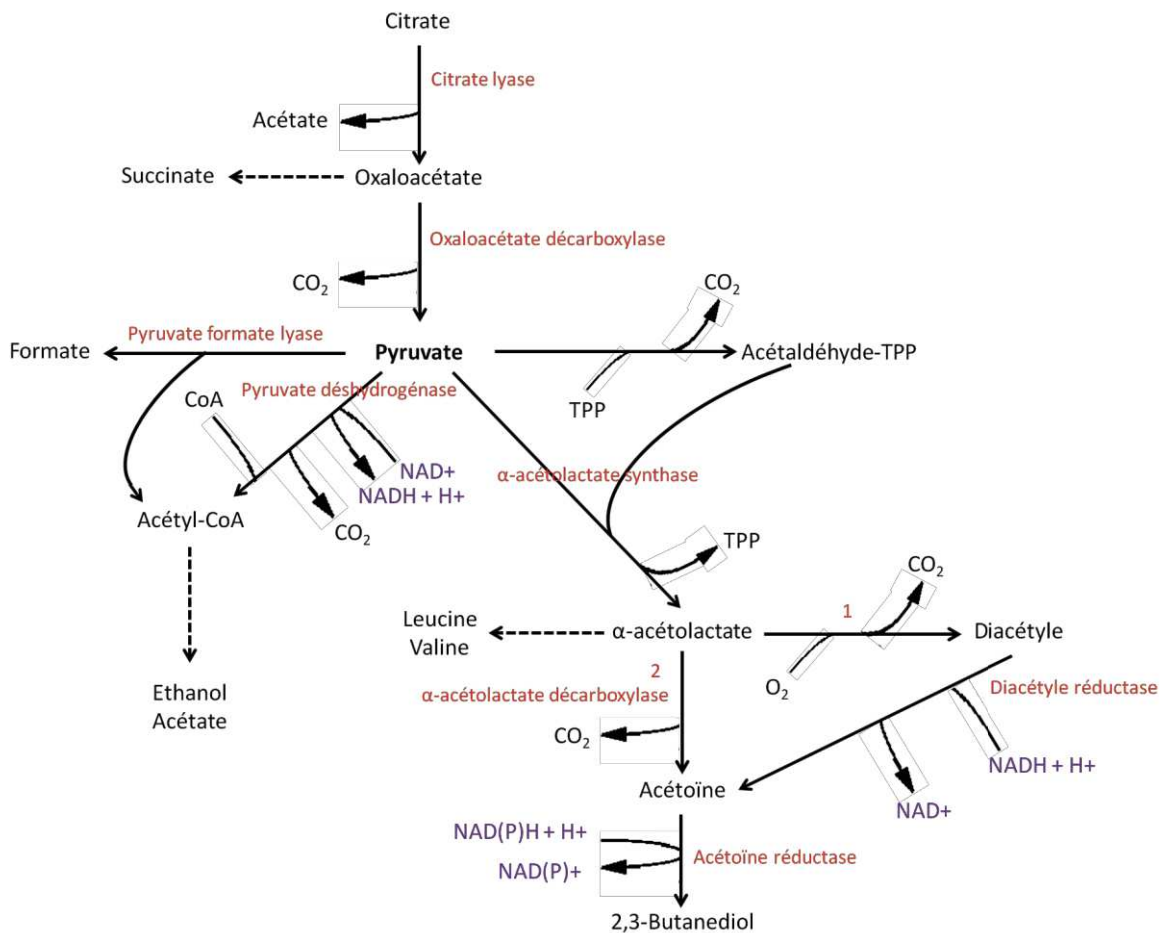


Figure 5. Principales étapes du métabolisme du citrate chez les bactéries lactiques citrate-positives (d'après Monnet *et al.* (2008)). Les enzymes impliquées sont indiquées en rouge. 1, décarboxylation chimique oxydative ; 2, décarboxylation chimique non oxydative.

De nombreuses enzymes sont mises en jeu dans les diverses réactions impliquées dans la formation des arômes (Smit *et al.*, 2005). Or, Le contenu enzymatique varie considérablement d'une souche à l'autre, par conséquent, la production de composés aromatiques est un caractère souche-dépendant (Ampuero and Bosset, 2003). Ainsi, la variation du contenu enzymatique de chaque souche peut avoir de grandes conséquences sur les qualités sensorielles du produit. Les souches ajoutées au produit sont donc choisies de façon pertinente en fonction des composés aromatiques qu'elles sont capables de synthétiser.

c) Production d'exopolysaccharides

La texture des produits laitiers fermentés peut également être modifiée par la production d'exopolysaccharides (EPS). Il s'agit de polysaccharides produits *via* les substrats carbonés et excrétés dans le milieu par la cellule bactérienne. Les EPS présentent de nombreuses fonctions, mais ils sont généralement utilisés en industrie agroalimentaire pour leurs propriétés épaississantes et gélifiantes. Ils augmentent en effet la viscosité du lait, la fermeté des produits fermentés, ils diminuent la synérèse et ils peuvent conduire à une meilleure perception de la flaveur en bouche. Il existe une grande diversité de compositions et de structures parmi les EPS et leur production diffère selon les souches de bactéries lactiques (De Vuyst and Degeest, 1999 ; LaPointe, 2009).

d) Résistances aux bactériophages

Les phages de bactéries lactiques sont naturellement présents dans le lait cru et dans l'environnement laitier. Ils résistent à la pasteurisation et peuvent donc infecter les bactéries lactiques et mener à leur destruction, entraînant un arrêt ou un retard de l'acidification. Leur présence peut donc être responsable de sérieuses pertes économiques en industrie laitière. De nombreuses espèces ciblant notamment les lactocoques et *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) sont connues et ne cessent d'émerger. Il est donc préférable de prévenir les infections plutôt que de les traiter, et cela passe entre autres par l'utilisation de ferments résistants. Ainsi, on sélectionne préférentiellement des souches naturellement résistantes. Chez les lactocoques, la résistance est souvent portée par un plasmide, et plus de 40 sont actuellement connus. Parfois cependant, les résistances peuvent être portées par le chromosome. Lorsqu'une souche d'intérêt est sensible, il y a possibilité de lui conférer la résistance par introduction d'un plasmide. Quatre types de phénotype d'insensibilité sont reportés (inhibition de l'adsorption, blocage de la pénétration de l'ADN, restriction/modification et infection abortive) et parfois un seul plasmide peut porter plusieurs de ces mécanismes. Cependant, l'introduction d'un plasmide est une méthode plutôt contraignante dans la mesure où

elle peut aboutir à la perte d'autres plasmides d'intérêt technologique, et qu'elle est légalement plus difficile à mettre en place (Daly *et al.*, 1996 ; Moineau, 1999 ; Garneau and Moineau, 2011). Il est donc toujours préférable de sélectionner des souches naturellement résistantes.

2. Innocuité

De par leur utilisation millénaire en alimentation humaine, (Voir partie I. Les produits laitiers fermentés, page 12) les bactéries lactiques sont généralement considérées comme non pathogènes. Aux États-Unis, beaucoup possèdent le qualificatif GRAS (Generally Recognized as Safe (Drouault and Corthier, 2001), et le statut QPS (Qualified Presumption of Safety ou présomption de sécurité qualifiée) en Europe (EFSA, 2009 ; Leuschner *et al.*, 2010) (Tableau 3). 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, un état des connaissances, le type d'application envisagé (matrice) et la preuve de l'innocuité/pathogénicité. Ce système utilisé par l'EFSA pour l'alimentation animale (Wessels *et al.*, 2004) reste un point de repère pour l'utilisation des bactéries lactiques en alimentation humaine.

Bien que la très grande majorité des souches ne présente pas de problème de sécurité sanitaire, on trouve cependant quelques pathogènes opportunistes parmi les bactéries lactiques utilisées en agroalimentaire. Il s'agit pour la plupart d'espèces du genre *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*) et *Lactobacillus*. La présence d'entérocoques, principalement associés au tractus digestif des animaux et retrouvés dans les fèces, mais souvent présents dans l'environnement (air, sol, matériel de traite), est un indicateur de mauvaises pratiques d'hygiène. Ce sont des pathogènes opportunistes nosocomiaux humains émergents impliqués entre autres dans des bactériémies, des endocardites et des infections du système urinaire et du système nerveux central (Aguirre and Collins, 1993 ; Franz *et al.*, 1999 ; Beresford and Williams, 2004). Ce genre est également connu pour sa capacité à transférer des gènes de résistance aux antibiotiques à d'autres souches de la même espèce ou d'espèces différentes (Franz *et al.*, 1999). *E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans* sont les espèces les plus couramment isolées dans le fromage, elles peuvent y atteindre 10^5 à 10^7

UFC/g (Aguirre and Collins, 1993 ; Durlu-Özkaya *et al.*, 2001 ; Beresford and Williams, 2004). Certaines souches appartenant à diverses espèces de *Lactobacillus* : *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* et *Lb. acidophilus*, ont été retrouvées dans de rares cas de bactériémies et d'endocardites chez des patients immunodéprimés (Aguirre and Collins, 1993 ; Drouault and Corthier, 2001 ; Bernardeau *et al.*, 2006 ; Bernardeau *et al.*, 2008). Par contre, aucun cas de bactériémie causée par la consommation de ferments laitiers n'a été détecté jusqu'à présent (Wessels *et al.*, 2004). *S. thermophilus* est la seule espèce du genre *Streptococcus* utilisée comme ferment en alimentation humaine et c'est également la seule de ce genre qui figure sur la liste QPS. En effet, ce genre comprend de nombreuses espèces pathogènes (*S. agalactiae*, *S. pyogenes*, etc.). D'autres espèces de *Streptococcus* (*S. bovis*, *S. gordonii*, *S. hansenii*, *S. intermedius*, *S. macedonicus*) sont retrouvées dans des fromages au lait cru (Jamet, 2009), et si la plupart ne semblent pas présenter d'historique de pathogénicité (Maragkoudakis *et al.*, 2009), certaines au contraire, telles que *S. bovis* et *S. intermedius*, ont été impliquées dans des endocardites, des bactériémies et/ou des abcès (Tran *et al.*, 2008 ; Herrera *et al.*, 2009).

Tableau 3. Bactéries lactiques recommandées pour l'obtention du statut QPS (EFSA, 2009).

Espèces ^a
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lb. amylolyticus</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. aviaries</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>Lb. casei</i> ^b , <i>Lb. cellobiosus</i> , <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Lb. crispatus</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. gallinarum</i> , <i>Lb. gasseri</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. kefiranoferiens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. mucosae</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. collinoides</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. sanfranciscensis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus oeni</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>

^a Les souches ne doivent pas présenter de gènes de résistance aux antibiotiques utilisés dans le domaine clinique.

^b L'espèce *Lactobacillus zeae* a été incluse dans l'espèce *Lactobacillus casei*.

a) Amines biogènes

La sélection des souches se fait aussi sur d'autres critères restrictifs, dont leur capacité de production d'amines biogènes (tyramine et histamine en particulier). Elle est reliée à la présence, dans certaines souches, d'acide aminé décarboxylases qui s'expriment surtout lors de longs processus de fermentation, par exemple pendant l'affinage des fromages (Chamba and Irlinger, 2004 ; Bernardeau *et al.*, 2006). Les amines biogènes peuvent être dangereuses pour la santé des consommateurs. Elles peuvent, par exemple, affecter le système nerveux ou le système vasculaire (Shalaby, 1996) ou provoquer des allergies et des réactions inflammatoires (Gardini *et al.*, 2002). Le premier cas d'intoxication due aux amines biogènes dans le fromage a été reporté en 1967 aux Pays-Bas suite à la consommation de Gouda (Santos, 1996). D'autres cas de ce type ont été recensés suite à la consommation de fromage Suisse dans lesquels *Lb. buchneri* était impliqué (Chamba and Irlinger, 2004). Mais ceci reste un cas particulier : *Lb. fermentum* et *Lb. buchneri*, utilisés comme cultures commerciales dans l'Emmental, produisent moins de 10 mg d'histamine/kg et moins de 50 mg de tyramine/kg (Chamba and Irlinger, 2004). De même, diverses amines biogènes telles que la putrescine et la cadavérine ont pu être détectées dans des fromages affinés, mais à des concentrations trop faibles pour présenter un risque sanitaire (Novella-Rodriguez *et al.*, 2000).

b) Acide D-lactique

L'isomère D de l'acide lactique peut provoquer des acidoses car cette forme n'est pas hydrolysée par la lactate déshydrogénase humaine (O'Brien *et al.*, 1999 ; Holzapfel, 2002 ; Leroy *et al.*, 2006). L'organisation mondiale de la santé recommande un apport quotidien maximal de 100 mg/kg de cet isomère (Holzapfel, 2002). La production d'acide D-lactique étant spécifique d'espèces, sa présence peut être limitée par la sélection de souches appartenant à des espèces peu productrices (Holzapfel, 2002).

c) Résistances aux antibiotiques

De nombreuses souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques ont émergé au cours des dernières décennies suite à l'utilisation excessive d'antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire ainsi qu'en agriculture (Threlfall *et al.*, 2000 ; Levy and Marshall , 2004 ; Aarestrup 2005 ; Toomey *et al.*, 2010). Les bactéries lactiques peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques (Ammor *et al.*, 2007). Ceux-ci ne posent pas de problème en soi puisque les bactéries lactiques retrouvées dans l'alimentation ne sont pas pathogènes. Néanmoins, elles peuvent transmettre leurs gènes de résistances à des bactéries intestinales telles que les *Bacteroides* ou à des bactéries pathogènes d'origine alimentaire. En effet, le transfert de gènes de résistance est possible à travers la chaîne alimentaire, et l'intestin humain peut être un excellent réservoir de gènes de résistance (Teuber *et al.*, 1999 ; Salyers *et al.*, 2004 ; Mathur and Singh, 2005 ; Kastner *et al.*, 2006 ; Toomey *et al.*, 2010). Le danger est donc lié aux résistances acquises, portées par des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides ou les transposons, et pouvant être transférées à d'autres souches majoritairement par conjugaison intra ou inter-espèce, mais également par transformation ou par transduction (Van Reenen and Dicks, 2011). Généralement, quand toutes les souches d'un même groupe taxonomique sont résistantes à un antibiotique donné, on considère qu'il s'agit d'une résistance intrinsèque au groupe taxonomique. Au contraire, lorsqu'une souche porte une résistance qui n'est pas retrouvée chez les autres souches d'un même groupe taxonomique, on a tendance à considérer qu'il s'agit d'une résistance acquise (FEEDAP, 2008). Des seuils épidémiologiques de concentration minimale inhibitrice (CMI) permettent *a priori* de distinguer des résistances acquises et potentiellement transférables des résistances intrinsèques (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Si les gènes conférant les résistances ne sont pas associés à des éléments génétiques mobiles, le risque de transfert à d'autres organismes est considéré comme minimal. Ainsi, une résistance acquise par mutation chromosomique est beaucoup moins problématique qu'une résistance portée par un élément mobile et qui peut alors être transférée à un autre microorganisme (FEEDAP, 2008 ; Van Reenen and Dicks, 2011). Il est donc essentiel de vérifier la présence de gènes de résistances potentiellement transférables lors de

la sélection de souches afin d'éviter de propager ces résistances à des souches plus problématiques (Wessels *et al.*, 2004 ; Vankerckhoven *et al.*, 2008) (Figure 6).

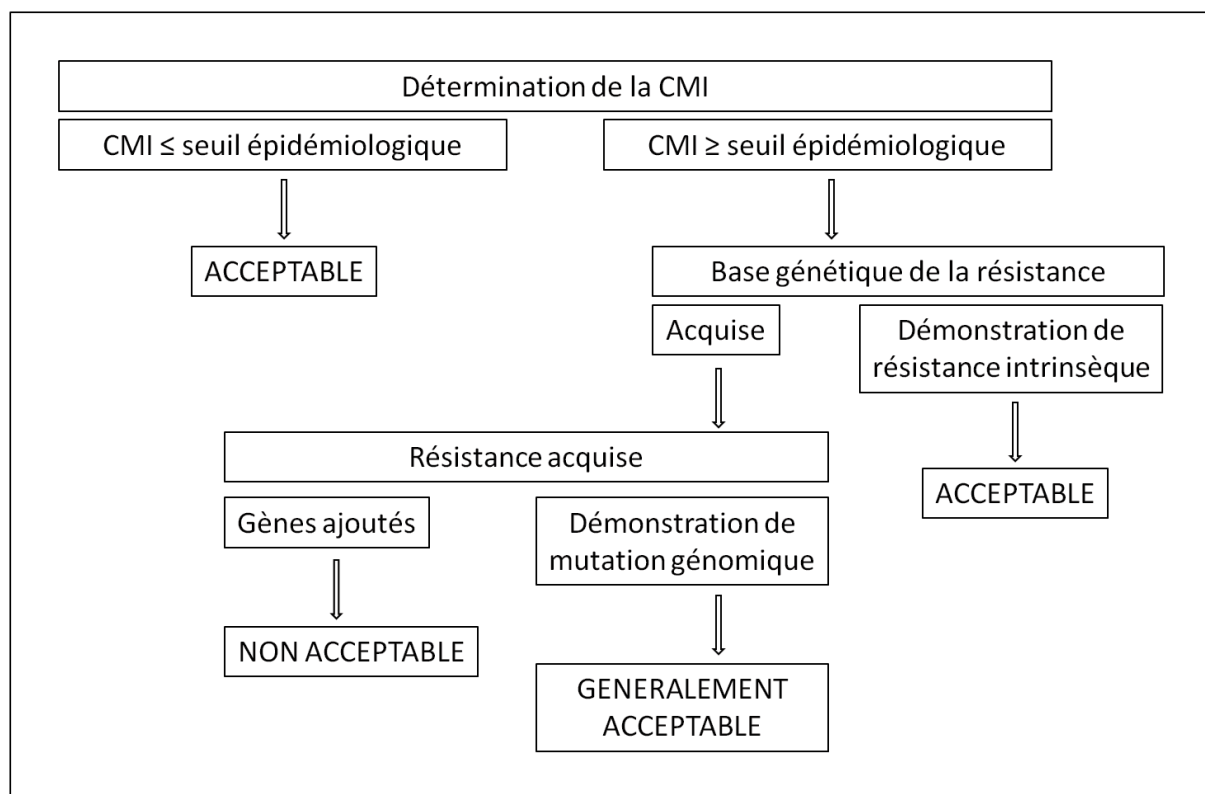


Figure 6. Schéma proposé pour l'évaluation de la résistance antimicrobienne d'une souche bactérienne utilisée dans l'alimentation (d'après FEEDAP (2008)).

Seule une méthode de référence provisoire permet d'évaluer les résistances aux antibiotiques des bactéries lactiques autres que les entérocoques, car il n'existe pas de méthodes standards, ni de seuils épidémiologiques clairement définis (Vankerckhoven *et al.*, 2008). Cependant, certaines données de la littérature semblent indiquer que les genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* sont sensibles à la pénicilline G, à l'ampicilline, à la tétracycline, à l'érythromycine et au chloramphénicol (Danielsen and Wind, 2003 ; Hummel *et al.*, 2007). Mais des transposons conjugatifs ou plasmides portant des gènes de résistance à la tétracycline, à l'érythromycine, au chloramphénicol et à la kanamycine sont très répandus chez les bactéries lactiques (Zarazaga *et al.*, 1999 ; Van Reenen and Dicks, 2011). Au contraire, certaines bactéries lactiques, et

notamment du genre *Lactobacillus*, portent des résistances intrinsèques connues aux aminoglycosides (notamment à la gentamicine, à la kanamycine et à la streptomycine), aux quinolones (ciprofloxacine) et aux glycopeptides (vancomycine) mais également au mélange trimethoprim/sulfamethoxazol (sulfonamide) et à la polymyxine B (polypeptide) (CA-SFM, 2010 ; Toomey *et al.*, 2010 ; Van Reenen and Dicks, 2011). Des taux élevés de mutations spontanées conférant des résistances à la kanamycine et à la streptomycine ont pu être observés chez des lactobacilles (Danielsen and Wind, 2003).

E. Yaourt et laits fermentés

Les procédés de fabrication sont nombreux et conduisent à une grande variété de produits laitiers fermentés. Il existe une grande diversité de laits fermentés à travers le monde, dont des laits fermentés acides (yaourt, laban), concentrés (labneh), acides et alcoolisés (kéfir, koumis), peu acides (lait ribot) ou épaissis (viili) (Béal and Sodini, 2003) (Tableau 4). En France, le beurre, la crème, les fromages, les laits fermentés et les yaourts sont les principaux produits laitiers fermentés consommés.

Les procédés de fabrication des produits laitiers fermentés sont reliés à la physiologie des ferments et des flores d'affinage, notamment à leur température de croissance, à l'utilisation de différents substrats et à leur métabolisme fermentaire. Les microorganismes ont une action déterminante sur la texture et le goût des produits fermentés par la formation ou non de gaz, de composés aromatiques, d'EPS, etc. La température de fermentation doit être adaptée à la température de croissance des ferments utilisés. Ainsi, la température optimale de croissance des bactéries lactiques thermophiles se situe entre 30 et 45°C (*S. thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [*Lb. bulgaricus*] par exemple), et entre 20 et 30°C pour les bactéries mésophiles (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, etc.).

Tableau 4. Exemples de laits fermentés existant à travers le monde. Extrait de http://www.cniel.com/publicat/Questions_sur/pdf/OS_30.pdf

Nom	Région d'origine présumée	Description	Ferments
Yoghourt	Asie, Balkans	Produit ferme ou brassé, acide, arôme caractéristique	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , (+ <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.)*
Lait à l'acidophilus	Etats-Unis	Produit ferme, brassé ou liquide, faible arôme	<i>Lb. acidophilus</i>
Kéfir	Caucase	Boisson brassée, consistance crémeuse, arôme et goût caractéristiques (CO ₂)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., levures
Koumis	Mongolie	Boisson pétillante, acide, goût rafraîchissant et arôme caractéristique	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , levures
Lassi	Inde	Boisson laitière aigre diluée avec de l'eau, consommée salée, épicée ou sucrée	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp., (levures)
Dahi	Inde	Produit ferme ou brassé, ou boisson liquide, flaveur agréable, acide ou faiblement acide	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.
Leben	Moyen-Orient	Produit ferme ou brassé, goût et arôme agréables	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , levures
Filmjöl	Suède	Boisson brassée visqueuse, saveur acidulée	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Viili	Finlande	Produit brassé visqueux, acidulé et goût agréable	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , moisissure

* Selon la réglementation nationale.

Dans les processus de fermentations contrôlées, avec ajout de ferments commerciaux, le lait est pasteurisé, ce qui conduit à l'élimination de 99,9 % des bactéries initialement présentes. Seuls les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus* sont délibérément ajoutés aux

produits en raison de leur innocuité (Voir partie I. Les produits laitiers fermentés, page 30) (Drouault and Corthier, 2001 ; Codex Alimentarius Commission, 2003 ; Bernardeau *et al.*, 2006 ; Teuber and Geis, 2006) (Tableau 3).

Il existe différents types de laits fermentés et de yaourts, classés selon leur saveur (nature, sucré, aromatisé, aux fruits), leur texture (ferme, brassé, liquide, concentré), leur taux de matière grasse (lait entier, standard, maigre) le type de lait (vache, brebis, chèvre, etc.) et les ferments qui y sont ajoutés (Béal and Sodini, 2003). Le yaourt, dont la dénomination repose sur la présence de ferments actifs vivants dans le produit fini tient une place prépondérante dans l'industrie laitière. Selon la définition du *Codex alimentarius* de 2003, les deux souches microbiennes permettant l'appellation « yaourt » sont *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*, le remplacement de l'une ou l'autre de ces souches ou l'ajout de souches supplémentaires ne permettent plus de qualifier le produit de « yaourt » (Codex Alimentarius Commission, 2003). Les normes internationales prévoient une quantité minimale de 10^6 microorganismes par gramme de yaourt, qui doivent rester vivants jusqu'à la DLC du produit (Mission scientifique de Syndifrais, 1997 ; Codex Alimentarius Commission, 2003). Yaourts et laits fermentés sont des produits laitiers frais qui présentent une durée de vie limitée (4 semaines pour le yaourt) et doivent être conservés sous régime de froid positif (Béal and Sodini, 2003). A part quelques exceptions, dont le lait acidophile, fermenté par *Lb. acidophilus* uniquement (Banina *et al.*, 1998), la plupart des ferments de produits laitiers fermentés font intervenir au minimum deux espèces, dont la compatibilité est préalablement vérifiée (croissance associative plutôt qu'antagoniste). Dans le cas du yaourt, il existe une interaction de type mutualiste appelée proto-coopération entre *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* (Sieuwerts *et al.*, 2008 ; Angelov *et al.*, 2009). La plupart des souches appartenant à l'espèce *S. thermophilus* présentent peu d'auxotrophies pour les acides aminés et ont donc moins d'exigences nutritionnelles que l'espèce *Lb. bulgaricus*. Aussi, après inoculation des deux espèces dans le lait, seul *S. thermophilus* entre rapidement dans sa phase exponentielle de croissance (Figure 7). Au cours de sa croissance, cette espèce produit divers composés qui stimulent la croissance de *Lb. bulgaricus*, tels que les acides formique et folique, respectivement précurseur et

cofacteur 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. *Lb. 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 (Siewerts *et al.*, 2008) (Figure 7).

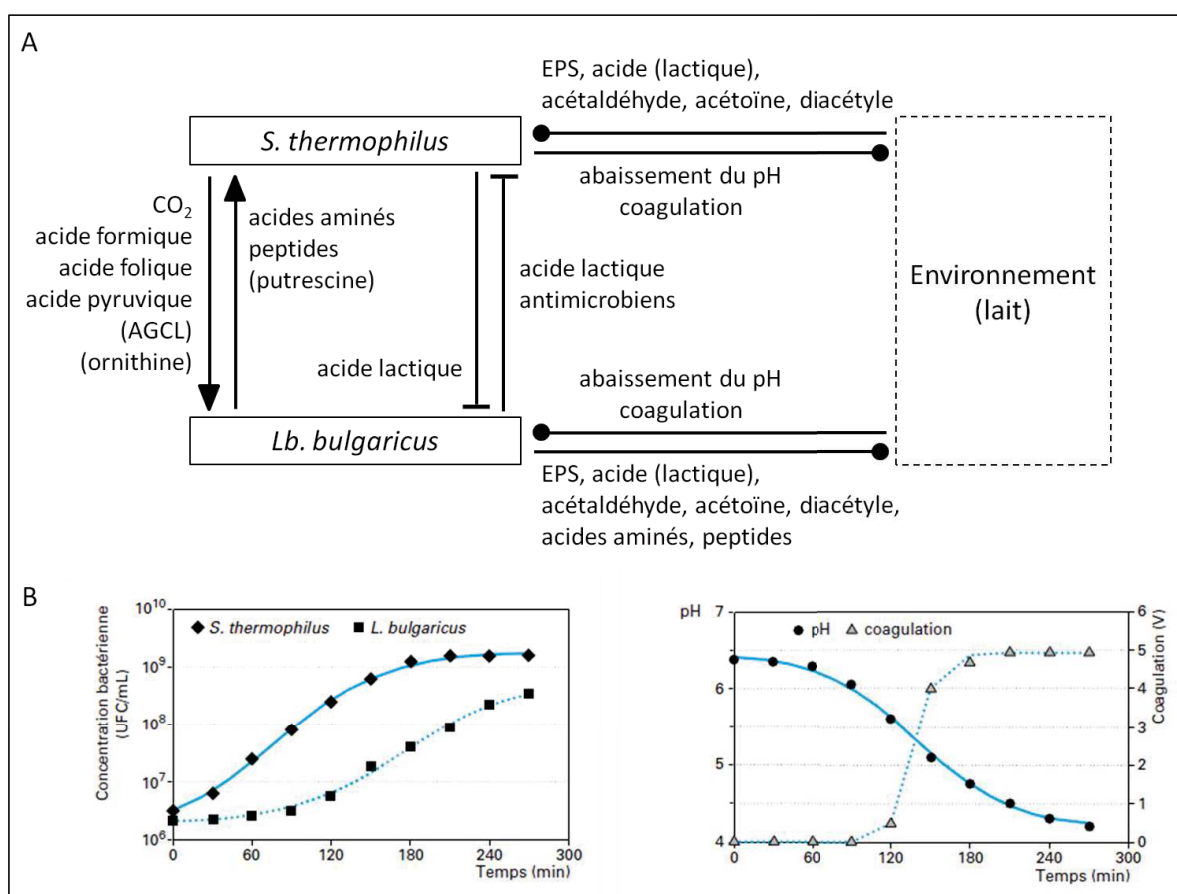


Figure 7. Représentation de la proto-coopération entre *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* dans le yaourt. (A) Représentation schématique des interactions entre *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*, leur environnement et les composés intervenant dans les caractéristiques organoleptiques du yaourt. Les composés entourés de parenthèses sont supposés jouer un rôle dans l'interaction entre ces deux espèces. ▼, interactions positives ; —, interactions négatives ; ●, interactions qui ne favorisent pas et ne réduisent pas la croissance des autres espèces. AGCL, acides gras à chaîne longue (d'après Siewerts *et al.* (2008)). (B) croissance de *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* au cours de la fermentation du yaourt et évolution des paramètres physicochimiques du yaourt (courbes reproduites de Béal and Sodini (2003)).

Le lait utilisé pour la fabrication des laits fermentés et du yaourt doit être standardisé en matière grasse et enrichi plus ou moins fortement en protéines selon la texture recherchée (Figure 8). Les techniques les plus courantes d'enrichissement consistent à ajouter de la poudre de lait écrémé ou du lait concentré. Après homogénéisation, le lait est stérilisé par traitement thermique (Voir partie III. Moyen de prévention des contaminations fongiques, page 47) 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 (Béal 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 autorisés par l'Arrêté du 2 octobre 1997 et le Décret n° 89-674 du 18 septembre 1989. De même, la curcumine (E100), la riboflavine (E101i), la riboflavine 5' phosphate (E101ii), la cochenille (E120), l'indigotine (E132), les chlorophylles (E140), le caramel (E150), les caroténoïdes (E160), les xanthophylles (E161), le rouge de betterave (E162) et les anthocyanes (E163) sont les seuls colorants pouvant être ajoutés aux laits fermentés et aux yaourts. Les ferments, commercialisés sous forme congelée ou lyophilisée, sont ensuite ajoutés au lait traité à raison de 5.10^5 à 5.10^6 UFC/ml (Figure 8). Dans le cas du yaourt, la température de fermentation se situe entre 40 et 45°C. Au cours de cette fermentation, la consommation du lactose et de la caséine conduit à la synthèse de produits intervenant dans la formation du goût, tels que l'acide lactique, obtenu *via* la glycolyse ou encore l'acétaldéhyde, formé à partir de la thréonine, elle-même obtenue par hydrolyse de la caséine, et de la texture (la coagulation est due à la diminution du pH liée à la production d'acide lactique, les polysaccharides intervenant quant à eux dans la viscosité du lait). Parallèlement, l'hydrolyse du lactose conduit à l'accumulation de galactose. Le lactose est en effet formé d'une unité glucose et d'une unité galactose et c'est le glucose qui entre dans la voie de la glycolyse. Le rapport entre *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* est généralement recommandé à 1:1, mais diffère selon les fabricants et les caractéristiques recherchées. Généralement, la concentration finale de *S. thermophilus* est nettement supérieure à celle de *Lb. bulgaricus*. Cette

fermentation peut se faire directement dans le pot si l'on veut produire un yaourt ferme, ou dans des tanks de fermentation dans lesquels le produit est brassé à la fin de la fermentation avant d'être mis en pots. La durée de fermentation, pouvant aller de 3 heures pour le yaourt à 16 heures pour certains types de laits fermentés, doit être bien contrôlée afin de stopper la croissance des cultures au bon moment et ainsi éviter une trop forte acidification du produit. Le pH attendu d'un yaourt se situe généralement aux alentours de 4,2. L'arrêt de la croissance est réalisé par un refroidissement à 20°C dans la cuve après brassage, et à 4°C lorsque la fermentation se fait dans les pots. Cette température est maintenue durant toute la durée du stockage jusqu'à la distribution du produit, pendant laquelle la température doit être inférieure ou égale à 6°C (Béal and Sodini, 2003 ; Soukoulis *et al.*, 2007).

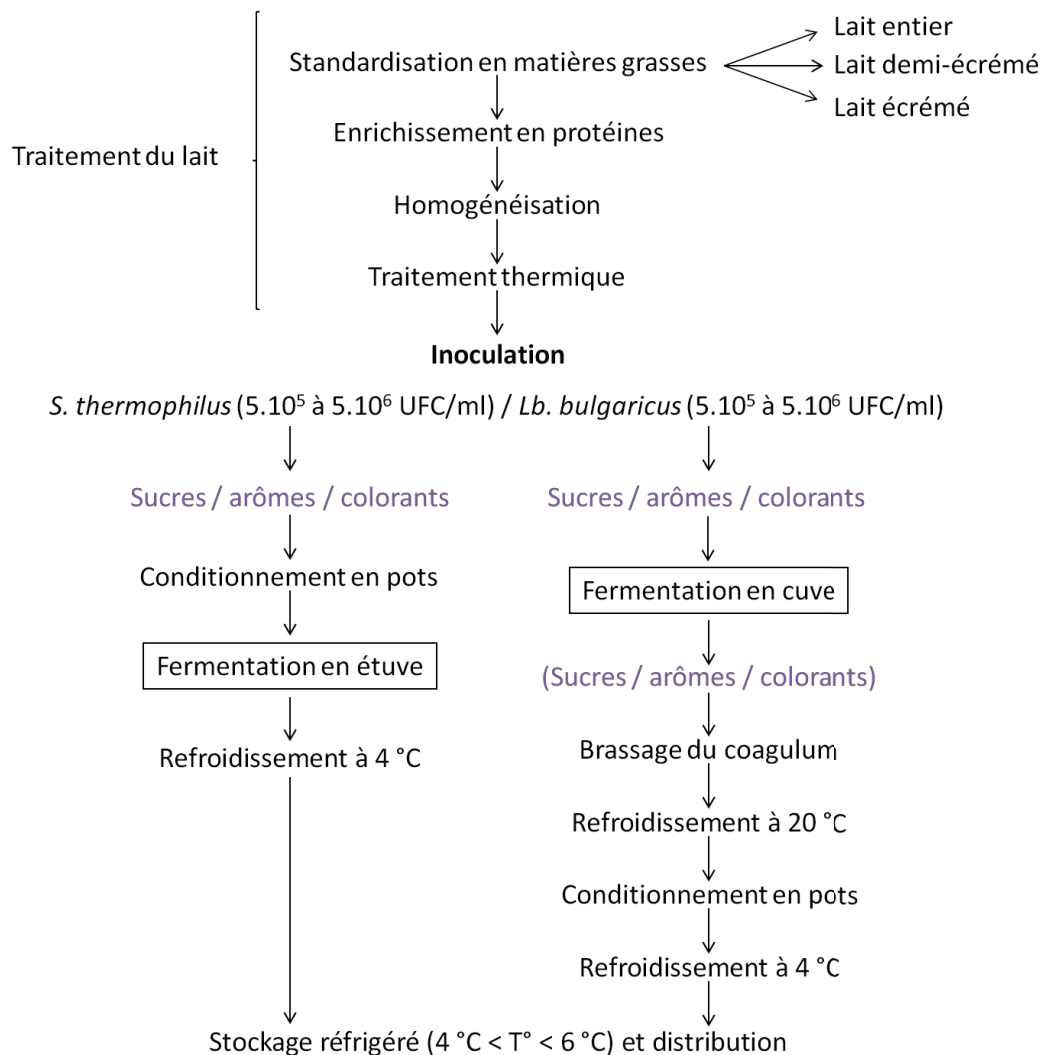


Figure 8. Diagramme général de fabrication du yaourt, d'après Béal and Sodini (2003).

II. Altération fongique des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais

A. Microorganismes impliqués

Les yaourts, les laits fermentés et les fromages frais, riches en eau, en éléments organiques et en minéraux, sont, comme la plupart des aliments, susceptibles d'être contaminés par de nombreux microorganismes. Les principaux paramètres influençant la croissance microbienne sont la température, le pH, le potentiel d'oxydoréduction et l'activité de l'eau (a_w). Chaque microorganisme possède des paramètres de croissance (caractérisés par des points cardinaux) qui déterminent les aliments dans lesquels ils sont susceptibles de croître. Dans le cas des produits laitiers fermentés, les yaourts, les laits fermentés et les fromages à pâtes fraîches se distinguent des autres types de fromages par une activité de l'eau plus élevée et un pH plus bas. La majorité des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais ont des pH inférieurs ou égaux à 4,6 et une activité de l'eau supérieure à 0,98. Les autres fromages ont plutôt des pH supérieurs à 4,6. Ces différences de pH sont pour partie à l'origine des différences observées au niveau des microorganismes contaminants. La présence en quantité importante d'acides organiques dans les yaourts, les laits fermentés et les fromages frais offre une barrière naturelle contre une gamme élargie de bactéries pathogènes ou d'altération puisque peu d'espèces bactériennes associées aux aliments sont capables de croître à des pH inférieurs à 4,5 (Gould, 1995 ; Ross *et al.*, 2002 ; Mufandaedza *et al.*, 2006).

En revanche, les contaminants fongiques (levures et champignons filamenteux) peuvent constituer un problème important pour la qualité organoleptique des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais. Les contaminations par ce type de microorganismes peuvent s'expliquer par leur capacité de croissance à de faibles pH, à une gamme élargie d'activité de l'eau (a_w), à de basses températures et à des concentrations élevées en NaCl (Fleet, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Huis in't Veld, 1996 ; Jakobsen and Narvhus, 1996 ; Cousin, 2002).

De plus, beaucoup de champignons sont bien adaptés au milieu laitier, du fait qu'ils possèdent le matériel enzymatique leur permettant l'assimilation des constituants du lait tels que le lactose, les protéines et les lipides (Fleet, 1990 ; Roostita and Fleet, 1996 ; Viljoen, 2001). *Debaryomyces hansenii*, qui a une bonne tolérance au NaCl et *Kluyveromyces marxianus*, qui possède une β -galactosidase, sont des exemples d'espèces fréquemment retrouvées dans les produits laitiers (Fleet, 1990 ; Roostita and Fleet, 1996). Dans le cas particulier des yaourts, les cellules de levures doivent être en concentration inférieure à 10 cellules par gramme afin d'assurer au produit une durée de vie de 4 semaines (24 jours) à température de réfrigération, qui se situe entre 0 et 6°C (Fleet, 1990). Cependant, les sources de contamination sont nombreuses et rencontrées tout au long du processus de fabrication, et à toutes les étapes précédant la consommation, mais les plus fréquentes sont rencontrées lors du conditionnement (Gould, 1996). Bien que pouvant être présents dans le lait cru ou pasteurisé, ces organismes sont surtout responsables d'altérations après la fabrication des yaourts et des laits fermentés (Jakobsen and Narvhus, 1996). L'air (salle de conditionnement), l'eau, le matériel utilisé, les surfaces, le personnel, et les ingrédients ajoutés aux produits (fruits, miel, sucre, noix) sont sources majeures de contamination (Fleet, 1990 ; Hermier *et al.*, 1992 ; Jakobsen and Narvhus, 1996 ; Küçüköner and Tarakçi, 2004). Le mauvais respect des conditions d'hygiène augmente également le risque de contaminations. Dans le yaourt, la contamination est évidente quand les populations de levures atteignent une concentration seuil de 10^5 à 10^6 cellules par gramme (Fleet, 1990), et dans des conditions normales de stockage, la croissance fongique est seulement ralentie mais pas inhibée (Viljoen *et al.*, 2003).

La contamination des laits pasteurisés ou stérilisés par UHT se fait après traitement thermique (Deák, 2008). *Byssosclamyces nivea*, *Eupenicillium brefeldianum*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum*, *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*, *Talaromyces avellaneus*, sont des espèces retrouvées dans le lait UHT (Pitt and Hocking, 2009) et *Candida diffluens*, *Candida famata* et *Cryptococcus* spp. ont été retrouvés dans des laits pasteurisés (Jakobsen and Narvhus, 1996).

Les espèces contaminantes les plus fréquemment retrouvées dans les altérations des fromages appartiennent aux genres *Penicillium* (*P. commune* et *P. nalgiovense*), *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum* (notamment *G. candidum*), *Phoma*, *Cephalosporium*, *Scopulariopsis* et *Rhizopus* (Tsai and Cousin, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Filtenborg *et al.*, 1996 ; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999 ; Cousin, 2002). Les espèces *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Issatchenkia orientalis* sont également très fréquentes (Fleet, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Jakobsen and Narvhus, 1996).

Les contaminants des fromages au lait cru peuvent provenir de la flore naturellement présente dans le lait. En effet, les espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Penicillium*, et *Saccharomyces* sont fréquemment identifiées dans des laits crus (Corbo *et al.*, 2001 ; Cocolin *et al.*, 2002 ; Callon *et al.*, 2006).

Les espèces appartenant au genre *Candida* (notamment *C. diffluens*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellata*, *C. tropicalis*, *C. versatilis* et *C. zeylanoides*) font partie des contaminants les plus fréquemment isolés des altérations du yaourt et d'autres produits laitiers fermentés. *D. hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* et *K. lactis* ainsi que *K. bulgaricus* et *K. fragilis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* et *Zygosaccharomyces bailii* peuvent être aussi responsables d'altérations du yaourt et des laits fermentés, ainsi que les champignons des genres *Mucor* (notamment *M. circinelloides*, *M. racemosus*, *M. hiemalis* et *M. reukaufii*), *Penicillium* (*P. aurantiogriseum* et *P. brevicompactum*) et *Pichia* (*Pi. anomala*, *Pi. fermentans* et *Pi. toletana*) (Fleet, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Filtenborg *et al.*, 1996 ; Jakobsen and Narvhus, 1996 ; Viljoen, 2001 ; Deák, 2008 ; Pitt and Hocking, 2009). Certaines espèces telles que *Issatchenkia orientalis*, *Clavispora lusitaniae* (Deák, 2008), *Torulopsis candida*, *T. versatilis*, *Hansenula anomala* (Fleet, 1990) et *Trichosporon monoliforme* (Deák, 2008) sont parfois également retrouvées.

B. Enjeux économiques et sanitaires

Les contaminations fongiques des produits laitiers fermentés peuvent potentiellement avoir des conséquences à deux niveaux : sur la sécurité sanitaire d'une part, concernant la santé publique et le risque d'intoxication suite à la consommation de produits contaminés, et sur les qualités organoleptiques d'autre part, impliquant, en cas d'altérations, des pertes économiques plus ou moins conséquentes.

Certains contaminants fongiques peuvent devenir toxiques *via* la production de mycotoxines, qui sont des métabolites secondaires toxiques pour les animaux et les hommes (Schillinger *et al.*, 1996). Ces molécules ont une incidence sur de nombreux organes (cerveau, rein et foie) et génèrent différents types de pathologies (développement de cancer, d'allergies, malformations de l'embryon) (Filtenborg *et al.*, 1996 ; Hussein and Brasel, 2001 ; Dalié *et al.*, 2010). Le développement de champignons (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, etc.) mycotoxigéniques (les toxines les plus connues étant les aflatoxines, fumonisines, patulines, ochratoxines, zéaralénone et trichothécènes) peut donc être impliqué dans des problèmes de santé publique (Nelson, 1993 ; Hussein and Brasel, 2001). Les mycotoxines peuvent se retrouver dans les produits laitiers soit par une contamination indirecte, qui provient du lait suite à l'ingestion d'aliments contaminés (céréales, tourteaux d'arachide) en mycotoxines par les animaux producteurs de lait, soit d'une contamination directe, issue de la croissance de moisissures dans les produits (Sengun *et al.*, 2008). Cependant, la présence de mycotoxines en quantité significative dans les produits laitiers n'est pour le moment attribuée qu'aux céréales contaminées consommées par les animaux (Tantaoui-Elaraki and Khabbazi, 1984). D'ailleurs, dans l'Union Européenne, la seule mycotoxine dont la teneur est réglementée dans le lait et les produits laitiers est l'aflatoxine M1, retrouvée dans le lait majoritairement par cette voie, et qui résulte de l'hydroxylation de l'aflatoxine B1 lors du passage par l'animal (Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005). Dans les produits laitiers fermentés où des moisissures ne sont normalement pas présentes (yaourt, lait fermenté, fromage blanc, etc.), on peut considérer que le risque lié aux mycotoxines issues de la croissance

de moisissures est limité, car le consommateur aura tendance à rejeter un produit contaminé. Mais dans l'éventualité où le produit contaminé est consommé, les études sur ce sujet semblent montrer que les toxines produites dans les fromages, par exemple la roquefortine, synthétisée par des souches de *P. roqueforti*, sont instables et en quantités trop faibles pour avoir une conséquence sur la santé du consommateur (Erdogan *et al.*, 2003). Même si des études poussées doivent être menées pour clairement démontrer l'innocuité des souches utilisées intentionnellement ou accidentellement dans l'industrie laitière et l'absence de dangerosité à long terme des mycotoxines produites, aux niveaux où elles sont rencontrées dans les produits, la présence éventuelle de mycotoxines dans les produits laitiers fermentés n'est donc actuellement pas considérée comme facteur à risque par rapport aux contaminants fongiques laitiers.

D'un point de vue économique, le développement de contaminants fongiques dans les produits laitiers fermentés peut s'avérer problématique. Ces champignons contaminants sont en effet responsables de la modification et de la perte de stabilité des qualités organoleptiques du produit (goût, odeur, aspect, texture) liées à la production indésirable de composés aromatiques, de gaz ou d'alcool. La production de ces composés est généralement liée à la dégradation des constituants des produits laitiers tels que protéines, lipides et lactose. Ces altérations, lorsque rencontrées pendant le processus de fabrication, conduisent à des retraits de lots et entraînent des procédures de nettoyage coûteuses qui engendrent de sérieuses pertes économiques ainsi qu'une publicité négative pour les producteurs (Fleet, 1990 ; Nelson, 1993 ; Filtenborg *et al.*, 1996). De plus, le risque est accentué lors de l'exportation des produits vers des pays où la chaîne du froid est mal maîtrisée. En conséquence, le risque d'altération fongique est l'un des facteurs limitant la durée de vie, la valeur économique et l'exportation de produits laitiers fermentés.

III. Moyens de prévention des contaminations fongiques

Suite à plusieurs crises sanitaires (encéphalopathie spongiforme bovine, dioxine), la législation alimentaire européenne a profondément été remaniée. Une nouvelle réglementation relative à l'hygiène des aliments est entrée en application le 1er janvier 2006. Le «Paquet hygiène», composé de plusieurs textes législatifs adoptés par l'Union Européenne, repose sur une approche globale intégrée qui s'applique à toute la chaîne alimentaire («de l'étable à la table»), et inclut donc l'industrie laitière. L'objectif est de mettre en place diverses procédures, afin de protéger le consommateur, dont le respect des bonnes pratiques hygiéniques, la démarche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) et des instruments efficaces pour gérer les alertes. Bien que les contaminations fongiques des yaourts et des laits fermentés ne présentent pas de danger majeur pour la santé des consommateurs, ceux-ci doivent être produits dans le respect des bonnes pratiques d'hygiène.

A. Bonnes pratiques d'hygiène

La fabrication et le conditionnement des produits laitiers fermentés doivent être réalisés dans les conditions les plus hygiéniques et aseptiques possibles afin de restreindre au maximum les risques d'altération chimique, physique ou biologique (Règlement 852/2004/CE, 2004 ; Rysstad and Kolstad, 2006). Conformément aux indications du *Codex alimentarius* et au Règlement 852/2004/CE (2004), la méthode HACCP définit, évalue et maîtrise les dangers qui menacent la sécurité des denrées alimentaires en prenant notamment en compte les risques microbiologiques (Odet, 1999 ; Faye and Loiseau, 2000). Ainsi, la qualité microbiologique des yaourts et des laits fermentés est contrôlée sur les matières premières, pendant la fabrication, sur les produits finis et sur les équipements. En ce qui concerne spécifiquement le risque de contamination fongique, les sources potentielles de contamination sont les matières premières contaminées (Voir partie II. Altération fongique des yaourts, des laits fermentés et des fromages frais, page 42) et l'air des salles de conditionnement qui peut véhiculer des spores. Des mesures spécifiques sont prises à chacune des étapes critiques comme le contrôle microbiologique des matières premières ajoutées

aux yaourts et aux laits fermentés (préparations aux fruits) et le contrôle des systèmes de filtration d'air des salles de conditionnement (Béal and Sodini, 2003).

B. Traitements physiques

Il existe différents traitements pour lutter contre le développement de microorganismes indésirables. Leur objectif est d'éviter le développement microbien et d'étendre ainsi la durée de vie du produit en assurant sa salubrité et sa stabilité microbienne, tout en conservant ses propriétés organoleptiques et nutritionnelles (Devlieghere *et al.*, 2004). Ces traitements peuvent détruire partiellement ou totalement les microorganismes, agir sur leur croissance en la ralentissant ou en l'inhibant complètement, menant ainsi à leur inactivation ou à leur mort ou limiter l'accès des microorganismes aux produits (Gould, 1996 ; Leistner, 2000). La plupart des traitements « barrières » jouent sur la température (forte diminution ou forte augmentation), sur la baisse de pH ou de l'activité de l'eau, sur le potentiel redox, ou sur la modification de l'atmosphère (Gould, 1995). Ils altèrent les structures cellulaires et/ou les fonctions physiologiques en ciblant la membrane, l'ADN ou les enzymes importantes des cellules cibles (Lado and Yousef, 2002).

La pasteurisation et la stérilisation à ultra haute température (UHT) ont pour objectif de réduire partiellement ou totalement la charge microbienne du lait, en altérant le moins possible ses propriétés organoleptiques et nutritionnelles (Lado and Yousef, 2002). Elles consistent à soumettre le produit à une haute température pendant une courte durée, par exemple 70 à 75°C pendant 15 à 40 s pour la pasteurisation haute ou 85 à 95°C pendant 1 à 2 s pour la flash pasteurisation (Rysstad and Kolstad, 2006). Cependant le traitement thermique le plus courant pour la préparation des yaourts et laits fermentés est une combinaison temps-température de 5-7 min à 92°C. Mais selon les installations, on peut aussi soumettre le lait à un chauffage de 30 min à 85°C (Béal and Sodini, 2003). La stérilisation par UHT, réalisée pour le lait à boire, est quant à elle obtenue par application d'un flux continu de chaleur pendant une courte période (une

température minimum de 135°C pendant au moins 1s). Des technologies plus douces telles que la microfiltration peuvent remplacer ou être additionnées à la stérilisation thermique afin de prolonger la durée de conservation du lait (Rysstad and Kolstad, 2006).

Des technologies d'inactivation non thermique, telles que la haute pression hydrostatique (quelques centaines de MPa) et les champs électriques pulsés (impulsions de champ électrique de fortes intensités (5 à 55 kV/cm) pendant quelques millisecondes), ont été évaluées sur des laits entiers et écrémés ainsi que sur des yaourts mais ne sont pas utilisées à l'échelle industrielle (Gould, 1996 ; Heinz *et al.*, 2001 ; Lado and Yousef, 2002 ; Trujillo *et al.*, 2002 ; Devlieghere *et al.*, 2004).

La modification de la teneur en oxygène dans un produit permet également de réduire les risques de contaminations microbiennes. Des emballages sous atmosphère modifiée ont ainsi été développés, dans le but d'exclure ou de fortement réduire les niveaux d'oxygène pour empêcher la croissance de microorganismes aérobies. Le conditionnement sous atmosphère modifiée (modified atmosphere packaging ou MAP) va consister à remplacer l'air dans l'emballage par un gaz ou un mélange gazeux (CO₂, N₂) tandis qu'un emballage sous-vide va permettre de retirer tous les gaz présents (Devlieghere *et al.*, 2004). Le dioxyde de carbone présente une activité antimicrobienne de deux types : en remplaçant le dioxygène, d'une part, il va empêcher le développement des microorganismes aérobies stricts et sa dissolution, d'autre part, conduit à la formation d'un anion bicarbonate et d'autres espèces chimiques potentiellement toxiques pour les cellules microbiennes (Gould, 1996). Les emballages sous-vide et à atmosphère modifiée présentent le double avantage d'empêcher les microorganismes présents dans l'air de se développer sur le produit, et de limiter les échanges gazeux susceptibles de favoriser le développement de la flore pathogène ou d'altération éventuellement déjà présente dans le produit. L'atmosphère peut également être modifiée en jouant sur son taux d'humidité. En effet, plus l'activité de l'eau est élevée, plus une flore indésirable est susceptible de s'y développer.

Certains emballages de fromages peuvent donc absorber l'humidité afin de limiter le développement de microorganismes contaminants (Vermeiren *et al.*, 1999).

Il est important d'assurer la stabilité microbiologique des produits durant leur distribution et leur stockage. Au cours de ces étapes, le maintien de la chaîne du froid est donc indispensable pour les produits frais tels que les yaourts et les laits fermentés. La plupart des microorganismes ont une croissance ralentie, voire inhibée, à basse température, tandis qu'une température trop élevée peut mener à une croissance rapide des éventuels contaminants et détériorer le produit très rapidement (Viljoen *et al.*, 2003). Les yaourts et les laits fermentés doivent donc être conservés à une température inférieure ou égale à 6°C pour avoir une DLC de 24 jours après fabrication (Rysstad and Kolstad, 2006).

Malheureusement, tous ces traitements se révèlent parfois être insuffisants et nécessitent l'addition de ou le remplacement par des conservateurs chimiques.

C. Conservateurs chimiques

Les acides organiques (sorbique [E200], acétique [E260], lactique [E270] et propionique [E280]), les sorbates, les benzoates (benzoate de sodium [E211]), quelques esters d'acides gras tels que la monolaurine ou encore certains composés phénoliques, font partie des conservateurs les plus communément utilisés dans le lait et les produits laitiers fermentés (Gould, 1996 ; Davidson, 2001 ; Smith and Hong-Shum, 2003). Néanmoins, cela est surtout vrai pour les fromages affinés, et quelques fromages non affinés (Directive 95/2/CE, 1995). L'addition de conservateurs dans les yaourts et les laits fermentés n'est quant à elle pas autorisée par la législation. Cependant, ils peuvent être acceptés dans les ingrédients non laitiers qui y sont ajoutés tels que les fruits ou les préparations aux fruits (Codex Alimentarius Commission, 2003). Le sorbate de sodium (E201), le sorbate de potassium (E202) et le sorbate de calcium (E203) par exemple, sont utilisés pour la conservation de fruits incorporés dans des yaourts. Les sorbates sont les antimicrobiens alimentaires les mieux caractérisés. Ils inhibent les levures et les moisissures et sont également

connus pour inhiber, dans certains cas, la production de mycotoxines (Davidson, 2001). L'utilisation du peroxyde d'hydrogène, qui induit entre autres des dommages au niveau de l'ADN, a été proposée comme moyen de pasteurisation puis de conservation du lait (Lück, 1966 ; Brul and Coote, 1999 ; Davidson, 2001) et est effective dans du matériel d'emballage, à une concentration de 35 % et en combinaison avec la chaleur (Rysstad and Kolstad, 2006).

Certains antibiotiques ou bactériocines sont également utilisés, par production *in situ*, sous forme purifiée, semi-purifiée, concentrée ou synthétique, pour la conservation des aliments. La nisine (E234) est la bactériocine la mieux connue. Elle est utilisée dans certains produits laitiers (Cleveland *et al.*, 2001 ; Ross *et al.*, 2002) mais ne sera pas détaillée ici car l'activité antagoniste des bactériocines se limite aux bactéries. Par contre, la natamycine (E235), produite par l'espèce bactérienne *Streptomyces natalensis* est un antibiotique qui possède des propriétés antifongiques. Sa forme purifiée est autorisée pour une utilisation dans les fromages (principalement fromages à pâte dure, mais également semi-dure et semi-molle) contre les moisissures, à une dose de 1mg/dm² de surface (absent à 5 mm de profondeur) (Directive 95/2/CE, 1995 ; Schnürer and Magnusson, 2005 ; Doyle and Busta, 2006).

De plus, il existe des emballages ou revêtements dits bioactifs dans lesquels sont introduits des composés à activité antimicrobienne qui diffusent dans le produit et dont le but est de le protéger des développements d'une flore pathogène ou d'altération (Privat and Thonart, 2011). D'après le Règlement 1831/2003/CE (2003), les emballages actifs sont destinés à prolonger la durée de conservation ou à maintenir ou améliorer l'état de denrées alimentaires emballées. Ils sont conçus de façon à incorporer délibérément des constituants qui libèrent ou absorbent des substances dans les denrées alimentaires emballées.

Ce système a l'avantage de ne pas altérer les propriétés organoleptiques du produit. Duan *et al.* (2007) ont montré l'effet inhibiteur de films et revêtements composites, à base de chitosane, ayant des propriétés antimicrobiennes ciblant bactéries et champignons, et de lysozyme, inhibant notamment *Cladosporium* spp. dans la Mozzarella. L'activité de certaines bactériocines telles que

la nisine, la pédiocine ou la lacticine a également été évaluée après incorporation dans des emballages pour fromages (Vermeiren *et al.*, 1999 ; Devlieghere *et al.*, 2004).

D. Concept de technologie des barrières

Les différentes méthodes de conservation, utilisées seules, même à forte dose, ne sont pas toujours suffisantes pour garantir la sécurité des aliments, elles peuvent même engendrer des détériorations nutritionnelles et/ou organoleptiques. L'application combinée de différents facteurs de conservation est beaucoup plus efficace. Le concept de technologie des barrières a pour principe de multiplier les effets barrières afin d'améliorer la stabilité microbienne et les caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et économiques des aliments en utilisant différentes méthodes douces (Leistner, 2000 ; Privat and Thonart, 2011). Celles-ci peuvent donc agir en synergie et cibler différentes structures ou fonctions cellulaires au sein de la cellule microbienne attaquée (membrane cellulaire, ADN, systèmes enzymatiques, pH, etc.) qui présente alors beaucoup plus de difficulté à réagir et surmonter chaque effet barrière (Leistner, 2000). La technologie des barrières a prouvé son efficacité pour la conservation des aliments et elle présente notamment un fort intérêt pour les aliments peu transformés, peu chauffés ou fermentés (Leistner, 2000). La bio-conservation, qui est une méthode de conservation naturelle, tient tout à fait sa place dans ce concept. Associée à un ou plusieurs traitements préalables du produit au cours de sa fabrication, son efficacité pourrait être optimale.

E. Bio-conservation des yaourts et des laits fermentés

Plusieurs facteurs tendent à limiter l'efficacité et en conséquence l'utilisation des conservateurs chimiques dans les produits laitiers fermentés. Il s'agit, d'une part, de l'augmentation de la résistance des champignons aux agents de conservation, notamment envers les acides organiques et le peroxyde d'hydrogène (Brul and Coote, 1999). La croissance de nombreuses espèces de *Penicillium*, *Saccharomyces* et *Zygosaccharomyces* par exemple n'est pas inhibée par le sorbate de potassium, et de nombreuses moisissures peuvent même dégrader le sorbate (Viljoen, 2001).

Certaines espèces telles que *Z. bailii* sont résistantes à de fortes concentrations en acide benzoïque (Davidson, 2001 ; Pitt and Hocking, 2009). D'autres levures, comme *Debaryomyces hansenii*, peuvent aussi résister aux désinfectants chimiques utilisés dans les environnements laitiers (Viljoen, 2001). Il est également fréquent que de fortes expositions à des pH bas favorisent l'adaptation des microorganismes contaminants aux acides organiques (Davidson, 2001). D'autre part, les législations alimentaires, *via* les Directives 89/107/CEE (1989) et 95/2/CE (1995), au niveau européen, et *via* le Décret n°89-674 du 18 septembre 1989 et l'Arrêté du 2 octobre 1997 à l'échelle de la France, qui réglementent l'utilisation des additifs (dont les conservateurs chimiques) dans les denrées destinées à l'alimentation humaine, limitent l'autorisation de certains conservateurs chimiques. Ceci conduit les industriels à trouver de nouvelles méthodes de conservation. Plusieurs options sont actuellement disponibles, telles que l'utilisation de composés naturels et/ou de cultures protectrices selon le type de produits.

La bio-conservation a pour objectif d'allonger la durée de vie de l'aliment et d'améliorer sa sécurité par l'usage de microorganismes et/ou de leurs métabolites sélectionnés pour leur capacité à inhiber la croissance de microorganismes indésirables (Ross *et al.*, 2002).

La majorité des composés antimicrobiens sont des peptides ribosomiques synthétisés par les mammifères, les oiseaux, les amphibiens, les insectes, les plantes et les microorganismes (Nissen-Meyer and Nes, 1997 ; Schnürer and Magnusson, 2005). Beaucoup d'agents antimicrobiens sont aussi naturellement présents dans les aliments, mais dans de nombreux cas, leur concentration est trop faible pour l'obtention d'une activité inhibitrice suffisante. De plus, il est difficile de les purifier et de les intégrer dans une denrée alimentaire sans en altérer les propriétés organoleptiques et les caractéristiques nutritionnelles (Sofos *et al.*, 1998 ; Davidson, 2001). La vanilline, par exemple, utilisée comme agent aromatisant dans des yaourts, inhibe *D. hansenii*, *S. cerevisiae* et *Z. bailii* (Davidson, 2001). Celle-ci a montré son efficacité à une concentration comprise entre 1000 et 2000 ppm dans des yaourts aux myrtilles qui sont des fruits particulièrement sensibles aux contaminations fongiques et supportant mal les traitements

thermiques (Penney *et al.*, 2004). Néanmoins, une telle concentration de vanilline était préjudiciable au niveau organoleptique.

1. Antifongiques naturellement présents dans les produits laitiers

Le lait (et le colostrum) des mammifères a pour fonction de nourrir le nouveau-né mais également de lui procurer une protection immunitaire contre les agents pathogènes de l'environnement. Il contient donc une large gamme de protéines et peptides aux propriétés antimicrobiennes (Korhonen *et al.*, 2000 ; Kanwar *et al.*, 2009).

Le lysozyme est une muraminidase présente dans les blancs d'œufs, les figes et le lait des mammifères (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Devlieghere *et al.*, 2004). Cette enzyme clive les liaisons β -1-4-glycosidiques entre la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétyl-muramique du peptidoglycane (Kanwar *et al.*, 2009), elle n'est donc active que contre les bactéries et majoritairement les bactéries Gram positif (Kanwar *et al.*, 2009). Cependant, lorsque de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est ajouté au lysozyme, celui-ci peut être actif contre les champignons. Mais, en raison de sa faible activité dans les fromages, le lysozyme est surtout utilisé en tant que composant d'emballages antimicrobiens (Davidson, 2001) (Voir partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 50).

La lactoferrine est une protéine entrant dans la composition du lait et possédant des propriétés antimicrobiennes. Cette molécule capte le fer essentiel à la croissance normale de nombreux microorganismes, et est approuvée pour être utilisée directement dans les aliments (Murdock *et al.*, 2007). Son activité antifongique a été démontrée contre plusieurs espèces du genre *Candida* (Jenssen and Hancock, 2009). Un clivage protéolytique de cette molécule peut aussi donner la lactoferricine B, qui, elle, possède une plus grande activité antagoniste (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Kanwar *et al.*, 2009).

La lactoperoxydase est une protéine à propriétés antimicrobiennes également retrouvée dans le lait (Kanwar *et al.*, 2009) et qui présente une activité optimale en présence de peroxyde d'hydrogène et de thiocyanate. Une fois activée dans le lait, cette enzyme oxyde les groupes sulfhydryles des protéines bactériennes. Cependant, elle peut aussi agir sur les champignons et avoir des effets antagonistes sur leur croissance et sur la production de mycotoxines (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Brul and Coote, 1999 ; Davidson, 2001 ; Seifu *et al.*, 2005). Le système lactoperoxydase entraîne l'inhibition de certaines enzymes, ainsi qu'une perte du potentiel électrochimique et une inhibition du transport des sucres et des acides aminés (Davidson, 2001). Son activité peut être retrouvée dans les produits laitiers fermentés puisque certaines bactéries lactiques produisent suffisamment de peroxyde d'hydrogène pour activer le système lactoperoxydase. Cependant, les ferments lactiques thermophiles y étant sensibles, on l'utilise plutôt pour la préservation des laits crus et pasteurisés, surtout en l'absence de réfrigération pendant le transport et/ou le stockage. Ainsi, la Fédération internationale de laiterie a publié un guide pour l'utilisation du système lactoperoxydase pour la conservation du lait cru en particulier en l'absence de réfrigération (IDF, 1988 ; Seifu *et al.*, 2005).

Les immunoglobulines du lait présentent également des activités antimicrobiennes, dont le mécanisme d'action reste néanmoins mal défini, mais qui semblent agir surtout sur les bactéries (Korhonen *et al.*, 2000 ; Kanwar *et al.*, 2009). De plus, certaines études ont montré qu'elles pouvaient inhiber la croissance de ferments laitiers (Korhonen *et al.*, 2000) et qu'elles sont de toute façon majoritairement présentes dans le colostrum. Chez la vache, les immunoglobulines G1, majoritaires, sont à une concentration de 48 g/l dans le colostrum et à seulement 0,6 g/l dans le lait (Kanwar *et al.*, 2009).

Tous ces composés protéiques peuvent agir de façon synergique et ainsi augmenter l'effet antimicrobien (Korhonen *et al.*, 2000 ; Kanwar *et al.*, 2009).

2. Cultures protectrices

Les microorganismes utilisés comme agents antimicrobiens peuvent être initialement présents dans les aliments (microorganismes d'acidification ou d'affinage) ou y être ajoutés intentionnellement. L'activité antimicrobienne peut être due aux ferments, dont l'activité principale est de fermenter le produit, ou à une culture protectrice, définie comme étant une culture antagoniste ajoutée à un produit alimentaire pour inhiber les microorganismes pathogènes et/ou d'altération et ainsi prolonger sa DLC, tout en modifiant le moins possible ses propriétés organoleptiques (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Privat and Thonart, 2011). C'est souvent l'action combinée de différents facteurs, tels que la compétition pour les nutriments, l'épuisement de l'oxygène et la production de composés inhibiteurs qui empêche la croissance d'autres microorganismes (Millet *et al.*, 2006).

Qu'elle que soit sa catégorie (ingrédient, additif, auxiliaire technologique), une culture protectrice doit également s'adapter au produit (par exemple, ne pas être en compétition avec les organismes autochtones) (Holzapfel *et al.*, 1995). Sa fonction est d'augmenter la DLC de l'aliment dans lequel elle est ajoutée en y réduisant les risques de contamination. Son activité doit être fiable au sein de la matrice alimentaire et dans son contexte environnemental. Enfin, elle ne doit présenter aucun risque pour la santé (Voir partie I. Les produits laitiers fermentés, page 30 et partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 69) et aucun effet négatif sur la qualité sensorielle de l'aliment, telle que la production de composés aromatiques indésirables (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Règlement 178/2002/CE, 2002 ; Wessels *et al.*, 2004).

La recherche de cultures protectrices se limite souvent aux microorganismes alimentaires, et plus particulièrement pour les produits laitiers à certaines levures, aux bactéries propioniques et aux bactéries lactiques. Ces dernières ont statistiquement une plus forte probabilité d'obtenir une autorisation d'utilisation par reconnaissance de leur innocuité. Etant adaptées à l'environnement laitier, elles ont également une plus grande capacité à se développer dans l'aliment, et ainsi, par leur activité fermentaire, à avoir une action inhibitrice de base.

a) Levures

Dans certains produits à base de lait fermenté, comme le koumis, la fermentation résultant d'une association entre bactéries lactiques et levures permet l'inhibition de microorganismes d'altération tels que certains champignons filamenteux (Viljoen, 2001). Certaines levures possèdent donc des activités antifongiques. Ceci a été observé pour quelques souches de *D. hansenii*, capables de réduire ou d'inhiber la croissance de certaines moisissures dans le fromage. Ces souches pourraient, en perspective, être utilisées comme agent de bio-contrôle dans certains fromages (Liu and Tsao, 2009). Certaines espèces, dont *Debaryomyces hansenii*, produisent des mycocines, qui sont des composés protéiques à activité fongicide ou fongistatique (Golubev, 2006). Purifiées, elles pourraient avoir une application de conservateur dans certains produits laitiers. La mycocine, produite par *Williopsis mrakii*, par exemple, a un large spectre d'activité contre des levures contaminantes du yaourt (Lowe *et al.*, 2000). Les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* et *Torulopsis*, parmi d'autres, peuvent également synthétiser ces molécules (Lowe *et al.*, 2000 ; Golubev, 2006).

b) Bactéries

La bio-conservation implique principalement des bactéries naturellement présentes dans les aliments et c'est pourquoi beaucoup d'études se focalisent essentiellement sur les bactéries propioniques et sur les bactéries lactiques. Parfois, ces deux groupes de bactéries sont associés pour agir en synergie. C'est ce qu'on retrouve dans certaines cultures bio-protectrices antifongiques disponibles sur le marché, tels que Bio profit (Danisco Niebüll GmbH, Germany), une co-culture de *Lactobacillus rhamnosus* LC705 (DSM 7061) et de *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS (DSM 7067) (Suomalainen and Mäyrä-Mäkinen, 1999 ; Soomro *et al.*, 2002 ; Schwenninger and Meile, 2004) et les séries HOLDBACTM également produites par DANISCO et faisant intervenir les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, ou *Lb. paracasei* et *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (Rodgers, 2008). Ces deux cultures commerciales ont montré leur efficacité sur le yaourt et à la surface des fromages à pâtes cuites contre des

levures et des moisissures d'altération (Schwenninger and Meile, 2004). Une culture mixte de *P. thoenii* P-127 et *Lb. rhamnosus* B-445 ou *Lb. plantarum* DSA 20174 dans le fromage Kareish empêche le développement de champignons contaminants avec une amélioration de la saveur et de la texture (El-Shafei *et al.*, 2008). Les métabolites de *P. thoenii* ont les mêmes effets sur le fromage à pâte molle Domiati (Tawfik *et al.*, 2004).

(1) *Bactéries propioniques*

L'effet indépendant de ces bactéries peut aussi être étudié. L'activité antifongique des bactéries propioniques, trouvées dans les produits laitiers, l'herbe et le sol, a été révélée par plusieurs études et est due notamment à la production d'acides organiques (acide propionique et acide acétique), d'acide 3-phényllactique, mais également de bactériocines (Suomalainen and Mäyrä-Mäkinen, 1999 ; Lind *et al.*, 2005 ; Gwiazdowska and Trojanowska, 2006 ; Lind *et al.*, 2007 ; Lind, 2010). Dans le fromage suisse, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* produit plus de 1 % d'acide propionique et retarde la croissance des levures *Candida* spp. et *Saccharomyces cerevisiae* (Davidson, 2001). Comme décrit précédemment, l'acide propionique (E280) est très efficace contre les moisissures. Microgard™ (Wesman Foods Inc., OR, USA), un ferment du lait pasteurisé, approuvé par la Food and Drug Administration et faisant intervenir *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, est utilisé dans environ 30 % des fromages blancs consommés aux États-Unis (Salih *et al.*, 1990 ; Al-Zoreky *et al.*, 1991 ; Ross *et al.*, 2002 ; Schwenninger and Meile, 2004).

(2) *Brevibacterium linens*

D'autres bactéries laitières possèdent des activités antifongiques. C'est le cas de *Brevibacterium linens*. Cette bactérie, faisant partie des bactéries corynéformes, est présente sur la surface de certains fromages à croûte lavée et à pâte cuite tels que le Maroilles, le Munster, le Beaufort et le Comté. Cette espèce a montré des capacités d'inhibition de moisissures et de production de mycotoxines, cependant, cette activité n'a pas été testée *in situ* (Osman, 2004).

(3) *Bacillus*

De nombreuses espèces de *Bacillus* sont connues comme étant des productrices de substances antimicrobiennes (Kavitha *et al.*, 2005 ; Joshi *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2010), et notamment des espèces isolées de laits crus et d'autres produits laitiers (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008). Certaines présentent de larges spectres d'inhibition contre des bactéries Gram positif, des bactéries Gram négatif et des moisissures (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008). Cependant, bien que certaines espèces de *Bacillus* soient utilisées comme probiotiques (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) (Sorokulova *et al.*, 2008) et possèdent le statut QPS, ce genre a une connotation négative dans les produits laitiers car les espèces qui y sont généralement retrouvées sont responsables d'altérations (Meer *et al.*, 1991 ; Crielly *et al.*, 1994). Ce genre comprend également de nombreuses espèces pathogènes et associées à des intoxications alimentaires (Wong *et al.*, 1988). Cependant, il reste envisageable de purifier les molécules antifongiques en vue d'améliorer la conservation du lait et des produits laitiers (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008).

Le champ d'action des quelques cultures protectrices actuellement disponibles sur le marché demeure restreint. Les connaissances actuelles sur les antifongiques synthétisés par les bactéries étant assez limitées, l'alternative de bio-conservation devient donc primordiale et nécessite l'élargissement des connaissances sur le sujet, afin de répondre à la demande des consommateurs et des industriels ainsi qu'aux problèmes de résistances émergentes. Ici, on s'intéresse plus particulièrement aux bactéries lactiques, proportionnellement plus utilisées dans les produits laitiers fermentés, et ayant des activités antifongiques connues.

(4) *Bactéries lactiques antifongiques dans les produits laitiers*

(a) *Croissance compétitive*

Les bactéries lactiques peuvent se développer dans le lait car elles y trouvent tous les éléments nécessaires à leur croissance. Elles utilisent le lactose, les protéines et la fraction azotée non protéique. Rapidement, le milieu s'appauvrit en nutriments et micronutriments, diminuant les chances que pourraient avoir d'autres microorganismes de s'y développer. Cette croissance compétitive est le premier effet barrière à l'établissement de microorganismes contaminants. Cependant, il n'est à lui seul pas suffisant pour empêcher toute contamination. A cet effet s'ajoute la production de divers composés conférant aux bactéries lactiques leur activité antimicrobienne, et plus particulièrement antifongique (De Muynck *et al.*, 2004 ; Voulgari *et al.*, 2010).

(b) *Composés antifongiques et mécanismes d'action*

(i) Activité fongicide ou fongistatique

Les activités antifongiques retrouvées chez les bactéries lactiques sont souvent souches dépendantes. Néanmoins, certains genres et espèces semblent plus actifs que d'autres. Le genre *Lactobacillus* est le plus retrouvé dans les travaux sur les recherches d'activités antifongiques des bactéries lactiques (Magnusson *et al.*, 2003 ; Schnürer and Magnusson, 2005 ; Voulgari *et al.*, 2010), suivi des genres *Lactococcus* (Roy *et al.*, 1996 ; Florianowicz, 2001) et *Leuconostoc* (Suzuki *et al.*, 1991 ; Schnürer and Magnusson, 2005) ainsi que des genres *Pediococcus* (Schnürer and Magnusson, 2005 ; Rouse *et al.*, 2008), *Enterococcus* (Voulgari *et al.*, 2010 ; Hadji-Sfaki *et al.*, 2011) et *Weissella* (Rouse *et al.*, 2008 ; Valerio *et al.*, 2009) qui, dans une moindre mesure, ont aussi révélé des activités antifongiques.

L'activité antifongique des bactéries lactiques n'est pas encore totalement élucidée, ni les molécules impliquées et mécanismes d'action. Cependant, la liste des composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ne cesse de s'allonger. De plus, la compréhension des

mécanismes impliqués dans l'activité antifongique de souches de bactéries lactiques devrait désormais être facilitée par les données génomiques. Actuellement, une soixantaine de génomes de bactéries lactiques est séquencée, et ce nombre va nettement augmenter dans les années à venir. Ces séquences permettront d'obtenir des informations quant aux bases moléculaires de l'activité antifongique. Les génomes peuvent effectivement être exploités pour la découverte de nouveaux peptides antifongiques, mais également pour connaître les voies de biosynthèse des molécules antifongiques ainsi que leur mode de régulation (Nes and Johnsborg, 2004).

Les composés actuellement connus proviennent des différentes activités métaboliques de ces bactéries. Il s'agit de métabolites primaires et secondaires issus de la fermentation et des différentes voies de dégradation utilisées par les bactéries lactiques (Figure 9). La plupart des molécules antifongiques ont ainsi une fonction primaire dans l'élaboration sensorielle et nutritionnelle des produits laitiers fermentés ou interviennent dans le Quorum-Sensing (Ross *et al.*, 2002 ; Ström *et al.*, 2002).

Ces composés ne présentent cependant une activité optimale que sous certaines conditions. Notamment, leur activité antifongique peut dépendre de la température ou du pH (Rouse *et al.*, 2008). De même, leur production peut dépendre, entre autres, de la phase de croissance des bactéries productrices et des nutriments présents dans le milieu (Dalié *et al.*, 2010). Aussi, pour être utilisables dans le contexte de bio-conservation, les métabolites antifongiques, actifs, doivent être compatibles avec les matrices alimentaires (De Muynck *et al.*, 2004).

- **Acides organiques, dioxyde de carbone et éthanol**

Les principaux métabolites impliqués dans les activités antagonistes sont des acides organiques. L'acide lactique est le principal produit de la fermentation par les bactéries lactiques. C'est un produit majoritaire issu de la fermentation des bactéries lactiques homofermentaires, mais d'autres acides organiques (principalement acétique, formique et propionique, ou encore, caproïque, benzoïque, etc.) sont également produits, en quantité plus significative par les souches hétérofermentaires, au cours du métabolisme primaire. L'acidification du milieu (abaissement du pH) est la première barrière contre les microorganismes d'altération (Drouault and Corthier,

2001). L'activité des acides, principalement utilisés comme additifs alimentaires (Voir partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 49), dépend du pH de l'aliment et de leur constante acide de dissociation (pKa), qui détermine leur forme (dissociée ou non dissociée) à un pH donné. Lorsque le pH est inférieur ou égal à son pKa, un acide est sous sa forme non dissociée. Sous cette forme, les acides, généralement hydrophobes, peuvent traverser passivement la membrane des cellules fongiques, grâce à la solubilité des lipides, et conduire à une accumulation d'ions hydrogène et d'anions. Le potentiel électrochimique membranaire est alors neutralisé et d'importantes réactions métaboliques sont inhibées puisque l'énergie des cellules fongiques ciblées est alors consacrée à excréter les ions hydrogène et n'est plus mobilisée pour la croissance cellulaire. Les acides, une fois entrés dans la cellule, peuvent donc conduire à sa mort (Gould, 1996 ; Helander *et al.*, 1997 ; Brul and Coote, 1999). De par leurs constantes de dissociation plus élevées, les acides acétique ($pK_{a \text{ acide acétique}} = 4,75$) et propionique ($pK_{a \text{ acide propionique}} = 4,87$) sont plus inhibiteurs que l'acide lactique ($pK_{a \text{ acide lactique}} = 3,08$) (Schnürer and Magnusson, 2005). Plus exactement, à un certain pH, la proportion de formes non dissociées sera plus élevée pour l'acide acétique ou l'acide propionique que pour l'acide lactique (Magnusson, 2003). L'acide propionique affecte la croissance fongique et altère les membranes fongiques à un pH aux alentours de 4,5 (Magnusson, 2003). L'activité des acides organiques, liée au pH, est également dépendante de leur concentration. Celle-ci doit rester acceptable pour la consommation (Dortu, 2008). Toutefois, dans certains produits laitiers fermentés, comme le fromage (Gouda) ou les yaourts, la concentration de l'acide benzoïque, produit à partir de l'acide hippurique, naturellement présent dans le lait, et parfois aussi à partir de la phénylalanine, par certaines bactéries lactiques (*Lb. casei*), dépasse largement la valeur nécessaire pour l'inhibition (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Schnürer and Magnusson, 2005 ; Agroscope). Les acides organiques présentent l'avantage d'avoir un large spectre d'action comprenant des bactéries à Gram positif, à Gram négatif, des levures et des moisissures (Ross *et al.*, 2002).

Le dioxyde de carbone et l'éthanol sont les autres métabolites primaires produits durant la croissance des bactéries lactiques hétérofermentaires. Les organismes aérobies sont sensibles à l'environnement anaérobie créé par la présence du dioxyde de carbone, qui peut également agir

sur la perméabilité de la membrane (Dortu, 2008 ; Dortu and Thonart, 2009). Les levures sont également sensibles à l'éthanol, mais ces deux métabolites sont généralement indésirables dans un produit laitier de bonne qualité (Sofos *et al.*, 1998).

▪ Peroxyde d'hydrogène

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase, ou bien une pseudo-catalase. Dans les deux cas, elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène, produit en croissance aérobie grâce à des flavoprotéines oxydases, à des NADH peroxydases, NADH oxydases ou α -glycérophosphate oxydases (Ross *et al.*, 2002 ; Magnusson, 2003). Ce dernier s'accumule dans l'environnement et inhibe différents microorganismes, majoritairement des bactéries car il a un fort effet oxydant sur les lipides membranaires et sur les protéines cellulaires (Ross *et al.*, 2002). Cette molécule présente de nombreux inconvénients qui limitent son utilisation en tant qu'agent conservateur. Elle a notamment un effet nocif sur les organismes impliqués dans l'élaboration des aliments ainsi que sur la santé humaine et peut avoir des effets potentiellement négatifs ou indésirables sur les qualités sensorielles des aliments (Dortu, 2008). Cependant, quand elle est produite dans le lait, elle peut se coupler à la lactoperoxydase et au thiocyanate, également présents dans le lait (Voir partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 54), et ainsi présenter un spectre d'activité plus large, notamment contre les champignons. Ce système a par exemple montré son efficacité contre *Candida albicans* (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Sofos *et al.*, 1998 ; Magnusson, 2003).

▪ Diacétyl

Le diacétyl est produit par la fermentation du citrate lorsque le pyruvate est en excès, principalement par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* et *Pediococcus*. Cette molécule est un composé aromatique associé au goût du beurre (Ross *et al.*, 2002 ; Magnusson, 2003 ; Dortu, 2008). Son spectre d'activité antimicrobienne comprend les levures et les bactéries Gram négatif principalement (Dortu, 2008). Son effet antimicrobien, qui semble être dû à son interférence avec l'arginine (Caplice and Fitzgerald,

1999), est optimal à des pH inférieurs à 7,0, cependant, la concentration nécessaire à l'inhibition (200 mM) altérerait le goût de l'aliment (Holzapfel *et al.*, 1995 ; Schnürer and Magnusson, 2005 ; Dortu, 2008).

▪ **Acétaldéhyde**

L'acétaldéhyde est le composé aromatique qui donne son goût caractéristique au yaourt (Wouters *et al.*, 2002). Ce composé est synthétisé par *S. thermophilus*, mais il ne peut être métabolisé ni par l'espèce productrice, ni par *Lb. bulgaricus*. Son accumulation dans l'aliment peut atteindre des concentrations suffisantes pour inhiber certains microorganismes (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* et *Escherichia coli*) (Yang, 2000). Cependant, son activité antifongique n'a à ce jour pas été démontrée.

▪ **Peptides antifongiques (similaires aux bactériocines)**

Les bactériocines sont des peptides synthétisés par les ribosomes de certaines bactéries (principalement bactéries lactiques) entre la fin de la phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire. Leur activité est cependant limitée puisqu'elle concerne des espèces proches de la souche productrice, donc des Gram positif (De Vuyst and Leroy, 2007 ; Dortu and Thonart, 2009). Elles agissent en dépolarisant la force proton motrice par action sur le potentiel de membrane ou sur le gradient de pH, ou en inhibant la synthèse de la paroi. Bien qu'utilisées dans les produits laitiers sous différentes formes (Dortu and Thonart, 2009), ces métabolites secondaires ne sont donc pas actifs contre les champignons et ne présentent pas d'intérêt pour la préservation contre les altérations fongiques (Ross *et al.*, 2002 ; Gálvez *et al.*, 2007 ; Dortu and Thonart, 2009). D'ailleurs, aucune culture bactériocinogène n'est commercialisée dans le secteur laitier. On rencontre uniquement des souches naturellement productrices (Cleveland *et al.*, 2001 ; Devlieghere *et al.*, 2004).

Des exceptions ont cependant été relevées et mettent en évidence des activités contre des souches bactériennes phylogénétiquement éloignées (Jack *et al.*, 1995 ; Cleveland *et al.*, 2001) et/ou contre des champignons (Topisirovic *et al.*, 2006). Ces composés protéiques présentent l'avantage de

posséder un plus large spectre d'action que les bactériocines. Ils inhibent pour la plupart des bactéries Gram négatif et Gram positif ainsi que des champignons (Atanassova *et al.*, 2003). Leur composition protéique a d'abord été supposée par leur perte d'activité après traitement aux enzymes protéolytiques (chymotrypsine, trypsine, pronase E, pepsine, protéinase K) (Roy *et al.*, 1996 ; Magnusson, 2003 ; Schnürer and Magnusson, 2005). On retrouve par exemple le peptide TV35b, ou pentocine, de taille moyenne (environ 3,9 kDa), produit par *Lb. pentosus* et présentant une activité fongistatique (Okkers *et al.*, 1999 ; Ström *et al.*, 2002 ; Schnürer and Magnusson, 2005). Ce peptide a notamment révélé son efficacité contre *Candida albicans* (Okkers *et al.*, 1999). Un autre petit peptide, produit par *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* a également été détecté et présente des activités contre plusieurs moisissures et contre *D. hansenii* et *K. marxianus* à des pH compris entre 3 et 6 (Magnusson and Schnürer, 2001 ; Magnusson, 2003). *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* produit également un composé protéique antifongique actif contre *C. albicans* et *S. cerevisiae*. Cette souche est utilisée comme starter dans le fromage jaune bulgare (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008). Une entérochine, produite par la souche *E. faecium*, isolée d'un yaourt mongolien (Tarag) a révélé des activités antifongiques. La stabilité de cette molécule fait d'elle un bon candidat pour la bio-conservation d'aliments soumis à des transformations « dures » telles que la pasteurisation ou autres traitements thermiques, l'adjonction d'acides, la congélation et de longues périodes de stockage (Hadj-Sfaxi *et al.*, 2011).

▪ Dipeptides cycliques

Beaucoup de dipeptides cycliques, qui sont des composés intermédiaires dans la production de peptides non ribosomiques (Ström, 2005), et qui sont impliqués dans le mécanisme de Quorum-Sensing, présentent des activités antibactériennes et antifongiques (Ström *et al.*, 2002). Ils ne sont cependant actifs qu'à des concentrations de l'ordre du mg/ml. Différentes souches de *Lb. plantarum* produisent des dipeptides cycliques. On recense entre autres la souche *Lb. plantarum* VTT E-78076, produisant le cyclo(glycyl-L-leucyl) (Niku-Paavola *et al.*, 1999) et les souches *Lb. plantarum* MiLAB 14 et *Lb. plantarum* MiLAB 393 qui synthétisent les cyclo (Gly-L-Leu), cyclo (L-Phe-L-Pro) et cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) (Ström *et al.*, 2002 ; Magnusson *et al.*,

2003). D'autres espèces telles que *P. pentosaceus*, *Lb. sakei*, ou *Lb. coryniformis* (notamment la souche Si3) produisent le cyclo (Phe-Pro) et le Cyclo (Phe-OH-Pro) (Ström *et al.*, 2002 ; Magnusson *et al.*, 2003). Par exemple, *P. pentosaceus* MiLAB 170 produit les dipeptides cycliques cyclo (L-Phe-cis-4-OH-D-Pro), cyclo (L-Leu-trans-4-OH-L-Pro) et cyclo (L-Leu-cis-4-OH-D-Pro) (Ström, 2005).

Ryan *et al.* (2011) ont mis en évidence la production des dipeptides cycliques cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Tyr-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro) et cyclo(L-His-L-Pro) par *Lb. amylovorus* DSM 19280 dans le milieu MRS. Yang and Chang (2010) ont quant à eux mis en évidence l'effet antifongique de la molécule cyclo(Leu-Leu) (ou 2,5-piperazinedione-3,6-bis(2-methylpropyl)) produite par *Lb. plantarum* AF1.

Le mode d'action antifongique des dipeptides cycliques n'est pas connu mais on sait cependant que certains sont impliqués dans le mécanisme d'inhibition de la production de mycotoxines, qui sera discuté plus tard (Voir partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 69) (Ström, 2005).

▪ Reutérine

Les bactéries lactiques ne peuvent pas dégrader le glycérol *via* la voie oxydative qui est incomplète chez elles. La seule voie de dégradation du glycérol se fait à travers la synthèse de la reutérine (ou 3-hydroxypropionaldéhyde, ou 3-HPA) (Magnusson, 2003). Cette molécule peut être synthétisée par différentes espèces du genre *Lactobacillus* (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. collinoïdes*, *Lb. coryniformis* et *Lb. reuteri*) pendant la phase stationnaire de croissance anaérobie, lorsque le glycérol est présent dans l'environnement et lorsqu'il y a une faible concentration de glucose (Schnürer and Magnusson, 2005 ; Dortu, 2008). Cette synthèse implique l'enzyme glycérol déshydratase qui est elle-même dépendante de la cobamide (Ross *et al.*, 2002 ; Vollenweider and Lacroix, 2004 ; Martín *et al.*, 2005 ; Schnürer and Magnusson, 2005). L'activité de la reutérine serait due à l'inhibition de la ribonucléotide réductase, impliquée dans la biosynthèse de l'ADN (Caplice and Fitzgerald, 1999). La reutérine possède un large spectre d'action, elle est active contre des bactéries Gram positif, Gram négatif, des levures (*Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*) et

des moisissures (*Aspergillus* et *Fusarium*), et peut aussi toucher les cellules productrices (à l'exception de *Lb. reuteri* qui y est résistant) (Vollenweider and Lacroix, 2004 ; Schnürer and Magnusson, 2005 ; Cleusix *et al.*, 2007 ; Dortu, 2008), ce qui exclut donc son utilisation dans les produits laitiers fermentés (Ross *et al.*, 2002).

▪ Reutéricycline

Lb. reuteri, cité précédemment pour sa production de reutéline, peut également synthétiser la reutéricycline. Cependant, cette production ne sera pas abordée en détail car l'activité de cet antibiotique se restreint aux bactéries Gram positif (Gänzle *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 2002).

▪ Acides gras

Les acides gras, produits par les bactéries lactiques à partir des lipides, mais également à partir des acides aminés, interviennent dans la qualité sensorielle des aliments (Ganesan *et al.*, 2004). En concentration suffisante, ils sont aussi connus pour conférer des propriétés antimicrobiennes (Magnusson, 2003). Leur mécanisme d'action n'est pas connu, mais il est supposé qu'ils altèrent la fluidité des membranes et la composition des lipides, ou bien encore qu'ils interfèrent avec la germination des spores (Ström, 2005). La production de plusieurs acides gras par des bactéries lactiques a déjà été reportée dans des laits fermentés (Magnusson, 2003). Il peut s'agir d'acides gras, tel que l'acide caproïque (C6) (Corsetti *et al.*, 1998), ou d'acides gras hydroxylés. *Lb. plantarum* MiLAB 393 produit les acides 3-hydroxydecanoïque (ou myrmicacine, ou 3-HDA), 3-hydroxydodécanoïque, 3-hydroxytétradécanoïque et 3-hydroxy-5-cis-dodécanoïque (Magnusson, 2003 ; Sjögren *et al.*, 2003). L'activité antimicrobienne augmente avec la longueur de la chaîne, ainsi, l'acide caprylique (C8) et les acides gras plus longs, sauf l'acide undécylique (C11), sont les plus efficaces. Les acides caprique (C10) et laurique (C12) ont révélé des activités contre *C. albicans* (Bergsson *et al.*, 2001). De même, les acides gras hydroxylés qui possèdent une chaîne à 12 carbones présentent les plus fortes activités (Magnusson, 2003) Par contre, ceci n'est plus vrai quand la chaîne carbonée est trop longue car elle diminue la solubilité de l'acide gras. Les levures semblent être les microorganismes les plus sensibles aux acides gras hydroxylés

(Magnusson, 2003). Ces composés sont actifs à des concentrations comprises entre 10 et 100 mg/ml, ce qui correspond aux concentrations utilisées avec l'amphotéricine B. Cette concentration est 10 à 200 fois plus élevée que celles retrouvées dans les surnageants de culture, cependant, les concentrations, plus élevées autour des colonies, pourraient être suffisantes pour permettre une activité *in situ* (Ström *et al.*, 2002 ; Sjögren *et al.*, 2003). De plus, même si leur activité dans des écosystèmes naturels n'a pas encore été démontrée, plusieurs acides gras ayant une activité antifongique ont déjà été isolés de produits fermentés, et ceci est un point positif par rapport à la conservation des produits laitiers (Schnürer and Magnusson, 2005).

▪ Acide phényllactique

L'acide phényllactique peut être produit par la dégradation de la phénylalanine et de la tyrosine par les espèces *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. coryniformis*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. hilgardi*, *Leuconostoc citreum* et quelques souches de *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus* et *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Magnusson *et al.*, 2003 ; Valerio *et al.*, 2004), mais également par d'autres espèces telles que *Enterococcus faecalis* (Ohhira *et al.*, 2004). Il intervient dans la formation des saveurs dans les fromages mais peut aussi inhiber des microorganismes pathogènes et d'altérations, incluant bactéries et champignons (Magnusson *et al.*, 2003 ; Valerio *et al.*, 2004). Phénylalanine et tyrosine peuvent être produites par quelques souches puis utilisées par la suite par une autre qui alors synthétisera l'acide phényllactique *via* une hydroxy acide déshydrogénase, par l'intermédiaire d'une transamination en acide phénylpyruvique (Li *et al.*, 2007 ; Mu *et al.*, 2009). Les acides phényllactique et 4-hydroxyphényllactique produits par *Lb. plantarum* 21b ont montré des activités contre plusieurs champignons filamenteux (Lavermicocca *et al.*, 2000). *Lb. plantarum* MiLAB 393 (Ström *et al.*, 2002), *Lb. coryniformis* Si3, *P. pentosaceus* et *Lb. sakei* produisent l'acide 3-phényllactique (Schnürer and Magnusson, 2005). Mais seules de fortes concentrations seront actives contre les levures et les moisissures (CMI comprises entre 3,75 et 7,5 mg/ml) (Sjögren, 2005 ; Armaforte *et al.*, 2006). Le mécanisme d'action de cette molécule n'est pas très bien connu, cependant on suppose qu'elle inhibe l'enzyme phénylalanine

déshydrogénase, qui, à partir de la phénylalanine, génère de la pyridine intervenant dans la synthèse des nucléotides (Ström, 2005).

D'autres composés non protéiques, de faible poids moléculaires, tels que la méthylhydantoïne et la mevalonolactone (Niku-Paavola *et al.*, 1999), l'acide D-glucuronique (acide uronique), la cytidine (nucleoside), la 2'-desoxycytidine, le décanoate de sodium, l'acide salicylique, l'acide paracoumarique, l'acide 3-phénylpropanoïque ou encore l'acide (*E*)-2-méthylcinnamique, (Ryan *et al.*, 2011) peuvent présenter des activités antifongiques, mais ils sont cependant moins décrits dans la littérature.

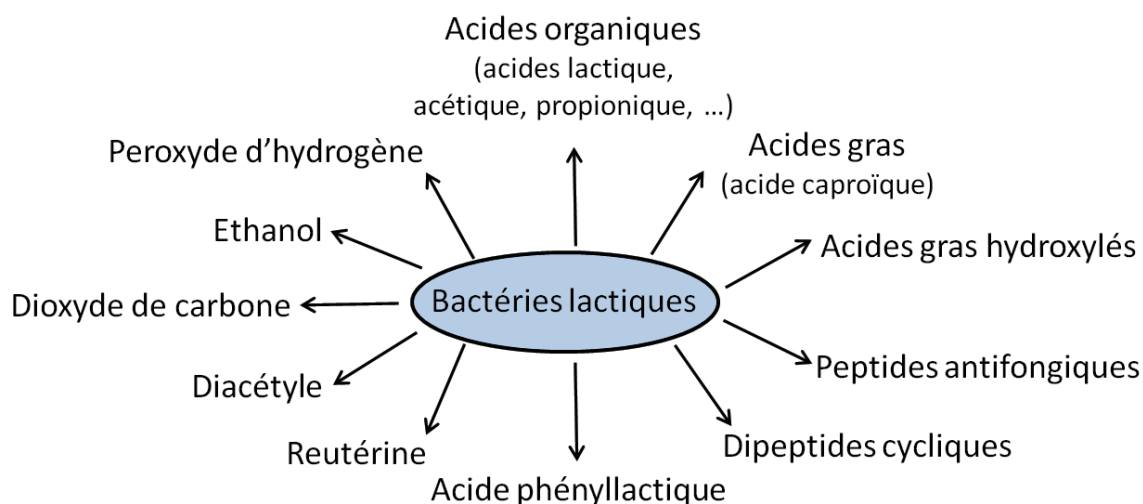


Figure 9. Résumé des connaissances actuelles sur les principaux composés antifongiques produits par les bactéries lactiques (inspiré de Schnürer and Magnusson (2005)).

(ii) Activité antitoxines

Certaines bactéries lactiques, et majoritairement des espèces du genre *Lactobacillus*, présentent des effets antifongiques *via* l'inhibition de l'accumulation de mycotoxines dans le milieu (Gourama and Bullerman, 1997 ; Dalié *et al.*, 2010). Elles peuvent en effet inhiber la synthèse des mycotoxines ou se lier à elles (Dalié *et al.*, 2010). L'inhibition de la synthèse se fait par l'intermédiaire de composés de faible poids moléculaire, encore mal définis mais supposés

protéiques, relâchés après lyse cellulaire ou pendant la croissance (Gourama and Bullerman, 1997 ; Dalié *et al.*, 2010). Notamment, on suppose que quelques dipeptides cycliques pourraient intervenir dans ce mécanisme (Ström, 2005). Des souches probiotiques telles que *Lb. rhamnosus* GG et *Lb. rhamnosus* LC-705 sont capables de lier plus de 80 % de l'aflatoxine B1 (Haskard *et al.*, 2001) et de lier de façon plus ou moins variable des trichothécènes (Dalié *et al.*, 2010) et la zéaralénone (El-Nezami *et al.*, 2002). Ochratoxine A, fumonisine et patuline peuvent également être piégées par diverses bactéries lactiques (Fuchs *et al.*, 2008 ; Dalié *et al.*, 2010). La liaison semble se faire au niveau du peptidoglycane et des polysaccharides de la paroi cellulaire (Haskard *et al.*, 2001 ; Dalié *et al.*, 2010). Enfin, dans le tractus gastro-intestinal, les complexes bactéries-mycotoxines sont rapidement excrétés ce qui limite l'absorption des mycotoxines dans le corps (Gratz *et al.*, 2006).

Chaque composé antimicrobien produit constitue une barrière supplémentaire au développement des microorganismes d'altérations. De plus, dans les matrices alimentaires, ces composés sont beaucoup plus efficaces en mélange que seuls (effet synergique). Ainsi, un mélange de composés antimicrobiens présents à des concentrations en deçà de leur CMI pourra être actif du fait que l'effet des molécules s'additionne (Corsetti *et al.*, 1998 ; Niku-Paavola *et al.*, 1999 ; Grattepanche *et al.*, 2008 ; Yang and Chang, 2010 ; Ryan *et al.*, 2011). Beaucoup de recherches sont effectuées en vue d'utiliser des cultures protectrices au sein des produits laitiers fermentés. En revanche, actuellement, peu sont disponibles sur le marché (mises à part celles citées précédemment) car, pour être actives, ces cultures protectrices doivent être inoculées à des concentrations importantes, ce qui peut affecter les qualités organoleptiques de l'aliment, mais également augmenter son coût de production comparativement aux conservateurs chimiques (Schwenninger and Meile, 2004 ; Grattepanche *et al.*, 2008).

3. Réglementation concernant l'utilisation de cultures protectrices pour l'alimentation humaine

Pour utiliser une culture microbienne en alimentation humaine, il faut valider son innocuité, démontrer sa nécessité technologique et faire en sorte que son utilisation reste transparente vis-à-vis du consommateur. Pourtant, en France et en Europe, il n'existe actuellement aucune réglementation pour l'autorisation de mise sur le marché d'une culture microbienne utilisée en alimentation humaine, contrairement à celles qui existent pour l'alimentation animale (Directive 93/113/EC, 1993 ; Wessels *et al.*, 2004 ; Brillet *et al.*, 2005), et bien que les étapes pour établir des décisions officielles soient connues, il semble encore difficile de les mettre en place. L'absence de réglementation vient avant tout du fait qu'aucune norme n'est disponible concernant les lignes directrices et les procédures à suivre dans l'évaluation de l'innocuité d'une souche. Dans tous les cas, l'évaluation de l'innocuité d'une culture microbienne est sous la responsabilité des professionnels qui mettent leur produit sur le marché. Pour ce faire, ils s'appuient sur les textes publiés par certains organismes afin de combler le manque de réglementation nationale et européenne. Il existe notamment une liste de microorganismes ayant une longue histoire d'utilisation sans risque (2002-2012), fournie par l'association européenne des cultures pour l'alimentation humaine et animale (EFFCA). Par contre, en absence d'historique de consommation avant mai 1997, on considère qu'il s'agit d'une utilisation non traditionnelle. Le terme Novel Food, défini par le Règlement 258/97/CE (1997), et appliqué à ces cultures sans historique de consommation, soulève alors la question du statut et de la sécurité de ces cultures.

Il n'existe pas de définition du terme culture microbienne au niveau européen. Ce terme a cependant été défini par l'EFFCA (2011). En France, la sécurité du consommateur est assurée *via* la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) et *via* l'autorité Européenne de sécurité des aliments (EFSA) en Europe, où la mise en place de directives est assurée par la Commission Européenne. Le *Codex alimentarius*, ensuite, constitue, à plus grande échelle, un recueil de normes, codes d'usages, directives et recommandations relatifs à la production et à la transformation agroalimentaire. Les substances

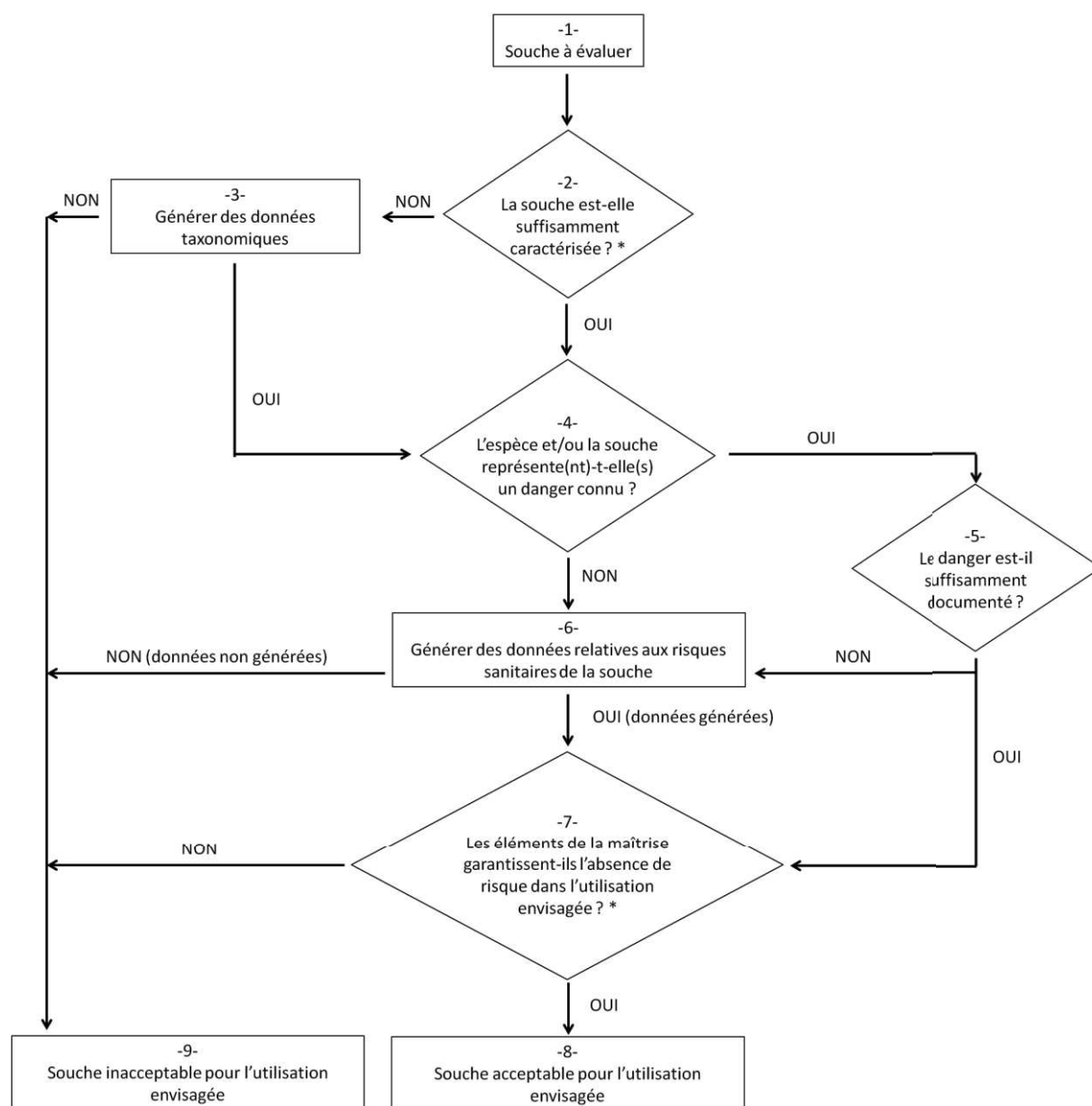
employées dans l'alimentation sont donc classées dans les catégories ingrédients, additifs, arômes, enzymes, substances nutritionnelles ou auxiliaires technologiques. Pour utiliser une culture microbienne, il est donc avant tout nécessaire de définir à laquelle de ces catégories elle appartient.

Une culture est toujours considérée comme une denrée alimentaire, et est de ce fait régie par le Règlement 178/2002/CE (2002) (article 14), qui autorise une mise sur le marché seulement après validation de son innocuité. Si la culture est considérée comme un ingrédient (comme les ferments par exemple), c'est-à-dire qu'elle participe à la fabrication du produit, elle est régie par la Directive 2000/13/CE (2000). On considère qu'elle est un additif lorsqu'elle ajoute au produit une technologie spécifique, et elle est dans ce cas régie par les Directives 89/107/CEE (1989) et 95/2/CE (1995).

L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES, anciennement AFSSA) a mis à disposition, en 2002, un arbre décisionnel pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire afin de faciliter la démarche à suivre et combler le manque de réglementation à ce sujet. Mais cet arbre décisionnel reste lui-même insuffisant du fait du manque de standardisation des méthodes d'évaluation (Figure 10).

La démarche QPS est un outil permettant d'évaluer l'innocuité d'une espèce et ainsi améliorer la stabilité et la sécurité du produit dans lequel elle est ajoutée. Pour appartenir à cette liste, une espèce doit être identifiée taxonomiquement. Son origine, ses paramètres de croissance, ses caractéristiques biochimiques ainsi que son mode d'action doivent être connus. Enfin, elle ne doit pas être pathogène (ne doit présenter aucun risque sur la santé), ne doit pas porter de résistances aux antibiotiques transférables et ne doit pas produire de toxines et/ou d'amines biogènes (Voir partie I. Les produits laitiers fermentés, page 30) (Wessels *et al.*, 2004). Le fabricant peut également s'appuyer sur le guide d'utilisation des bonnes pratiques HACCP et sur des règles d'hygiène (Voir partie III. Moyens de prévention des contaminations fongiques, page 46) venant

s'ajouter à la directive concernant l'innocuité ainsi qu'aux règles pour l'autorisation après évaluation des risques (Règlement 258/97/CE, 1997).



* Dans l'état actuel des connaissances

Figure 10. Arbre décisionnel pour l'évaluation de l'innocuité d'une souche microbienne utilisée dans le secteur agro-alimentaire (ANSES, 2002).

IV. Recherche de souches lactiques antifongiques

La recherche de bactéries lactiques antifongiques en vue de leur utilisation en tant que culture bio-protectrice nécessite que l'on tienne compte de la matrice dans laquelle on souhaite les implanter et des cibles fongiques contre lesquelles on désire lutter. L'isolement de souches doit donc se faire préférentiellement à partir d'un environnement où elles pourront être compétitives (Magnusson *et al.*, 2003 ; Durlu-Özkaya *et al.*, 2005 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Matamoros *et al.*, 2009 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Voulgari *et al.*, 2010). Enfin, il est essentiel de choisir des cibles pertinentes pour le criblage de bactéries présentant des activités antifongiques, et préférentiellement isolées de produits contaminés (Sjögren, 2005 ; Pilet *et al.*, 2009). Si l'objectif est de maîtriser la sécurité sanitaire d'un aliment, le choix des cibles sera axé sur les microorganismes pathogènes. En revanche, il sera axé sur des microorganismes d'altération si l'objectif est d'allonger la DLC.

Idéalement, les bactéries lactiques devraient être isolées à partir d'un milieu où elles sont en contact avec des microorganismes fongiques afin d'optimiser les conditions d'expression des composés antimicrobiens et ainsi maximiser les chances de rencontrer des bactéries qui présentent ce type d'activité. Des interactions sont connues entre bactéries et levures dans des environnements laitiers (Gadaga *et al.*, 2001 ; Viljoen, 2001) et la régulation de la transcription de certaines bactériocines par exemple, est sous contrôle du Quorum-Sensing (Nes and Johnsborg, 2004). On peut donc faire l'hypothèse que la capacité d'une souche à produire des molécules antimicrobiennes, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif, est étroitement liée à l'environnement microbien au sein duquel cette bactérie évolue. Une fois la/les bactérie(s) isolée(s), la recherche peut se focaliser sur les molécules impliquées et sur les mécanismes d'inhibition mis en jeu. Les méthodes utilisées doivent préférentiellement être rapides, simples, standardisées, sensibles et reproductibles (Sjögren, 2005).

Au final, une souche potentiellement intéressante devra être capable de croître ou tout au moins de survivre à température réfrigérée, et présenter une activité inhibitrice ou fongi-/bactério-

statique contre les microorganismes indésirables au sein de l'aliment lui-même caractérisé par des paramètres intrinsèques (composition physico-chimique, structure). Ce sont en effet ces derniers qui déterminent la capacité de croissance de la souche protectrice et l'expression de son activité inhibitrice (Brillet *et al.*, 2005).

A. Recherche de souches antifongiques / criblage (*in vitro*)

Le criblage de souches actives se fait souvent en premier lieu par des expérimentations *in vitro*. Une des méthodes les plus fréquemment rencontrées dans la littérature est le test en double couche (Magnusson and Schnürer, 2001 ; Ström *et al.*, 2002 ; Magnusson *et al.*, 2003 ; Dal Bello *et al.*, 2007 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Schillinger and Villarreal, 2010 ; Voulgari *et al.*, 2010). Celui-ci consiste à déposer un spot bactérien ou une ligne d'environ 2 cm à partir d'une culture ou de colonies isolées d'un milieu spécifique (lait,...) dont la DO_{600nm} est souvent ajustée (pour permettre une standardisation), sur un milieu gélosé adapté à la croissance de la souche bactérienne testée. Après croissance dans les conditions adéquates à la souche bactérienne, le spot bactérien est recouvert par une gélose à faible pourcentage d'agar (0,7 à 0,8 %) contenant le champignon en inclusion (10⁴ cellules ou spores par ml). Après une incubation adéquate permettant la croissance du champignon ciblé, l'activité est révélée par une zone d'inhibition de croissance du champignon autour du spot.

La seconde technique rencontrée est une méthode de diffusion en gélose. Plus exactement, le surnageant de culture bactérienne, après avoir été centrifugé, stérilisé par filtration et concentré ou non (suite à une lyophilisation), est déposé en puits creusé dans la gélose (Corsetti *et al.*, 1998 ; Magnusson and schnürer, 2001 ; Atanassova *et al.*, 2003) ou sur disque déposé sur la gélose (De Muynck *et al.*, 2004). Le champignon cible est soit inclus dans la gélose, soit étalé en surface (Roy *et al.*, 1996). La gélose contient également un faible pourcentage d'agar pour faciliter la diffusion des molécules actives. L'activité du surnageant est confirmée par une zone d'inhibition de croissance du champignon autour du puits ou du disque.

Enfin, on rencontre aussi le test de micro-titrage en puits sur plaque. Un volume de surnageant centrifugé, stérilisé par filtration et concentré ou non est mélangé à du milieu de culture liquide contenant 10^4 spores ou cellules de champignons par ml. La plaque est incubée en chambre humide à la température et pendant la durée nécessaires à la croissance du champignon ciblé (Magnusson and Schnürer, 2001 ; Laitila *et al.*, 2002 ; Lavermicocca *et al.*, 2003 ; Gerez *et al.*, 2009 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Schillinger and Villarreal, 2010). Cette méthode consiste à évaluer une inhibition de la germination du champignon par mesure de DO à 550 ou 580 nm et l'activité antifongique est exprimée en pourcentage de réduction de la germination ou de la croissance.

Pour les deux dernières techniques citées, le surnageant peut préalablement être soumis à différents traitements afin de caractériser partiellement la nature chimique des composés présentant une activité antifongique. Le chauffage, la neutralisation du pH et des traitements enzymatiques du surnageant (notamment avec des protéases telles que protéinase K, trypsine et pepsine) (Magnusson and Schnürer, 2001 ; Atanassova *et al.*, 2003 ; Rouse *et al.*, 2008) sont les plus couramment utilisés.

B. Evaluation de l'activité *in situ*

Les bactéries lactiques présentant un fort potentiel antifongique *in vitro* doivent ensuite être testées au sein du produit dans lequel on souhaite les introduire, car chaque matrice est définie par un ensemble de paramètres qui vont influencer l'activité des souches. De nombreux facteurs, biotiques et abiotiques, peuvent affecter l'activité d'une souche et/ou des composés antimicrobiens (Gálvez *et al.*, 2007). Notamment, il est connu que le pH et la viscosité d'une matrice influencent les caractéristiques antimicrobiennes d'une souche. Souvent, il a été prouvé que l'activité d'une souche augmentait dans une matrice en gel (Schwenninger and Meile, 2004). Les bactéries inhibitrices peuvent être utilisées directement comme ferments, ou couplées à des ferments traditionnels dans un produit laitier défini. Il est avant tout nécessaire de s'assurer que les souches testées sont capables de croître ou tout au moins de survivre et de rester

métaboliquement actives dans les conditions de fabrication et de stockage du produit en question, sans entrer en compétition avec les ferments. Celles-ci ne doivent pas altérer les propriétés technologiques et organoleptiques du produit dans les concentrations nécessaires à l'inhibition. Ainsi, des évaluations sensorielles sont essentielles suite à l'application de ces souches dans un produit. Dans certains cas, il est apparu que l'ajout de souches protectrices pouvait avoir des effets positifs sur la texture du produit *via* la production d'EPS par exemple (Tawfik *et al.*, 2004 ; El-Shafei *et al.*, 2008).

Enfin, dans les tests effectués, il est nécessaire de se rapprocher au maximum des conditions réelles de production, de stockage et de contamination (ANSES, 2008). Le mode de contamination (en surface ou en inclusion) détermine le choix de la cible à tester (aérobie ou anaérobie) et du taux de contamination. Dans les challenge tests, la contamination est souvent effectuée à un taux de 10^2 UFC déposés en surface, ou de 10^2 UFC/ml en inclusion (Schwenninger and Meile, 2004) ; la température de stockage est choisie supérieure ou égale à la température de stockage réelle, tout comme la durée du test, qui est choisie égale ou allant au-delà de la DLC du produit.

Objectifs et démarche expérimentale

L'objectif général du projet était d'obtenir une culture, simple ou mixte, de bactéries lactiques, pouvant être utilisée pour la bio-conservation de produits laitiers fermentés tels que les laits fermentés, les yaourts ou les fromages frais. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le lait cru pouvait être un réservoir de bactéries lactiques antifongiques, et que ces bactéries, puisqu'isolées du lait, auraient la capacité de s'y développer et d'y être compétitives.

L'objectif premier a donc été de constituer une importante collection de bactéries lactiques antifongiques afin de disposer de suffisamment de matériel biologique pour sélectionner les souches pouvant inhiber la croissance des contaminants fongiques dans les produits laitiers fermentés. La constitution de cette collection a été l'occasion d'étudier la prévalence et la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans le lait cru chez trois espèces laitières.

De nombreux auteurs ont mis en évidence la présence d'une grande variété de bactéries lactiques dans le lait cru (Medina *et al.*, 2001 ; Callon *et al.*, 2007 ; Franciosi *et al.*, 2009), alors que d'autres ont analysé l'activité antifongique de bactéries lactiques isolées d'environnements divers (Magnusson *et al.*, 2003 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Schillinger and Villarreal, 2010 ; Voulgari *et al.*, 2010). En revanche, aucune étude n'a jamais porté sur la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans une niche écologie particulière, ni sur les paramètres pouvant l'influencer.

La première étape de ce projet de thèse a donc été de mettre en évidence et d'isoler les colonies présentant une activité antifongique contre différentes cibles sur différents milieux semi-sélectifs des bactéries lactiques, sur une période d'une année et sur des échantillons de lait provenant de 3 espèces laitières. Des tests préliminaires, réalisés sur des échantillons de lait de vache provenant d'une seule ferme, s'étaient montrés peu concluants (aucune colonie active n'avait alors été détectée). Nous avons donc décidé de travailler sur des laits de mélange provenant d'une tournée de collecte de lait, et de diversifier la provenance des échantillons en étudiant des laits de trois espèces laitières (vache, brebis et chèvre), récoltés à différentes périodes de l'année (hiver,

printemps, été/automne) afin de maximiser la diversité bactérienne et la probabilité de mettre en évidence des souches actives. Les tests d'activité ont été effectués sur 8 milieux semi-sélectifs des bactéries lactiques et contre quatre cibles fongiques (*Pichia anomala*, *Kluyveromyces lactis*, *Mucor plumbeus* et *Penicillium expansum*) communément rencontrées dans l'altération des produits laitiers fermentés.

Les résultats de cette première étude (Chapitre I de la partie Résultats), nous ont amenés à nous interroger sur un éventuel lien entre l'expression de l'activité antifongique des bactéries lactiques et la présence d'un environnement microbien inducteur. Il est en effet connu que la régulation de la transcription de certaines bactériocines est sous contrôle du Quorum-Sensing et donc induite par l'environnement microbien des bactéries inhibitrices (Nes and Johnsborg, 2004). Nous avons alors supposé que le contact des bactéries lactiques avec des champignons dans le lait favorisait l'expression par ces dernières de composés antifongiques.

En partant de cette hypothèse, la seconde étude (Chapitre II de la partie Résultats) a eu pour objectif de mettre en évidence un lien entre l'expression de l'activité antifongique des bactéries lactiques isolées des échantillons de laits crus utilisés dans la première étude, et la présence de champignons inducteurs dans ces mêmes échantillons. Ainsi la biodiversité des champignons a été analysée dans les échantillons de lait cru récoltés lors de la première semaine de chaque période d'échantillonnage.

Nous avons finalement sélectionné onze souches de lactobacilles antifongiques provenant de la collection de souches établie au cours de la première étude, selon leur spectre d'action et l'intensité de leur activité antifongique. L'objectif de la troisième étude (Chapitre III de la partie Résultats) était d'identifier ces isolats et de caractériser certaines de leurs propriétés technologiques en vue de leur utilisation en tant que culture protectrice dans le yaourt, choisi comme modèle d'étude au laboratoire. Cette activité a été évaluée contre 6 cibles (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* et *Penicillium brevicompactum*) plus spécifiquement problématiques pour le yaourt.

Deux des souches testées (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I) présentant une forte activité *in situ* (Chapitre III), nous avons cherché à mieux caractériser les conditions susceptibles de moduler leur activité. L'objectif de cette quatrième étude (Chapitre IV de la partie Résultats) a donc été de déterminer si certains paramètres technologiques (ajout de saccharose, durée de fermentation, combinaison de souches protectrices) liés à la fabrication des laits fermentés comme le yaourt, ainsi qu'à leur taux de contamination, pouvaient moduler les propriétés antifongiques de ces deux souches contre *Y. lipolytica*, une levure particulièrement difficile à inhiber.

RESULTATS

CHAPITRE I

**Biodiversité des bactéries lactiques
antifongiques dans des échantillons de laits
crus de vache, de brebis et de chèvre, récoltés
sur une période d'une année**

-

**Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria
isolated from raw milk samples from cow, ewe
and goat over one-year period**

Emilie Delavenne, Jérôme Mounier, Franck Dénier, Georges Barbier and Gwenaëlle Le Blay (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology* **155**, 185-190.

Les produits laitiers fermentés tels que les laits fermentés, les yaourts et les fromages frais sont particulièrement sensibles aux contaminations fongiques (Rohm *et al.*, 1992 ; Huis in't Veld, 1996). Ces champignons sont responsables d'altérations et ils sont potentiellement mycotoxynogènes (Tantaoui-Elaraki and Khabbazi, 1984 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Nelson, 1993 ; Pitt, 2000 ; Sengun *et al.*, 2008). Les pertes économiques qui en résultent peuvent être considérables et étaient jusqu'alors limitées par l'utilisation de conservateurs chimiques (Brul and Coote, 1999 ; Smith and Hong-Shum, 2003). Cependant, l'émergence de résistances à ces conservateurs, la méfiance croissante des consommateurs vis-à-vis des additifs alimentaires et l'évolution de la législation européenne (Brul and Coote, 1999), tendent aujourd'hui à limiter leur utilisation et si possible à les remplacer par des méthodes de conservation plus douces telles que l'utilisation de cultures protectrices. Les bactéries lactiques, naturellement présentes dans un grand nombre de produits laitiers fermentés, et reconnues pour leur innocuité (Bernardeau *et al.*, 2008 ; EFSA, 2009), sont de bonnes candidates pour la bio-conservation. De nombreuses études ont mis en exergue leur activité antimicrobienne et plus spécifiquement leur activité antifongique (Schnürer and Magnusson, 2005). Selon l'environnement choisi et les méthodes utilisées, 0 à 75 % d'entre elles possèderaient des activités antifongiques (Magnusson *et al.*, 2003 ; De Muynck *et al.*, 2004 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Gerez *et al.*, 2009 ; Valerio *et al.*, 2009 ; Schillinger and Villarreal, 2010 ; Voulgari *et al.*, 2010). Cependant, aucune étude n'a décrit jusqu'à présent, dans une niche écologique particulière comme le lait, la prévalence et les variations périodiques des bactéries lactiques antifongiques en comparaison au nombre total de bactéries lactiques dans un même échantillon. Les bactéries lactiques représentent de 20 à 30 % des bactéries totales du lait cru, et elles peuvent provenir de différentes sources (peau de l'animal, aliment, étable, etc.) (Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004 ; Tailliez, 2004 ; Kagkli *et al.*, 2007 ; Mofredj *et al.*, 2007). Leur abondance et leur diversité dans le lait cru varient donc en fonction de l'animal, des conditions de traite, des saisons, de l'alimentation, etc. (Gaya *et al.*, 1999 ; Michel *et al.*, 2001 ; Drakoularakou *et al.*, 2003 ; Verdier-Metz *et al.*, 2009).

L'objectif de cette étude a été d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans différents échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de brebis, collectés sur une année, pendant trois semaines consécutives sur trois périodes d'échantillonnage différentes pour chaque animal (hiver, printemps et été/automne) dans trois zones géographiques de France. Les bactéries totales et les bactéries lactiques ont été dénombrées respectivement sur des milieux non sélectifs et semi-sélectifs. Les milieux semi-sélectifs, choisis pour sélectionner différents genres de bactéries lactiques, et notamment ceux communément retrouvés dans le lait (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*), ont également été utilisés pour effectuer les tests d'activités antifongiques. Ces derniers ont été réalisés directement sur les différentes dilutions de bactéries étalées sur les milieux semi-sélectifs de façon à maximiser les chances d'isoler des souches actives. Les champignons choisis dans cette étude (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia anomala*, *Mucor plumbeus*, *Penicillium expansum*) sont des contaminants fréquents des produits laitiers fermentés. Les méthodes utilisées sont plus précisément exposées dans la partie « matériels et méthodes » de la publication associée au chapitre I.

Résultats et Discussion

Tous les échantillons de lait étaient dominés, parmi la population de bactéries lactiques, par des coques Gram-positif, catalase négative appartenant présomptivement aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Les entérocoques, les lactobacilles et les bactéries lactiques psychrotolérantes étaient présents en plus faibles concentrations ($\leq 4,5 \log_{10}$ UFC/ml) ($P < 0,05$). Les périodes d'échantillonnage n'ont pas influencé les concentrations microbiennes des laits, à l'exception de la concentration en lactobacilles qui, dans les laits de brebis, était significativement plus faible durant la seconde période d'échantillonnage. Ainsi, il a été montré que les concentrations des populations bactériennes sont influencées par l'environnement (Callon et al., 2007) et notamment, les fortes chutes de pluie dans l'Aveyron à l'époque correspondant à cette période pourraient expliquer cette diminution.

D'après la littérature, les activités antimicrobiennes s'expriment de façon différente selon la composition de la communauté microbienne, l'environnement et les conditions de croissance (Pfeiler and Klaenhammer, 2007 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Schillinger and Villarreal, 2010). Ceci a été démontré de façon flagrante dans cette étude qui a mis en évidence l'influence significative de l'origine du lait, de la période d'échantillonnage, du champignon ciblé et du milieu d'isolement des bactéries sur l'activité antifongique et sur la diversité des bactéries isolées.

Origine du lait

Sur plus de 70 000 isolats criblés, 1 235 ont été isolés après avoir révélé des inhibitions sur boîte. Seulement 0,5 % des colonies isolées à partir des laits de brebis ont révélé une activité antifongique, contre 1,8 et 2,5 % à partir des laits de chèvre et de vache, respectivement. Ainsi, parmi les colonies antifongiques, 8 % ont été isolées à partir de laits de brebis, tandis que 43 % et 49 % ont été isolées, respectivement, à partir des laits de chèvre et de vache.

Période d'échantillonnage

Une nette augmentation du pourcentage de colonies actives isolées a été observée entre la seconde et la troisième période d'échantillonnage à partir des laits de vache (1,4 *vs* 3,1 % de colonies actives) et de chèvre (0,9 *vs* 2,2 % de colonies actives). Ceci n'a cependant pas été observé pour les colonies isolées à partir des laits de brebis (0,8 *vs* 0,3 % de colonies actives). Ainsi, 50 % des isolats antifongiques ont été isolés durant la troisième période d'échantillonnage. Aucune explication claire ne peut être fournie pour expliquer l'augmentation du pourcentage de souches actives isolées des laits de vache et de chèvre à la troisième période d'échantillonnage. Elle ne peut pas être due à la physiologie des animaux car la même variation n'est pas observée chez tous les animaux et parce que, chez les vaches, il n'y a pas de synchronisation de la parturition. Elle peut plutôt s'expliquer par l'alimentation et/ou les changements de saison. Pour les chèvres et les vaches, la seconde période d'échantillonnage a eu lieu en juin, et la troisième en automne. L'ensilage, qui peut être une source de bactéries lactiques antifongiques (Broberg *et al.*, 2007 ; Kalač, 2011), ne fait pas partie de l'alimentation des brebis, et n'est pas donné aux vaches

et aux chèvres au printemps (seconde période d'échantillonnage). Son utilisation ou non pourrait peut-être expliquer la faible concentration de souches antifongiques dans les laits de brebis.

Champignon

Comme dans l'étude de Hassan and Bullerman (2008), *P. expansum* s'est révélé être une cible très sensible puisque 3 % des colonies criblées contre ce champignon ont présenté une activité. Ainsi, 48,5 % des souches actives ont été isolées contre *P. expansum*. A l'inverse, *P. anomala* était une cible beaucoup moins sensible car seulement 0,6 % des colonies criblées contre cette levure ont montré une activité, contre 0,9 % et 2 % pour *K. lactis* et *M. plumbeus*, respectivement. Cette faible occurrence d'isolats actifs contre *P. anomala* a déjà été décrite dans l'étude de Magnusson *et al.* (2003), et peut s'expliquer par une forte tolérance de *P. anomala* à des concentrations élevées en acides organiques (Lind *et al.*, 2005).

Milieu d'isolement

Environ 86 % des colonies actives ont été isolées sur des milieux à base de MRS (LAMVAB, MRS acidifié et MRS incubé à 10°C), et parmi elles, la moitié provenait de laits de vache et de chèvre collectés durant la troisième période d'échantillonnage. L'influence notable des milieux d'isolement sur le nombre de souches antifongiques isolées s'explique par l'acétate contenu dans le MRS, connu pour maximiser l'activité antifongique (Stiles *et al.*, 2002 ; Lind *et al.*, 2005 ; Schillinger and Villarreal, 2010).

Identification des souches

En raison de la très forte proportion d'isolats actifs contre *P. expansum*, l'identification préliminaire des isolats par séquençage partiel du gène codant l'ARNr 16S, s'est limitée aux isolats actifs contre *M. plumbeus*, *K. lactis* et *P. anomala*. Parmi les 733 isolats séquencés, 94 % appartenaient au genre *Lactobacillus*, le reste se répartissant entre les genres *Leuconostoc* (3,7 %), *Enterococcus* (1,9 %) et *Lactococcus* (0,4 %). Ces trois derniers, pourtant majoritaires parmi les bactéries lactiques du lait cru (Callon *et al.*, 2007 ; Franciosi *et al.*, 2009), et pouvant également se

développer sur les milieux à base de MRS, n'ont montré que très peu d'activité. Ainsi, même si les milieux utilisés pour l'isolement des bactéries ont pu induire un biais, on peut supposer que le genre *Lactobacillus* a présenté plus d'activité antifongique que les autres. Cette hypothèse s'appuie également sur le fait que, dans beaucoup d'études, la majorité des bactéries lactiques antifongiques appartient à ce genre (Schnürer and Magnusson, 2005).

Comparaison des lactobacilles

Parmi les lactobacilles, classés en groupes phylogénétiques, 55 % appartenaient au groupe *Lb. casei*, 19 % au groupe *Lb. reuteri*, 17 % au groupe *Lb. plantarum* et 7 % seulement au groupe *Lb. buchneri*, les 2 % restants appartenant aux groupes *Lb. delbrueckii*, *Lb. perolens*, *Lb. salivarius* et *Lb. coryniformis*. Le groupe *Lb. casei*, ainsi que le groupe *Lb. plantarum*, sont fréquemment décrits comme majoritaires parmi les lactobacilles du lait cru (Medina *et al.*, 2001 ; Franciosi *et al.*, 2009).

Spécificité cible-isolats antifongiques

Cette étude a également permis de mettre en évidence des dépendances entre taxons bactériens et champignons inhibés, avec une surexpression de bactéries actives contre un champignon plutôt qu'un autre dans certains laits et à certaines périodes d'échantillonnage. Les groupes *Lb. casei* et *Lb. reuteri* étaient sur-représentés chez les bactéries isolées contre *M. plumbeus*, et sur-représentés dans les échantillons de lait de vache et/ou de chèvre de la troisième période d'échantillonnage. Le groupe *Lb. plantarum* était sur-représenté chez les bactéries isolées contre *K. lactis*, et sur-représenté dans les échantillons de lait de vache de la deuxième période d'échantillonnage et de lait de chèvre de la première période d'échantillonnage. Enfin, le groupe *Lb. buchneri* était sur-représenté chez les bactéries actives contre *P. anomala*, et sur-représenté dans les échantillons de lait de vache de la deuxième période d'échantillonnage. Les mécanismes d'action des isolats antifongiques ne sont actuellement pas encore élucidés, cependant la mise en évidence de liens entre certains groupes de lactobacilles et certaines cibles fongiques pourrait être associée à différentes productions d'acides organiques et/ou d'éthanol par les lactobacilles antifongiques et les différences de sensibilités des cibles fongiques à ces métabolites. Le fait que très peu de

lactobacilles antifongiques homofermentaires aient été isolés, suggère que la production d'acide acétique a joué un rôle majeur dans l'activité antifongique des isolats. Cependant, ce n'était pas la seule molécule antifongique produite. Des analyses HPLC, effectuées sur certains isolats, ont mis en évidence la production d'autres molécules antifongiques telles que l'acide phényllactique, l'acide 2 pyrrolidone-5-carboxylique ou bien encore l'acide caproïque. L'activité synergique d'un mélange de différentes molécules antifongique telles que le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, les acides gras ou les composés de faible poids moléculaire (acides phényllactique, hydroxyphényllactique, 2-pyrrolidone-5-carboxylique et dipeptides cycliques) ne peut donc être exclue, notamment dans l'inhibition de *P. anomala*, très résistante aux acides lactique et acétique.

Cette étude a mis en évidence que les laits de vache et de chèvre peuvent être considérés comme des réservoirs de bactéries lactiques antifongiques, contrairement aux laits de brebis. La majorité des isolats antifongiques appartenait au genre *Lactobacillus*. Ce genre est certainement l'un des plus actifs contre les champignons parmi les bactéries lactiques du lait cru. La dépendance existant entre taxons bactériens et cibles fongiques dans certains laits et à certaines périodes d'échantillonnage nous a conduits à nous interroger sur un éventuel lien entre l'expression de l'activité antifongique des bactéries lactiques et la présence d'un environnement fongique inducteur. Cette question a été le point de départ de la seconde étude présentée dans cet ouvrage, dont l'objectif a été d'évaluer la diversité fongique dans les mêmes échantillons de laits crus.



Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period

E. Delavenne, J. Mounier, F. Déniel, G. Barbier, G. Le Blay *

UEB, France

Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScnBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2011

Received in revised form 23 January 2012

Accepted 5 February 2012

Available online 12 February 2012

Keywords:

Antifungal lactic acid bacteria

Biodiversity

Milk

Cow

Ewe

Goat

ABSTRACT

Antifungal lactic acid bacteria (ALAB) biodiversity was evaluated in raw milk from ewe, cow and goat over one year period. Lactic acid bacteria were enumerated using 8 semi-selective media, and systematically screened for their antifungal activity against 4 spoilage fungi commonly encountered in dairy products. Depending on the selective medium, between 0.05% (Elliker agar) and 5.5% (LAMVAB agar) screened colonies showed an antifungal activity. The great majority of these active colonies originated from cow (49%) and goat (43%) milks, whereas only 8% were isolated from ewe milk. *Penicillium expansum* was the most frequently inhibited fungus with 48.5% of colonies active against *P. expansum* among the 1235 isolated, followed by *Mucor plumbeus* with 30.6% of active colonies, *Kluyveromyces lactis* with only 12.1% of active colonies and *Pichia anomala* with 8.7% of active colonies. In the tested conditions, 94% of the sequenced active colonies belonged to *Lactobacillus*. Among them, targeted fungal species differed according to the *Lactobacillus* group, whose presence largely depended on year period and milk origin. The *Lb. casei* and *Lb. reuteri* groups, predominantly recovered in summer/fall, were overrepresented in the population targeting *M. plumbeus*, whereas isolates from the *Lb. plantarum* group, predominantly recovered in spring, were overrepresented in the population targeting *K. lactis*, the ones belonging to the *Lb. buchneri* group, predominantly recovered in spring, were overrepresented in the population targeting *P. anomala*. Raw milk, especially cow and goat milks from the summer/fall period appeared to be a productive reservoir for antifungal lactobacilli.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Milk and fermented dairy products are favorable environments for yeasts and molds growth that can be involved in fermentation or food spoilage (Rohm et al., 1992). They may ferment lactose and sucrose, utilize lactate, hydrolyze lipids and proteins and may grow at refrigeration temperatures (Huis in't Veld, 1996). Food spoilage fungi may be responsible for production of gas, alcohol and undesirable aromatic compounds leading to flavor and texture defects, and economic losses (Rohm et al., 1992; Torkar and Vengust, 2008). Certain molds may also synthesize a wide panel of mycotoxins detrimental to the consumer health (Nelson, 1993; Pitt, 2000; Tantaoui-Elaraki and Khabbazi, 1984). To avoid fungal spoilage, numerous chemical preservatives are used, including organic acids, sodium benzoate, potassium sorbate, potassium benzoate and pimaricin (Brul and Coote, 1999; Smith and Hong-Shum, 2003). However, increasing resistances of fungi toward chemical preservatives, consumers demand for healthy and natural products and legislation evolution (Brul and Coote, 1999), have lead industrials to find

new means of preservation such as bioprotective cultures like MicroGARD® and HOLDBAC™ (Danisco, Niebüll GmbH, Germany).

Lactic acid bacteria (LAB) are good candidates for fermented dairy food biopreservation. They are naturally present in yogurts, creams, fresh and mature cheeses and some of them possess antimicrobial activities (Pfeiler and Klaenhammer, 2007; Schnurer and Magnusson, 2005). Moreover, most of them belong to the qualified presumption of safety (QPS) and generally recognized as safe (GRAS) lists which insure their safe use in food (Bernardeau et al., 2008; Rossetti et al., 2009). Only few lactic acid bacteria such as enterococci remain excluded from this status and require more vigilance because of their role in infection cases and spreading of antibiotic resistance genes (Mathur and Singh, 2005). Based on literature data, 0% to 75% LAB would have antifungal properties (De Muyne et al., 2004; Gerez, et al., 2009; Magnusson et al., 2003; Rouse et al., 2008; Schillinger and Villarreal, 2010; Valerio et al., 2009; Voulgari et al., 2010). This huge variation in the percentage of active LAB is explained by differences in methods for activity testing including medium utilized for LAB growth and targeted fungi. Until now, no study has systematically described, in a specific niche such as milk, the prevalence and the periodical variations of antifungal LAB, tested with the same method, and compared these data with the total number of LAB present in the same sample.

* Corresponding author at: Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 290915110; fax: +33 290915101.

E-mail address: gwenaelle.leblay@univ-brest.fr (G. Le Blay).

LAB represent 20–30% of total bacterial counts in raw milk, but conditions of production, season, breeding and the animal origin of milk influence their abundance and diversity (Drakoularakou et al., 2003; Gaya et al., 1999; Michel et al., 2001; Verdier-Metz et al., 2009). According to Medina et al. (2001), enterococci represent the majority of LAB (48%) in ewe raw milk, followed by lactobacilli (*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*) (30%), lactococci (14%) and *Leuconostoc* spp. (8%). Franciosi et al. (2009) showed that 94% of isolated LAB in cow's milk included lactococci, enterococci and streptococci, the remaining 6% isolates were lactobacilli (mostly *Lb. casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei* and *Lb. plantarum*), *Leuconostoc* and pediococci. LAB commonly encountered in goat's milk are *Lactococcus lactis*, *Lactococcus graviae*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lb. casei* (Callon et al., 2007). LAB from raw milk may originate from various sources, which can explain diversity found among seasons, animal species, etc. They can directly come from milk, but also from animals' environment. Indeed, *Leuconostoc* spp. come from vegetation and roots but can easily propagate and persist in various niches such as raw materials. Their presence in milk is due to contamination (Hemme and Foucaud-Scheunemann, 2004). The ubiquitous genera *Lactococcus* and *Lactobacillus* may come from plants, feces or udder skin (Kagkli et al., 2007; Mofredj et al., 2007; Tailliez, 2004).

The objective of this work was to evaluate the biodiversity of antifungal LAB in different raw milk samples, coming from ewe, cow and goat and collected at three different periods (winter, spring and summer/fall) over one year in three collect areas in France. To reach our goal, bacteria were enumerated in eight semi selective media used for LAB enumeration and overlaid with four targeted fungi commonly involved in the spoilage of dairy products.

2. Materials and methods

2.1. Raw milk samples

Raw milk was sampled during year 2009 in refrigerated bulk tanks from milk collecting trucks coming from restricted areas in three French "Départements" according to the three tested species: ewe (Aveyron), goat (Deux Sèvres) and cow (Ille-et-Vilaine). For each species, nine raw milk samples were collected during three successive weeks at three periods of the year (winter, spring and summer/fall). They corresponded to January, April and July for ewes; February, June and November for goats; and February, June and September for cows. These periods were different depending on species; they corresponded to different lactation periods (beginning, middle and end) for ewes and goats as well as different feeding conditions. In winter, ewes were kept in sheep-folds and they were fed with dried food (grains and hay), they did not receive silage. They started to graze outside in spring. Cows and goats were mainly kept in stalling during winter and fed with dried and humid food (hay, silage and grains); they started to graze outside in spring. Milk samples (500 ml) were aseptically taken in refrigeration tanks, kept at 4 °C, sent to the laboratory and analyzed within 48 h. Milk pH was recorded and 10 ml were immediately used for bacterial enumeration.

2.2. Enumeration of total and lactic acid bacteria

Raw milk samples (10 ml) were serially diluted 10-fold in peptone water (0.1%, pH 7) and plated in quadruplicate on both non selective and semi-selective media. Total bacteria were enumerated on plate count agar (PCA) supplemented with 1% milk (AES Chemunex, Bruz, France) (Michel et al., 2001) and Elliker agar (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (Carr et al., 2002; Randazzo et al., 2002; Teuber, 1993). Lactobacilli were enumerated on LAMVAB, an MRS-based medium supplemented with vancomycin and acidified to pH 5 (Coeuret et al., 2003; Hartemink et al., 1997; Henri-Dubernet et

al., 2008). Enterococci, pediococci and lactobacilli were enumerated on acidified MRS (pH 5.5) (Carr et al., 2002; Randazzo et al., 2002). The kanamycin esculin azide agar medium (KEA, Sigma-Aldrich) was chosen for enterococci (Franciosi et al., 2009; Teuber, 1993). M17 and a PCA based-medium enriched with 10% of milk and supplemented with nalidixic acid (PCA-ATB) were used to enumerate lactococci (Corroler et al., 1998; Franciosi et al., 2009). *Leuconostoc* strains were enumerated on Mayeux Sandine and Elliker (MSE, AES Chemunex, Bruz) medium (Randazzo et al., 2002) and psychrotolerant lactic acid bacteria enumerated on MRS (pH 6.2) at 10 °C for 4 to 7 days (Teuber, 1993). Fungi were enumerated on yeast extract glucose chloramphenicol medium (yeast extract 0.5%; glucose 2%; chloramphenicol 100 mg/l) at 25 °C (Casalta et al., 2009). Depending on population tested, plates were incubated aerobically or in anaerobic jars at 10, 21, 30 or 37 °C for up to 7 days according to reference instructions. Cell counts were expressed as Log₁₀ CFU/ml of milk. After enumeration, four plates of each dilution were overlaid with the four tested fungi.

2.3. Preparation of yeast cell and mold spore suspensions

Four ubiquitous fungi, commonly encountered in cheese and yogurt spoilage (Caggia et al., 2001; Hayaloglu and Kirbag, 2007; Wouters et al., 2002) were chosen as indicator microorganisms for antifungal assays. The molds *Penicillium expansum* CBS 32.548NT and *Mucor plumbeus* CBS 129.41T came from the Culture Collection of Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, The Netherlands). The yeasts *Pichia anomala* LMSA 2.01.001 and *Cluyveromyces lactis* CLIB196 came from the "Souchothèque de Bretagne" culture collection (Université de Brest, Plouzané, France) and "Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique" (INRA, Thiverval-Grignon, France), respectively.

Molds were cultivated on potato dextrose agar (PDA, Difco, Le Pont de Claix, France) slants for a few days at 25 °C until spores were formed. Spores were then harvested with sterile distilled water supplemented with 0.1% Tween-80 and the suspension was spread on PDA in a Roux flask to increase spore production (Roy et al., 1996). Spores were harvested, enumerated using a Malassez cell and stock suspensions were standardized to a final concentration of 10⁷ spores/ml before storage at –80 °C in glycerol (10%, v/v).

Before use, yeasts were subcultured in a yeast extract and malt based medium (YEMA) composed of yeast extract (0.3%) and malt extract (2%) for 24 to 48 h at 25 °C. One hundred microliters of this suspension were inoculated in 10 ml of YEMA broth and incubated aerobically at 25 °C for 24 h. Cells were enumerated with a Malassez cell and the resulting suspension was standardized at a concentration of 10⁶ cells/ml in peptone water (0.1%). Yeast stocks were maintained at –80 °C in YEMA supplemented with glycerol (30%, v/v).

2.4. Antifungal activity assays

After enumeration of LAB, agar plates used for bacterial enumeration (except for the non-selective PCA medium) with less than 300 colonies were overlaid with 8 ml of PDA for molds or YEMA medium for yeasts (agar 0.8%) containing 10⁴ fungal spores or yeast cells per ml. Plates were then incubated at 25 °C and areas of inhibition recorded after 48 h (Magnusson and Schnürer, 2001). Active colonies showing clear inhibition area, were isolated on appropriated growth medium supplemented with amphotericin (5.6 mg/ml) (Sigma-Aldrich), followed by a minimum of three successive subcultures. A second antifungal activity assay was performed on purified isolates to confirm the first test. Active isolates were maintained in growth medium supplemented with glycerol (30%, v/v) at –80 °C.

2.5. Identification of antifungal isolates

Isolates were examined by phase-contrast microscopy, Gram stained and tested for the presence of catalase. For isolate identification, total DNA was extracted from 1.5 ml of pure culture obtained after 18 h incubation in MRS broth as described previously by Randazzo et al. (2002), and used as template for the 16S rRNA gene amplification with the pA/pH bacterial universal primers pair (Edwards et al., 1989; Zamfir et al., 2006). PCR amplicons were sequenced at the Biogenouest sequencing platform in the “Station Biologique de Roscoff” (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) and sequences were aligned on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (October 2010) for species assignment.

2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS Plus 5.1 package (Statistical Graphics Corp., VA, USA). A three-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare microbial counts on agar media and to assess the effects of animal species (A: cow, goat or ewe), periods of sampling (P: first, second or third), enumeration media and interactions between them. When significant effects were found, individual means were compared by one-way ANOVA using the Tukey's honestly significant difference (HSD) test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ level. Microbial counts on enumeration agar were expressed as means ($\log_{10}$ CFU/ml) of four replicates. Dependences between numbers of antifungal isolates were obtained by Chi Square test of independence under Microsoft® Office Excel 2003 software (Microsoft Office Professional Edition 2003). Statistical significance was set at $P < 0.05$ level for this test. Animals, periods of sampling, media, dilutions, fungal targets and taxa were considered as variables.

2.7. Lactobacilli biodiversity analyses

The diversity of lactobacilli was analyzed according to animals and sampling periods, by calculating the ratio (p_i) between number of antifungal *Lactobacillus* belonging to phylogenetic group i (n_i) and the total number of lactobacilli (N): $p_i = n_i/N$, for each animal-sampling period couple. Diversity was measured by the Shannon index (H) (Shannon and Weaver, 1963) using the following equation: $H = -\sum p_i \log_2(p_i)$. The higher the H index is, the greater the diversity.

Each animal-sampling period couple containing different numbers of *Lactobacillus* groups, the diversity within each animal-sampling period couple was also compared by calculating the equitability ($E = H/\log_2[S]$, with S being the number of *Lactobacillus* groups). The equitability can vary from 0 to 1, an E value equal to 0 means that one species clearly dominates among others, whereas an E value close to 1 indicates that individuals from each group have an equitable distribution.

3. Results

3.1. Microbial enumeration in milk

Mean total bacteria concentrations enumerated on non-selective media (PCA and Elliker) ranged from 4.7 ± 0.4 to $5.9 \pm 0.5 \log_{10}$ CFU/ml, whereas fungal concentrations were significantly lower ($P < 0.05$) and ranged from 3.5 ± 0.6 to $4.7 \pm 0.7 \log_{10}$ CFU/ml depending on animal and sampling periods (Table 1). Milk samples, whatever their origin, were dominated by LAB cocci such as presumptive lactococci (PCA-ATB) and *Leuconostoc* (MSE) (values $\geq 4.2 \log_{10}$ CFU/ml). Enterococci, *Lactobacillus* spp. and psychrotolerant LAB were present in significantly lower concentrations ($P < 0.05$). In most media, including fungal selective medium, cow milk samples harbored significantly lower plate counts ($P < 0.05$) than goat milk, and ewe milk counts lay in between. However, LAMVAB harbored significantly higher counts ($P < 0.05$) in cow and goat, compared to ewe milk samples. Consequently, the average count of lactobacilli from the three sampling periods, in cow and goat milk samples were 10 times higher than those of ewe milk samples ($P < 0.0001$). Sampling periods did not have a significant influence on bacterial populations except for *Lactobacillus* spp. Indeed, their concentration significantly increased on LAMVAB medium between the second and third sampling periods ($P < 0.0001$) in ewe milk samples.

3.2. Isolated antifungal lactic acid bacteria

3.2.1. Effect of milk origin, sampling periods and targeted fungi

Bacterial colonies grown on 8 different media and originating from 27 raw milk samples collected at three different sampling periods in three animal species were screened for their antifungal activity against four targeted fungi. Among the 71,833 tested colonies, 1235 colonies (i.e. 1.7% of tested colonies) showed a detectable antifungal activity and were subsequently isolated. Most of the ALAB were

Table 1

Bacterial and fungal populations enumerated with plate counts ($\log_{10}$ CFU/ml) during the first, second and third sampling periods in ewe, goat and cow's milk samples.

		Bacteria									Fungi
		Elliker	PCA	M17	PCA ATB	MSE	MRS pH5.5	KEA	LAMVAB	MRS 10 °C	YEGC
Cow	P1	5.2 ^a	4.4 ^a	4.7 ^a	3.8 ^a	4.1 ^a	3.6 ^a	3.3 ^a	3.8 ^a	3.6 ^a	4.0 ^a
	P2	5.0 ^a	4.8 ^a	4.5 ^a	4.6 ^a	4.5 ^a	3.6 ^a	4.4 ^a	4.0 ^a	2.7 ^a	3.0 ^a
	P3	4.7 ^a	4.9 ^a	4.7 ^a	4.3 ^a	4.3 ^a	4.1 ^a	3.9 ^a	4.0 ^a	3.5 ^a	3.4 ^a
	M	4.9 ^A	4.7 ^A	4.6 ^A	4.2 ^A	4.3 ^A	3.8 ^{A*}	3.9 ^{A*}	3.9 ^{A*}	3.4 ^{AB*}	3.5 ^{A*}
Goat	P1	6.2 ^a	5.4 ^a	5.5 ^a	5.0 ^a	4.9 ^a	4.4 ^a	4.5 ^a	3.3 ^a	3.7 ^a	5.0 ^a
	P2	5.9 ^a	5.9 ^a	5.3 ^a	5.3 ^a	5.1 ^a	4.7 ^a	4.8 ^a	4.1 ^a	5.5 ^a	4.3 ^a
	P3	5.8 ^a	5.7 ^a	5.3 ^a	4.8 ^a	4.2 ^a	4.4 ^a	4.2 ^a	4.3 ^a	3.6 ^a	4.8 ^a
	M	5.9 ^B	5.5 ^A	5.4 ^B	5.0 ^B	4.7 ^A	4.5 ^A	4.5 ^{B*}	3.9 ^{A*}	4.1 ^{A*}	4.7 ^B
Ewe	P1	–	6.3 ^a	6.2 ^a	4.8 ^a	4.2 ^a	4.1 ^a	4.2 ^a	3.1 ^a	2.8 ^a	4.7 ^a
	P2	4.8 ^a	4.3 ^a	3.7 ^b	4.1 ^a	3.9 ^a	3.2 ^a	3.7 ^a	1.7 ^b	2.3 ^a	2.8 ^b
	P3	5.6 ^a	5.4 ^a	5.2 ^{ab}	5.2 ^a	4.8 ^a	5.2 ^a	4.8 ^a	4.8 ^c	4.1 ^a	4.2 ^a
	M	5.2 ^{AB}	5.4 ^A	5.0 ^{AB}	4.7 ^{AB}	4.3 ^A	4.2 ^{A*}	4.2 ^{AB}	3.2 ^{B*}	2.9 ^{B*}	4.1 ^{A*}
	A	0.04	0.05	0.04	0.04	0.1	0.07	0.003	0.0001	0.04	0.001
	P	0.4	0.4	0.01	0.7	0.9	0.05	0.07	0.0001	0.7	0.002
	AP	0.02	0.01	0.02	0.06	0.06	0.06	0.001	0.0001	0.1	0.5

Data are means of four plate count replicates for each sampling period (P1: first sampling period; P2: second sampling period and P3: third sampling period) in three animals (ewe, goat and cow). Data in bold are means of the three sampling periods for each animal species (M: mean values of P1, P2 and P3). ANOVA analysis was used to assess the effects of animal species (A), periods of sampling (P) and interactions between them (AP). Effects of sampling periods (P1, P2 and P3) on bacterial populations for each enumeration medium: values with different letters (small letters a, b and c) in a column are significantly different by Turkey Kramer–HSD test ($P < 0.05$). Effects of animal species (M) on bacterial populations for each enumeration medium: values with different letters (capital letters A, B) in a column are significantly different by Turkey Kramer–HSD test ($P < 0.05$). Plate counts significantly different from PCA and Elliker counts in a row (data in bold) at the significance level: * $P < 0.05$.

recovered from cow (49%) and goat (43%) milk, whereas only 8% were recovered from ewe's milk. A dramatic increase in the total number of active colonies was observed between the second and third sampling periods for cow (167 vs. 282 active colonies) and goat (102 vs. 321 active colonies), but not for ewe's milk (25 vs. 31 active colonies). Overall, around 50% of total antifungal isolates were recovered during the third sampling period.

Among the 4 targeted fungi, *P. expansum* was inhibited by the greatest number of isolates with 599 isolates representing 48.5% of total isolates. *M. plumbeus* was the second most frequently inhibited fungus with 378 isolates (30.6% of total isolates), *K. lactis* and *P. anomala* were inhibited by much less isolates with a total recovery of 150 (12.1% of total isolates) and 108 isolates (8.7% of total isolates), respectively. According to the Chi Square test of independence, isolates active against *M. plumbeus* were overrepresented ($P < 0.05$) in cows and goat's milks during the third sampling period, those active against *K. lactis* were overrepresented ($P < 0.05$) in goat and cow milks during the first and second sampling periods, respectively, whereas isolates active against *P. anomala* were overrepresented ($P < 0.05$) in goat and cow milks in the second sampling period (Table 2). Active colonies were found in the same proportions in cow and goat milk samples with 49 and 46% of isolates active against *P. expansum*, 31 and 32% against *M. plumbeus*, and 13 and 12% against *K. lactis*, respectively. Isolates active against *P. anomala* were less numerous in cow's milk than in goat's milk (7% vs. 12%). In ewe's milk, the distribution pattern of active isolates was different from that of cow and goat's milks. A much lower number of isolates was recovered from ewe milk and the number of isolates was equally distributed in the three sampling periods. Moreover, the active isolates mainly showed antifungal activities against *P. expansum*.

3.2.2. Effect of medium on antifungal activity

Eighty six percent of the 1235 isolates came from the three MRS-based media, e.g., LAMVAB (605 isolates), MRS-5.5 (355 isolates) and MRS-10 °C (97 isolates). The remaining 178 isolates were obtained from the five other overlaid media (Elliker, M17, KEA, PCA-ATB and MSE). LAMVAB, MRS-5.5 and MRS-10 °C showed 5.5%, 3% and 1% of active colonies, respectively among ca 11,000 screened colonies for each medium. Differences were noticed in the same medium according to milk origin, sampling period and targeted fungus. The percentages of active colonies were systematically higher in cow's milk than in goat's milk for LAMVAB (9.5 vs. 5.6%) and MRS-5.5 (4.9 vs. 2.3%) media but not in MRS-10 °C (0.7 vs. 1.2%). When referring on sampling periods, an increase in the percentages of active colonies was observed for cow (plus 10 to 210%) and goat (plus 160 to 230%) milks, between the second and third sampling periods on LAMVAB and MRS-5.5, but not on MRS-10 °C. Ewe's milk showed a very different pattern to that of cow and goat milks with low percentages of active colonies for the three MRS-based media ($1.5 \pm 0.3\%$)

whatever the sampling period, despite a significant increase in lactobacilli concentrations.

3.3. Identification of isolates active against *M. plumbeus*, *K. lactis* and *P. anomala*

Because of the high number of isolates active against *P. expansum*, only isolates active against *M. plumbeus* (417 isolates), *K. lactis* (186 isolates) or *P. anomala* (130 isolates) were sequenced. Among them, 690 isolates (94%) belonged to *Lactobacillus*, 26 (3.6%) to *Leuconostoc*, 12 (1.7%) to *Enterococcus* and 2 (0.3%) to *Lactococcus* genera. The vast majority (92%) of antifungal lactobacilli were isolated on MRS-based media, the 8% remaining were isolated on MSE, KEA and PCA-ATB. *Leuconostoc* spp. were isolated on MRS-10 °C and MSE, and *Enterococcus* spp. on KEA and MSE. Surprisingly, the 2 isolates of *Lactococcus* spp. were not recovered on PCA-ATB nor Elliker media, but on MSE and MRS-5.5.

The 690 antifungal isolates belonging to the *Lactobacillus* genus were ranked into eight phylogenetic groups according to Felis and Dellaglio (2007) and Canchaya et al. (2006) classifications. The majority of them belonged to the *Lb. casei* group (55%), followed by *Lactobacillus reuteri* (19%), *Lb. plantarum* (17%) and *Lactobacillus buchneri* (7%) groups. The remaining 2% belonged to the *Lb. delbrueckii*, *perolens*, *salivarius* or *coryniformis* groups.

Isolates from the *Lb. casei* group were overrepresented ($P < 0.05$) on LAMVAB, during the third sampling period in both cow and goat milks, and among populations targeting *M. plumbeus* (Tables 3 and 4). A very similar pattern was observed for the *Lb. reuteri* group that was overrepresented on LAMVAB, in goat milk from the third sampling period and among populations targeting *M. plumbeus*. As for the *Lb. plantarum* group, that was overrepresented on MRS-10 °C in the first sampling period for goat and second sampling period for cow, and among populations targeting *K. lactis*, whereas the *Lb. buchneri* group was overrepresented on MRS-5.5 during the second sampling period in milk's cow and populations targeting *P. anomala*.

The diversity of antifungal *Lactobacillus* groups differed according to animal species and sampling periods (Table 5). Ewe milk harbored the smallest diversity compared to goat and cow milks with H index varying from 0.0 to 1.5 compared to 1.1 to 1.8 and 1.3 to 1.8 for cow and goat milks, respectively. A transient increase in lactobacilli diversity was however observed for all tested animals between the first and second sampling periods before decreasing in the third sampling period. With the exception of the first period of sampling in ewe characterized by an overrepresentation of the *Lactobacillus casei* group, no *Lactobacillus* group clearly dominated according to E values (Table 5).

4. Discussion

Facing the need for protective cultures adapted to dairy products, we wondered whether milk could be a natural reservoir of ALAB. This study aimed at giving an overview of ALAB communities present in raw milk collected over one-year from three different dairy animals (cow, goat and ewe) in three restricted geographic areas of France.

Table 2

Numbers of antifungal lactic acid bacteria isolates according to animals, sampling periods and targeted fungi.

Animals	Sampling periods	Targeted fungi			
		<i>P. expansum</i>	<i>M. plumbeus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>P. anomala</i>
Ewe	First	18 (+6)	6 (−2)	1 (−2)	0 (−2)
	Second	33 (+12)	8 (−5)	3 (−2)	0 (−4)
	Third	12 (−3)	10 (+1)	5 (+1)	4 (+1)
Cow	First	118 (+45)	21 (−25)	12 (−6)	0 (−13)
	Second	53 (−28)	48 (−3)	31 (+11)	35 (+20)
	Third	102 (−35)	120 (+34)	26 (−8)	34 (+9)
Goat	First	58 (+4)	19 (−15)	23 (+10)	11 (+1)
	Second	45 (−4)	27 (−4)	9 (−3)	21 (+12)
	Third	160 (+4)	119 (+20)	40 (+1)	3 (−25)

Data in brackets represent the differences between obtained values and that predicted with the Chi test of independence. Data in bold are significantly overrepresented in comparison to predicted values ($P < 0.05$).

Table 3

Numbers of antifungal *Lactobacillus* spp. isolates according to their targeted fungi.

Targeted fungi	<i>Lactobacillus</i> phylogenetic groups			
	<i>casei</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>buchneri</i>
<i>P. anomala</i>	62 (−9)	20 (−4)	26 (+5)	18 (+8)
<i>K. lactis</i>	88 (−12)	33 (−1)	47 (+17)	10 (−3)
<i>M. plumbeus</i>	230 (+21)	75 (+5)	42 (−21)	23 (−5)

Data in brackets represent the differences between obtained values and that predicted with the Chi test of independence. Data in bold are significantly overrepresented in comparison to predicted values ($P < 0.05$).

Table 4Numbers of antifungal *Lactobacillus* spp. isolates according to animals and sampling periods.

Animals	Sampling periods	<i>Lactobacillus</i> phylogenetic groups			
		<i>casei</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>buchneri</i>
Ewe	First	2 (+1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Second	2 (−1)	0 (−1)	1 (0)	3 (+3)
	Third	10 (0)	0 (−3)	8 (+5)	0 (−1)
Cow	First	24 (+5)	0 (−6)	6 (0)	3 (+1)
	Second	33 (−30)	10 (−11)	54 (+35)	15 (+7)
	Third	121 (+24)	32 (−1)	6 (−23)	13 (0)
Goat	First	21 (−6)	6 (−3)	19 (+11)	2 (−2)
	Second	65 (+1)	21 (−1)	19 (0)	9 (0)
	Third	102 (+7)	59 (+27)	2 (−27)	6 (−7)

Data in brackets represent the differences between obtained values and that predicted with the Chi test of independence. Data in bold are significantly overrepresented in comparison to predicted values ($P < 0.05$).

In a first step, total and lactic acid bacteria (LAB) populations were enumerated, for the three animals during the three sampling periods, on common non selective and LAB semi-selective media. Total bacterial concentration was significantly higher in goat's milk compared to cow's milk, whereas concentration of total bacteria in ewe's milk lay in between. Milk samples, whatever their origin were dominated by Gram-positive catalase-negative cocci (presumptive lactococci and *Leuconostoc*), whereas enterococci and lactobacilli were present in significantly lower concentrations.

Antimicrobial activities depend on microbial community composition as well as environment and growth conditions (Pfeiler and Klaenhammer, 2007; Rouse et al., 2008; Schillinger and Villarreal, 2010). Milk samples, targeted fungi and enumeration media used for ALAB screening were then chosen to provide the highest LAB biodiversity. Significant differences in antifungal activities were observed according to sampling periods, targeted fungi, growth media and milk origins. *P. expansum* was the most frequently inhibited fungus (3% of screened colonies), followed by *M. plumbeus* (2%), *K. lactis* (0.9%) and *P. anomala* (0.6%). Low occurrence of LAB active against *P. anomala* has already been observed by Magnusson et al. (2003) who did not find any active LAB against *P. anomala* over 1200 LAB strains tested on MRS agar. In contrast, *P. expansum* is described as a sensitive target for antifungal activity screening by Hassan and Bullerman (2008). Such difference may be due to their sensitivity to lactic and acetic acids. *P. expansum* is sensitive to organic acids (Dalié et al., 2010), whereas *P. anomala* can tolerate high concentrations of them (Lind et al., 2005).

In this study, the vast majority (1057 over 1235) of active colonies were recovered on MRS based-media in the third sampling periods, with the highest frequency found on LAMVAB–pH 5 (5.5% of screened colonies), followed by MRS–pH 5.5 (3% of screened colonies) and MRS–pH 6.6 (1% of screened colonies). Indeed, it is known that sodium acetate, present in MRS agar, increases antifungal

activity of LAB and that acidic pH potentiate its effect (Lind et al., 2005; Stiles et al., 2002; Schillinger and Villarreal, 2010). No clear explanation can be drawn for the increase in the percentage of active colonies observed between the second and third sampling periods in cow and goat milks for LAMVAB and MRS-5.5 media. This increase was probably not linked to animal physiology because it was not observed in ewes (in end lactation during the third sampling period, like goats) and that cow's parturition was not synchronized, but rather to feeding and/or seasonal changes since the second sampling period occurred in June, and the third in fall for both goats and cows.

Among the 733 sequenced isolates, 94% belonged to the *Lactobacillus* genus, whereas other LAB, such as *Leuconostoc* or enterococci, able to grow on MRS-based media and strongly represented in tested milks, accounted for less than 4% of active colonies. This suggests that strains of the *Lactobacillus* genus, despite their relatively low proportion in the raw milks tested, were more capable to inhibit fungi than *Enterococcus* and *Leuconostoc* spp. Such finding confirms literature data showing that most ALAB strains belong to the *Lactobacillus* genus (Schnurer and Magnusson, 2005; Valerio et al., 2009; Voulgaris et al., 2010).

Among the antifungal *Lactobacillus*, targeted fungal species differed according to the *Lactobacillus* group tested, whose presence largely depended on the period of sampling and milk origin. Lactobacilli were ranked into eight phylogenetic groups with 98% of them belonging to four phylogenetic *Lactobacillus* groups, namely *casei*, *reuteri*, *plantarum* and *buchneri*. Their occurrence was linked to their relative abundance in milk samples with *Lb. casei* overrepresented in the 100-fold dilutions in tested selective media, and frequently described as major *Lactobacillus* group in raw milk, as well as *Lb. plantarum* group (Franciosi et al., 2009; Medina et al., 2001). When these groups were assigned to different targeted fungi, certain specificity was observed. *Lb. casei* and *Lb. reuteri* groups were over-represented in ALAB population targeting *M. plumbeus*, while the *Lb. plantarum* group in ALAB population targeted *K. lactis*, and the *Lb. buchneri* group in ALAB population were active against *P. anomala*. The antifungal mechanisms of action of these *Lactobacillus* spp. are presently not elucidated, but their apparent specialization may be linked to the organic acids and/or ethanol produced and the sensitivity of targeted fungi to these molecules. The fact that very few homofermentative antifungal lactobacilli were isolated from milk, suggests that acetic acid production certainly played a role in antifungal activity of the recovered strains. However, it was not the only produced antifungal molecule. Analyses of organic acid production of several isolates showed that certain strains produced other antifungal molecules such as phenyllactic, 2-pyrrolidone-5-carboxylic acids or caproic acid. It is then not excluded that a mixture of molecules such as hydrogen peroxide, carbon dioxide, fatty acids or low-molecular-weight compounds (2-pyrrolidone-5-carboxylic, phenyllactic and 4-hydroxyphenyllactic acids and cyclic dipeptides) were implicated, as for example in the few ALAB targeting *P. anomala* that is highly resistant to both lactic and acetic acids. The diversity as well as the number of active isolates between animals and sampling periods is difficult to explain, but this is probably linked

Table 5Pi values for each *Lactobacillus* group according to animals and sampling periods. Shannon index (H) and Equitability (E) for each animal relative to a sampling period.

Animals	Sampling periods	<i>Lactobacillus</i> phylogenetic groups								H	E
		<i>casei</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>buchneri</i>	<i>delbrueckii</i>	<i>perolens</i>	<i>salivarius</i>	<i>coryniformis</i>		
Ewe	First	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Second	0.33	0.00	0.17	0.50	0.00	0.00	0.00	0.00	1.46	0.49
	Third	0.56	0.00	0.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99	0.33
Cow	First	0.73	0.00	0.18	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	0.54
	Second	0.29	0.09	0.47	0.13	0.00	0.02	0.00	0.00	1.82	0.61
	Third	0.68	0.18	0.03	0.07	0.01	0.01	0.01	0.01	1.49	0.45
Goat	First	0.44	0.13	0.40	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	1.62	0.37
	Second	0.55	0.18	0.16	0.08	0.02	0.02	0.00	0.00	1.82	0.61
	Third	0.59	0.34	0.01	0.03	0.02	0.00	0.00	0.00	1.35	0.50

to environmental and feeding conditions. The use or not of silage, which was absent from the ewe's feed and not given in spring (second period of sampling) seems to be a possible source of ALAB (Kalač, 2011).

It appears from this study that raw milk from cow and goat, contrary to ewe's milk can be considered as reservoir of ALAB. Majority of antifungal isolates belonged to the *Lactobacillus* genus. This genus is certainly one of the most active against fungi among LAB found in raw milk. Further studies are actually performed in our laboratory to test the potential antifungal effect of different *Lactobacillus* spp. in fermented dairy products and to elucidate their mechanism of action.

Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of the French National Agency for Research (ANR): program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), and the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 278–285.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50, 1–17.
- Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P., 2001. Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *International Journal of Food Microbiology* 71, 71–73.
- Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., Montel, M.C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 547–560.
- Canchaya, C., Claesson, M.J., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D., O'Toole, P.W., 2006. Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology* 152, 3185.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology* 28, 281–370.
- Casalta, E., Sorba, J.M., Aigle, M., Ogier, J.C., 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology* 133, 243–251.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait* 83, 269–306.
- Corrolier, D., Mangin, I., Desmases, N., Gueguen, M., 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4729.
- Dalié, D., Deschamps, A., Richard-Forget, F., 2010. Lactic acid bacteria—potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* 21, 370–380.
- De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., Vandamme, E.J., 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research* 159, 339–346.
- Drakoularakou, A.P., Kehagias, C., Karakanas, P., Koulouris, S., Timbis, D., 2003. A study of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in bovine, ovine and caprine milk. *International Journal of Dairy Technology* 56, 59–61.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17, 7843.
- Felis, G.E., Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8, 44.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* 19, 3–11.
- Gaya, P., Babín, M., Medina, M., Nunez, M., 1999. Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology* 87, 849–855.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G., Font de Valdez, G., 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20, 144–148.
- Hartemink, R., Domenech, V., Rombouts, F., 1997. LAMVAB—a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* 29, 77–84.
- Hassan, Y.I., Bullerman, L.B., 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology* 121, 112–115.
- Hayaloglu, A., Kirbag, S., 2007. Microbial quality and presence of moulds in Kufli cheese. *International Journal of Food Microbiology* 115, 376–380.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., 2004. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14, 467–494.
- Henri-Dubernet, S.H.D.S., Desmases, N.D.N., Guéguen, M.G.M., 2008. Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 54, 218–228.
- Huis in't Veld, J.H.J., 1996. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* 33, 1–18.
- Kagkli, D.M., Vancannet, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M., 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* 114, 243–251.
- Kalač, P., 2011. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. *Food Chemistry* 125, 307–317.
- Lind, H., Jonsson, H., Schnurer, J., 2005. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* 98, 157–165.
- Magnusson, J., Schnürer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain S13 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J., Schnürer, J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 219, 129–135.
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281–295.
- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S., Oliver, G., 2001. Characterization of the lactic acid bacteria in ewes milk and cheese from northwest Argentina. *Journal of Food Protection* 64, 559–563.
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F., 2001. La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait* 81, 575–592.
- Mofredj, A., Bahloul, H., Chanut, C., 2007. *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Médecine et Maladies Infectieuses* 37, 200–207.
- Nelson, C.E., 1993. Strategies of mold control in dairy feeds. *Journal of Dairy Science* 76, 898–902.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15, 546–553.
- Pitt, J., 2000. Toxicogenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin* 56, 184.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., Vaughan, E.E., 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1882.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F., Bräuer, M., 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Microbiology* 72, 370–376.
- Rossetti, L., Carminati, D., Zago, M., Giraffa, G., 2009. A qualified presumption of safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. *International Journal of Food Microbiology* 130, 70–73.
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A., Sinderen, D., 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* 104, 915–923.
- Roy, U., Batish, V., Grover, S., Neelakantan, S., 1996. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology* 32, 27–34.
- Schillinger, U., Villarreal, J.V., 2010. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* 21, 107–111.
- Schnurer, J., Magnusson, J., 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16, 70–78.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1963. *The Mathematical Theory of Communication*. The University of Illinois Press, Urbana, USA.
- Smith, J., Hong-Shum, L., 2003. *Food Additives Data Book*. Wiley Online Library.
- Stiles, J., Penkar, S., Plocková, M., Chumchalova, J., Bullerman, L., 2002. Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protection* 65, 1188–1191.
- Tailliez, P., 2004. Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques* 6, 35–41.
- Tantaoui-Elaraki, A., Khabbazi, N., 1984. Contamination éventuelle des fromages par les mycotoxines: une revue. *Le Lait* 64, 46–71.
- Teuber, M., 1993. Lactic acid bacteria. In: Rehm, S., Reed, G., Pihler, A., Stadler, P. (Eds.), *Biotechnology*, vol. 1. VCH Press, Weinheim, Germany, pp. 325–366.
- Torkar, K.G., Vengust, A., 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19, 570–577.
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., De Candia, S., 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. *Systematic and Applied Microbiology* 32, 438–448.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C., Montel, M.C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26, 305–310.
- Voulgaris, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* 21, 136–142.
- Wouters, J., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12, 91–109.
- Zamfir, M., Vancannet, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefeuvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L., 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 487–495.

CHAPITRE II

Diversité fongique dans des échantillons de lait de vache, de chèvre et de brebis

-

Fungal diversity in cow, goat and ewe milk

Emilie Delavenne, Jérôme Mounier, Katia Asmani, Jean-Luc Jany, Georges Barbier and Gwenaëlle Le Blay (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology* **151**, 247-251.

Le lait fournit à de nombreuses espèces de levures et de champignons filamenteux les conditions et les nutriments nécessaires à leur croissance. Leur présence et leur diversité dans le lait cru, comme pour les bactéries, sont le résultat de contaminations post-traite. Ces contaminations peuvent provenir de la peau des animaux, de leur environnement, et être influencées par l'état physiologique des animaux, les saisons et les conditions d'élevage (environnement de l'étable, équipement de traite, etc.) (Callon *et al.*, 2007).

La diversité fongique peut être évaluée par des méthodes phénotypiques (mise en culture, énumération et identification) (Corbo *et al.*, 2001 ; Lopandic *et al.*, 2006 ; Fadda *et al.*, 2010) et moléculaires (DGGE, SSCP) (Cocolin *et al.*, 2002 ; Callon *et al.*, 2006). Cependant, la plupart des méthodes utilisées ont des inconvénients. Certaines peuvent aboutir à des identifications erronées ou incomplètes, ou bien encore être extrêmement chronophages lorsqu'il faut cultiver, par exemple, les champignons à identifier. Dans cette étude, nous avons opté pour l'utilisation de la chromatographie liquide à haute-pressure en condition dénaturante (D-HPLC), une méthode qui a fait ses preuves dans l'évaluation de la diversité microbienne et notamment fongique dans divers écosystèmes et qui a l'avantage de permettre de récolter les fractions séparées et d'identifier les champignons présents par séquençage (Mounier *et al.*, 2010 ; Nieguitsila *et al.*, 2010 ; Maurice *et al.*, 2011). L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer, par D-HPLC, la diversité fongique dans des échantillons de laits crus de vache, de chèvre et de brebis, collectés à différentes périodes de l'année. Les matériels et méthodes sont détaillés dans la publication associée au chapitre II.

Résultats et discussion

La connaissance de la biodiversité fongique présente dans le lait cru peut être intéressante d'un point de vue technologique pour la fabrication des fromages et pour aider au maintien des bonnes pratiques d'hygiène. La région ITS1 a été choisie dans cette étude car il s'agit, sauf exceptions, d'une cible particulièrement bien adaptée pour l'identification des champignons. Les amorces utilisées dans cette étude pour amplifier cette région sont décrites comme universelles (White *et*

al., 1990). L'utilisation de la PCR-D-HPLC et les amorces choisies nous ont permis d'identifier 27 espèces différentes de champignons parmi les 9 échantillons de laits crus analysés. Parmi elles, 18 espèces de levures appartenant aux genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Malassezia*, *Pichia*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*, et 9 espèces de moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium* et *Torrubiella*. La méthode choisie a prouvé son efficacité puisque la majorité de ces espèces sont citées dans les études sur la diversité fongique du lait (Fleet, 1990 ; Corbo *et al.*, 2001 ; Lopandic *et al.*, 2006 ; Callon *et al.*, 2007).

Les laits de vache, présentant la plus faible concentration fongique moyenne ($3,3 \pm 0,2 \log_{10}$ UFC/ml), étaient ceux où la plus grande diversité fongique a été détectée (23 espèces différentes, réparties sur les trois périodes d'échantillonnage avec 15, 8 et 8 espèces, chronologiquement). Inversement, la diversité fongique s'est révélée bien plus faible dans les laits de chèvre, avec seulement 6 espèces différentes (3, 4 et 4 espèces sur chaque période d'échantillonnage). Les laits de brebis ont également présenté une faible diversité, avec 7 espèces différentes (1, 3 et 6 espèces aux trois périodes d'échantillonnage). Ces différences de diversité entre les trois animaux et les périodes d'échantillonnage sont probablement liées à l'environnement de l'animal et à son état physiologique (Callon *et al.*, 2007).

Quels que soient les échantillons, les levures étaient toujours majoritaires par rapport aux moisissures. Certaines espèces étaient retrouvées de façon sporadique dans les laits analysés. Mais, conformément à ce qui est retrouvé dans la littérature, les laits de vache et de chèvre étaient dominés par les espèces *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* et *Candida* spp. tandis que *Candida parapsilosis* était l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les laits de brebis (Corbo *et al.*, 2001 ; Cocolin *et al.*, 2002 ; Callon *et al.*, 2006). Cependant, certains genres moins communs (*Torrubiella*, *Malassezia*, *Engyodontium*) ont été détectés dans cette étude, tandis que d'autres espèces (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, etc.) couramment citées

dans la littérature n'y ont pas été retrouvées. Des concentrations trop faibles dans le lait ou des biais de PCR peuvent être incriminés. Notamment, les espèces du genre *Mucor* potentiellement présentes ne pouvaient peut-être pas être amplifiées avec les amorces choisies dans cette étude, car l'une d'elles ne s'hybridaient pas parfaitement avec l'ADNr 5,8S (données non présentées). Cette méthode a tout de même permis de détecter jusqu'à 15 espèces différentes dans un même échantillon, contenant moins de 10^4 UFC/ml, et incluant des champignons filamenteux, présents dans les échantillons de laits sous forme de spores.

Cette étude a mis en évidence des variations de communautés fongiques dans le lait en fonction de l'espèce laitière et de la période de l'année, avec une prédominance des espèces *G. candidum* dans les laits de vache et de chèvre et *C. parapsilosis* dans les laits de brebis. Des espèces fongiques technologiquement importantes telles que *G. candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* ou *K. marxianus* étaient présentes dans les laits de vache et de chèvre, tandis que les genres *Torrubiella* et *Malassezia* ont été détectés dans le lait pour la première fois.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Short communication

Fungal diversity in cow, goat and ewe milk

Emilie Delavenne, Jerome Mounier, Katia Asmani, Jean-Luc Jany, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay^{*}

Université Européenne de Bretagne, France

Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2011

Received in revised form 24 August 2011

Accepted 30 August 2011

Available online 7 September 2011

Keywords:

Milk

Fungi

D-HPLC

Cow

Ewe

Goat

ABSTRACT

Knowledge of fungal diversity in the environment is poor compared with bacterial biodiversity. In this study, we applied the denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC) technique, combined with the amplification of the ITS1 region from fungal rDNA, for the rapid identification of major fungal species in 9 raw milk samples from cow, ewe and goat, collected at different periods of the year. A total of 27 fungal species were identified. Yeast species belonged to *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Malassezia*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Trichosporon* genera; and mold species belonged to *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Torrubiella* genera. Cow milk samples harbored the highest fungal diversity with a maximum of 15 species in a single sample, whereas a maximum of 4 and 6 different species were recovered in goat and ewe milk respectively. Commonly encountered genera in cow and goat milk were *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida* spp. (*C. catenulata* and *C. inconspicua*); whereas *Candida parapsilosis* was frequently found in ewe milk samples. Most of detected species were previously described in literature data. A few species were uncultured fungi and others (*Torrubiella* and *Malassezia*) were described for the first time in milk.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Raw milk provides all necessary nutrients and conditions for growth of many fungal species, their occurrence is influenced by animal physiological state, weather and breeding conditions (Callon et al., 2007). Fungal diversity is commonly assessed using cultural methods and phenotypic-based identification that entail enumeration, isolation and identification, which are heavily time-consuming and may result in misidentification. Molecular methods such as denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) or single-strand conformation polymorphism (SSCP) are also used for fungal diversity assessment (Callon et al., 2006; Cocolin et al., 2002). Although each of these methods possesses positive aspects, they are not suitable for a high throughput identification of fungal communities. The ion-pair reverse-phase denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC) is a new community fingerprinting technique, which has been successfully used to investigate microbial diversity in various ecosystems such as the gut (Goldenberg et al., 2007), soil (Wagner et al., 2009), or dairy products (Ercolini et al., 2008); and more specifically to fungal communities

present in air (Niegutsila et al., 2010), wood decay (Maurice et al., 2011) and cheeses (Mounier et al., 2010).

In this study, we assessed the diversity of dominant fungi in raw milk samples from three different dairy species (cow, ewe and goat) collected at different periods of the year with D-HPLC, after PCR-amplification of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region.

2. Materials and methods

2.1. Raw milk samples

Nine raw milk samples were collected over the year 2009 from refrigerated collection tanks in three French restricted areas from Aveyron, Deux Sèvres and Ile-et-Vilaine. A total of 3 samples were collected from each zone in January (E1), April (E2) and July (E3) for ewes; February (G1), June (G2) and November (G3) for goats; and February (C1), June (C2) and September (C3) for cows. Milk samples were placed in sterile bottles, kept at 4 °C and immediately sent to the laboratory. Ten milliliters of each milk sample was serially diluted in peptone water (0.1%, pH 7), plated in quadruplicate on yeast extract glucose chloramphenicol (YEGC) agar and incubated at 25 °C for 72 h for fungal enumeration. Two milliliters was centrifuged for 10 min at 10,000 × g, the lipid phase and the supernatant were discarded, and the pellet was frozen in liquid nitrogen and conserved at –20 °C until DNA extraction.

^{*} Corresponding author at: Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France. Tel.: +33 298056110; fax: +33 298056101.

E-mail address: gwenaelle.leblay@univ-brest.fr (G. Le Blay).

Table 1
Optimized D-HPLC conditions for the identification of fungal species in raw milk using ITS1 as a target for PCR-amplification.

Gradient	D-HPLC conditions for collecting/sequencing of peak fractions ^a				D-HPLC conditions for purifying re-amplified peak fractions ^b		
	Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)	Buffer C (%)	Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
Loading	0	52	48		0	65	35
Start gradient	1	47	53		1	60	40
Stop gradient	20	37	63		9	20	80
Start clean	20.1	0	0	100	9.1	65	35
Stop clean	20.6	0	0	100	9.2	65	35
Start equilibrate	20.7	52	48		9.3	65	35
Stop equilibrate	21.7	52	48		9.4	65	35

Buffer A: 0.1 mol/L triethylammonium acetate; B: 0.1 mol/L triethylammonium acetate in 25% acetonitrile; C: 75% acetonitrile.

^a The program was run at 50 °C at a flow rate of 0.5 mL/min.

^b The program was run at 50 °C at a flow rate of 1.5 mL/min.

2.2. Total DNA extraction from milk samples

Total DNA was extracted from milk pellets stored at −20 °C, according to the method described by Cocolin et al. (2002) with some modifications applied before the phenol–chloroform extraction. Pellets were re-suspended in 470 µL of 1× TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) and incubated for 1 h at 37 °C after the addition of lysozyme (16 mg/mL), mutanolysin (200 U/mL) and lyticase (200 U/mL) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Then, 315 µL of 1× TE buffer supplemented with proteinase K (40 U/mL) and SDS (1%) was added and incubated again for 1 h at 55 °C. Cells were disrupted thrice by bead-beating using the FastPrep machine (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA). DNA quantity and purity were evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Labtech, Palaiseau, France).

2.3. PCR-amplification of the ITS1 region of total DNA extract from milk

A semi-nested PCR approach was used to amplify the ITS1 region of fungal DNA present in milk samples. The first PCR involved the use of two universal fungal primers, the ITS1-F (5'-CTTGGTCATTTA-GAGGAAGTAA-3') (Gardes and Bruns, 1993), and the LR5 (5'-ATCCT-GAGGGAACTTC-3') (Vilgalys and Hester, 1990), which generated a fragment of approximately 1.5 kb. The 50 µL PCR mix consisted of 1× GoTaq buffer, 0.2 mMol dNTP, 0.2 µMol of each primer, 2 mMol of MgCl₂, 1.25 U of GoTaq polymerase (Promega, Charbonnières, France) and 1 µL of template DNA. The PCR assay started by initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min. This first step resulted in the amplification of part of the 18S rRNA gene, the ITS1, the 5.8S rRNA gene, the ITS2, and part of the 26S rRNA gene.

The second PCR involved the use of primers ITS1-F and 5.8S (5'-CG CTGCGTTCATCATCG-3') (Vilgalys and Hester, 1990), and resulted in amplicon sizes ranging from 190 to 390 bp. The 50 µL PCR mix was similar to that described above, except that template DNA was 1 µL of 1:10 diluted PCR product. Cycling conditions were an initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 40 s, and a final extension at 72 °C for 5 min. This second PCR resulted in the amplification of part of the 18S rRNA gene, the ITS1 and part of the 5.8S rRNA gene. PCR products were verified on a 1% (w/v) agarose gel in 1× TBE buffer (40 mMol Tris–acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0).

2.4. D-HPLC analysis and sequencing of ITS1 amplicons

PCR products were separated by D-HPLC on the WAVE microbial analysis system (Transgenomic, Omaha, NE) and detected using a fluorescence detector after staining with the WAVE optimized HS staining solution (Transgenomic). Separation conditions are shown

in Table 1. Separation temperature was set at 50 °C and 5 µL of PCR products was injected for each run. Peak fractions were obtained by manually collecting drops representing the top of the peak during D-HPLC analyses. One microliter of each fraction was then used directly as template for re-amplification using the same primer pairs and conditions as described above, except that cycle number was set at 20 instead of 30. The resulting PCR product was verified on a 1% (w/v) agarose gel in 1× TBE buffer. When several bands of different sizes were obtained, the PCR product was loaded again on D-HPLC in non-denaturing conditions (Table 1). If more than a single peak was obtained, fraction collection and amplification were performed again. Amplicons were sequenced at the Biogenouest sequencing platform in the “Station Biologique de Roscoff” (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>) using primer ITS1-F. Sequences were compared to the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, December 2010) to determine the closest known relatives and alignments were performed using sequences from the NCBI database and the MEGA4 software (Tamura et al., 2007).

2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS plus 5.1 packages (Statistical Graphics Corp., VA, USA). Fungal concentration means were compared by one-way ANOVA using the Tukey's honestly significant difference (HSD) test. Statistical significance was set at $P < 0.05$ level. Microbial counts on enumeration agar were expressed as means ($\log_{10}$ CFU/mL) of four replicates.

3. Results

3.1. Fungal enumeration

Mean fungal concentrations from the three milk samples were slightly higher (not significant) for goat and ewe's milk with respectively 4.4 ± 0.5 and $4.4 \pm 0.3 \log_{10}$ CFU/mL, than for cow milk samples ($3.3 \pm 0.2 \log_{10}$ CFU/mL).

3.2. Assessment of fungal diversity using PCR-D-HPLC

To differentiate fungal populations within total DNA extracted from cow, ewe and goat raw milk, PCR-products from the ITS1 region of fungal rDNA were analyzed using optimized D-HPLC conditions (Table 1). Elution profiles for ewe, goat and cow milk are shown respectively in Figs. 1–3. For the specific assignment of peaks, fractions from each peak were retrieved and sequenced. This strategy allowed us to identify a total of 27 different fungal species among the 9 samples tested (Table 2). Three sequences recovered from ewe and cow's milk (E2, E3 and C2) were assigned to uncultured fungi, one matched as *Malassezia restricta* with only 84% of similarity (E2),

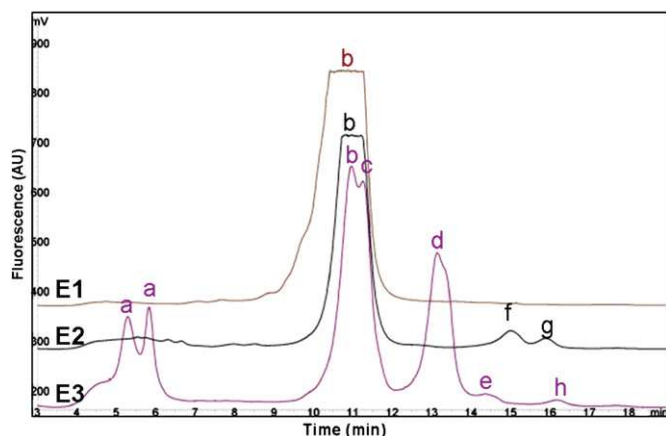


Fig. 1. D-HPLC analysis of the fungal diversity in raw ewe's milk sampled in January (E1), April (E2) and July (E3) (a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida parapsilosis*; c, *Rhodotorula mucilaginosa*; d, *Engyodontium album*; e, *Debaryomyces hansenii*; f, *Malassezia restricta*; g, Uncultured *Malassezia* sp.; h, Uncultured fungus clone).

whereas three peaks from goat milk (G1 and G2) and one from cow milk (C2) were not assigned because exploitable sequences could not be obtained after collecting/sequencing.

Among the 27 identified fungal species, the 18 yeast species belonged to 9 genera, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Malassezia*, *Pichia*, *Rhodotorula* and *Trichosporon* and the 9 mold species belonged to 7 genera, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Engyodontium*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Torribiella*.

The highest fungal diversity was found in cow milk with a total recovery of 23 different species (5 molds and 18 yeasts) whereas only 6 (1 mold and 5 yeasts) and 7 (1 mold and 6 yeasts) species were recovered in goat and ewe milk respectively.

The first cow milk sample (C1) showed the highest diversity with 15 different species, followed by the two other cow milk samples (C2 and C3) both showing 8 fungal species. Most species were recovered only once, whereas *Geotrichum candidum* was recovered from the three cow milk samples and 5 other species (*Candida catenulata*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Trichosporon lactis* and *Malassezia globosa*) were recovered from two milk samples. Species assigned to peaks with the highest relative areas were *G. candidum*, *C. catenulata*, *K. marxianus*, *K. lactis*, *Pichia fermentans* and *Candida sake*.

Goat milk samples harbored a stable fungal diversity among the three sampling periods with respectively 3, 4 and 4 fungal species recovered from G1, G2 and G3. A total of 6 different species were

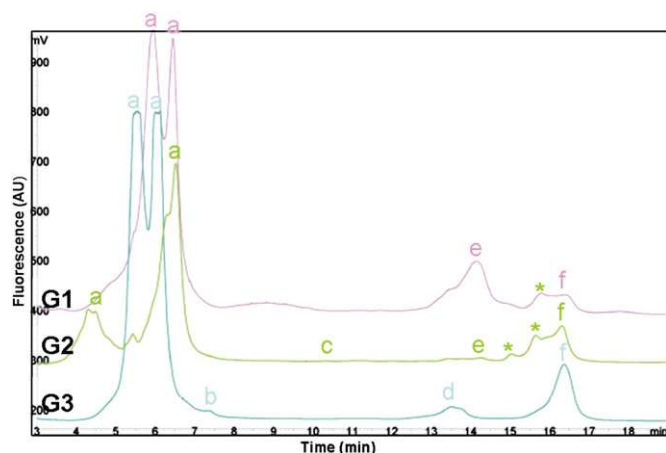


Fig. 2. D-HPLC analysis of the fungal diversity in raw goat's milk sampled in February (G1), June (G2) and November (G3) (a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida inconspicua*; c, *C. parapsilosis*; d, *Engyodontium album*; e, *Candida globosa/pseudoglobosa*; f, *Kluyveromyces marxianus*; * non-assigned peak).

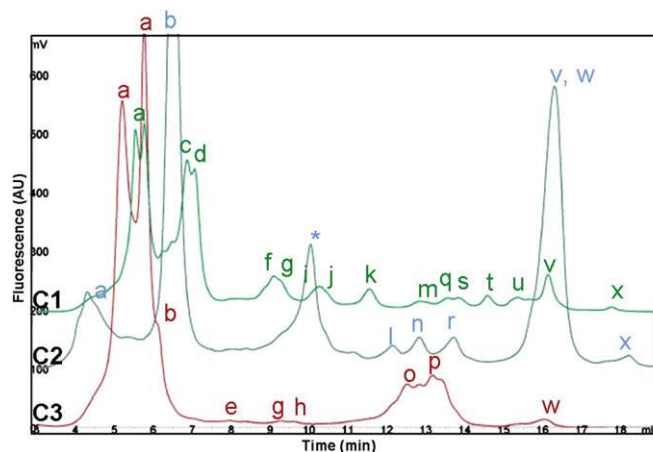


Fig. 3. D-HPLC analysis of the fungal diversity in raw cow's milk sampled in February (C1), June (C2) and September (C3) (a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida catenulata*; c, *Pichia fermentans*; d, *Candida sake*; e, *Candida inconspicua*; f, *Trichosporon cutaneum*; g, *Trichosporon lactis/caseorum*; h, *Cryptococcus curvatus*; i, *Cryptococcus victoriae*; j, *Cryptococcus carnescens*; k, *Cladosporium* sp.; l, *Fusarium merismoides*; m, *Penicillium glabrum*; n, Uncultured fungus clone; o, *Penicillium roqueforti*; p, *Engyodontium album*; q, *Aspergillus fumigatus*; r, *Torribiella* sp.; s, *Candida* sp.; t, *Debaryomyces hansenii*; u, *Malassezia restricta*; v, *Kluyveromyces marxianus*; w, *Kluyveromyces lactis*; x, *Malassezia globosa*; * non-assigned peak).

recovered (5 yeasts and 1 mold) with *G. candidum* and *K. marxianus* being recovered in each goat milk sample, and *C. globosa* in two milk samples (G1 and G2). Interestingly, they also had the highest relative area peaks. Fungal species assigned to goat milk were all retrieved from either cow or ewe milk samples.

Ewe milk samples showed a slightly different fungal diversity with respectively 1, 3 and 6 species recovered from E1, E2 and E3 samples. A total of 7 different species were recovered (6 yeasts and 1 mold) with *Candida parapsilosis* being the only species recovered from the three samples and showing the highest relative peak area, followed by *Rhodotorula mucilaginosa*, *Engyodontium album* and *G. candidum*. *Chrysosporium carmichaeli* and *R. mucilaginosa* were only detected in ewe milk samples. The others were also detected in cow or goat milk samples.

While certain species occurred sporadically in cow or goat milk, the most common species among the 9 milk samples were *G. candidum*, *K. marxianus* and *Candida* spp. such as *C. parapsilosis*.

4. Discussion

Compared to bacterial diversity, few authors have studied the composition of fungal communities in raw milk, even though the knowledge of fungal contaminants in raw milk may be of interest for the maintenance of high hygienic practices as well as the monitoring of fungi with technological interest for cheese-making. New molecular techniques such as D-HPLC are emerging for the rapid assessment of microbial communities in various ecosystems. Mounier et al. (2010) previously showed that D-HPLC was a convenient method for the identification of yeasts in smear cheese surfaces. In this study, we applied D-HPLC for the rapid detection and identification of fungi in raw milk from cow, ewe and goat. In order to discriminate a maximum of fungal species with D-HPLC, a semi-nested PCR approach was chosen for the amplification of the ITS1 region of fungal DNA. The ITS region has been promoted as a fungal barcode because of its high copy number, phylogenetic utility, and availability of universal primers (White et al., 1990). This region, including the ITS1 region has been previously selected for molecular fingerprinting of fungal communities using D-HPLC in wood decay (Maurice et al., 2011). It should however be noted that the ITS1 region is not highly resolving within certain fungal groups such as the *Penicillium* genus (Seifert et al., 2007), moreover the primers used in

Table 2

Fungal diversity in raw milk from ewe, goat and cow during one year-period determined after collecting/sequencing of D-HPLC peak fractions.

D-HPLC peak ^a	Accession number	Closest phylogenetic affiliation in the GenBank/EMBL/DBJ/PDB databases (accession number)	% similarity	Size estimation (bp)
<i>Ewe's milk</i>				
E1-b	HQ646025	<i>Candida parapsilosis</i> (FJ872015)	100	268
E2-b	HQ646022	<i>Candida parapsilosis</i> (FJ872015)	100	268
E2-f	HQ646023	<i>Malassezia restricta</i> (GU291270)	100	350
E2-g	HQ646024	<i>Malassezia restricta</i> (GU291270)	84	345
E3-a	HQ646016	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	99	186
E3-b	HQ646017	<i>Candida parapsilosis</i> (FN652300)	100	268
E3-c	HQ646020	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (EU149812)	100	271
E3-d	HQ646018	<i>Engyodontium album</i> (HQ115665)	100	300
E3-e	HQ646021	<i>Debaryomyces hansenii</i> (GU246256)	100	317
E3-h	HQ646019	<i>Chrysosporium carmichaeli</i> (AJ007842)	84	354
<i>Goat's milk</i>				
G1-a	HQ646034	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	100	186
G1-e	HQ646035	<i>Candida globosa</i> (FM178351)/ <i>Candida pseudoglobosa</i> (DQ41711)	99	313
G1-f	HQ646036	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (GU256755)	99	350
G2-a	HQ646030	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	98	186
G2-c	HQ646031	<i>Candida parapsilosis</i> (FJ872014)	100	268
G2-e	HQ646032	<i>Candida globosa</i> (FM178351)/ <i>Candida pseudoglobosa</i> (DQ41711)	97	313
G2-f	HQ646033	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (GU256755)	100	350
G3-a	HQ646026	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	100	186
G3-b	HQ646027	<i>Candida inconspicua</i> (AM745303)	99	207
G3-d	HQ646028	<i>Engyodontium album</i> (HQ115665)	100	300
G3-f	HQ646029	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (GU256755)	100	350
<i>Cow's milk</i>				
C1-a	HQ645985	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	100	186
C1-c	HQ645986	<i>Pichia fermentans</i> (GQ458040)	100	205
C1-d	HQ645987	<i>Candida sake</i> (AJ549822)	100	209
C1-f	HQ645988	<i>Trichosporon cutaneum</i> (FJ943422)	97	235
C1-g	HQ645989	<i>Trichosporon lactis</i> (AJ319759)/ <i>Trichosporon caseorum</i> (AJ319758)	98	241
C1-i	HQ645990	<i>Cryptococcus victorae</i> (AF444645)	100	252
C1-j	HQ645991	<i>Cryptococcus carnescens</i> (GU237051)	98	254
C1-k	HQ645992	<i>Cladosporium</i> sp. (FR667968)	99	273
C1-m	HQ645993	<i>Penicillium glabrum</i> (GU981567)	99	291
C1-q	HQ645994	<i>Aspergillus fumigatus</i> (GU594756)	99	317
C1-s	HQ645995	<i>Candida globosa</i> (FM178351)/ <i>Candida pseudoglobosa</i> (DQ41711)	96	313
C1-t	HQ645996	<i>Debaryomyces hansenii</i> (GU246256)	100	317
C1-u	HQ645997	<i>Malassezia restricta</i> (GU291270)	99	345
C1-v	HQ645998	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (GU256755)	100	350
C1-x	HQ645999	<i>Malassezia globosa</i> (AY387134)	98	387
C2-a	HQ646000	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	100	186
C2-b	HQ646001	<i>Candida catenulata</i> (GU246267)	100	191
C2-l	HQ646002	<i>Fusarium merismoides</i> var. <i>merismoides</i> (EU860057)	100	280
C2-n	HQ646003	Uncultured fungus clone B5F31 (GU073031)	99	284
C2-r	HQ646004	<i>Torrubiella</i> sp. (FN597572)	100	300
C2-v	HQ646006	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (AY139785)	97	350
C2-w	HQ646005	<i>Kluyveromyces lactis</i> (GQ376079)	100	346
C2-x	HQ646007	<i>Malassezia globosa</i> (AJ437693)	100	387
C3-a	HQ646008	<i>Geotrichum candidum</i> (GQ458022)	100	186
C3-b	HQ646009	<i>Candida catenulata</i> (GU246267)	98	191
C3-e	HQ646010	<i>Candida inconspicua</i> (AM745303)	99	207
C3-g	HQ646012	<i>Trichosporon lactis</i> (AJ319759)/ <i>Trichosporon caseorum</i> (AJ319758)	99	241
C3-h	HQ646011	<i>Cryptococcus curvatus</i> (AB520686)	100	231
C3-o	HQ646014	<i>Penicillium roqueforti</i> (GQ458035)	99	292
C3-p	HQ646013	<i>Engyodontium album</i> (HQ115665)	100	300
C3-w	HQ646015	<i>Kluyveromyces lactis</i> (GQ376079)	100	346

^a See legends from Figs. 1–3 for species assignment of D-HPLC peak fractions from ewe, goat and cow's milk, respectively; 1: first sampling period, 2: second sampling period, 3: third sampling period; E: ewe's milk; G: goat's milk; C: cow's milk.

the present study may not allow the amplification of the ITS1 region of all fungal species such as *Mucor* spp. for which the 5.8S primer does not perfectly match to the 5.8S rDNA (data not shown). However, it allowed us to recover 27 different fungal species with the same D-HPLC condition.

Among these 27 fungal species, three sequences belonged to uncultured fungal species and up to 15 species were discriminated in one sample (C1). The cow milk sample recovered in February (C1) harbored the highest fungal diversity, whereas the fungal concentration was slightly lower than in ewe and goat milk. Differences in fungal diversity among the different animal species and sampling periods can be explained by animal's environment and physiological state (Callon

et al., 2007). Among the 9 milk samples tested, the number of yeasts recovered per sample systematically exceeded the number of molds. Fungal species richness varied from 1 to 15 per sample, the most commonly encountered genera in cow and goat milk were *G. candidum*, *K. marxianus* and *Candida* spp. (*C. catenulata* and *C. inconspicua*), whereas *C. parapsilosis* dominated in ewe milk. These observations are in accordance with previous studies on the fungal diversity of raw milk from cow, goat or ewe either using cultural (Corbo et al., 2001) or molecular (DGGE, SSCP) methods (Callon et al., 2006; Cocolin et al., 2002). However, a few species belonging to *Torrubiella*, *Malassezia* or *Engyodontium* genera were much more unusual. *Torrubiella* sp. is a pathogen of insects and arthropods (Johnson et al., 2009), *M. restricta*

usually colonizes the skin of mammals and birds, and has already been isolated in cows (Crespo et al., 2002). The detection of *E. album* was due to contamination from proteinase K used for DNA extractions. Alternatively, some species commonly cited in literature (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Pichia guilliermondii*, *Yarrowia lipolytica* and *Candida intermedia* for example) were not detected here.

Several fungal species may not have been detected because of their low counts in milk samples and/or PCR biases encountered in such molecular fingerprinting techniques. It is generally accepted that PCR-DGGE has a detection limit of 10^4 CFU/mL in food matrices (Ercolini, 2004). This detection limit depends on DNA yield that may vary according to species and fungal spores which are difficult to detect at low population (Doare-Lebrun et al., 2006). In the present study we were able to detect up to 15 fungal species in samples containing fungal counts below 10^4 CFU/mL including filamentous fungi, which were likely to occur as spores in milk samples.

The present study showed variations in milk fungal communities according to dairy species and time of year with predominance of *G. candidum* in cow and goat milk, and *C. parapsilosis* in ewe milk. Fungal species of technological importance such as *G. candidum*, *Debaryomyces hansenii*, *K. lactis* or *K. marxianus* were present in both cow and goat milk, whereas *Torribiella* and *Malassezia* genera were detected for the first time in milk.

Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of the French National Agency for Research (ANR): program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), and the French Ministry of Higher Education and Research.

References

- Callon, C., Delbes, C., Duthoit, F., Montel, M.C., 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 172–180.
- Callon, C., Duthoit, F., Delbes, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Cremoux, R., Montel, M.C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 547–560.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12, 407–411.
- Corbo, R.M., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M., 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* 69, 147–152.
- Crespo, M.J., Abarca, M.L., Cabanes, F.J., 2002. Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. *Mycoses* 45, 333–337.
- Doare-Lebrun, E., El Arbi, A., Charlet, M., Guerin, L., Pernelle, J.J., Ogier, J.C., Bouix, M., 2006. Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis — potentialities and limits of the method. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1340–1350.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56, 297–314.
- Ercolini, D., Friso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., Coppola, S., 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 124, 164–170.
- Gardes, M., Bruns, T., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2, 113–118.
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Marjoram, G., Noyer-Weidner, M., Hong, G., Bereswill, S., Gobel, U.B., 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *Journal of Microbiological Methods* 68, 94–105.
- Johnson, D., Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Luangsa-Ard, J.J., Bischoff, J.F., Kepler, R.M., Spatafora, J.W., 2009. Systematics and evolution of the genus *Torribiella* (*Hypocreales*, *Ascomycota*). *Mycological Research* 113, 279–289.
- Maurice, S., Le Floch, G., Bras-Quere, M., Barbier, G., 2011. Improved molecular methods to characterise *Serpula lacrymans* and other *Basidiomycetes* involved in wood decay. *Journal of Microbiological Methods* 84, 208–215.
- Mounier, J., Le Blay, G., Vasseur, V., Le Floch, G., Jany, J.L., Barbier, G., 2010. Application of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for yeasts identification in red smear cheese surfaces. *Letters in Applied Microbiology* 51, 18–23.
- Nieguitsila, A., Goldenberg, O., Deville, M., Arne, P., Benoit-Valiergue, H., Chermette, R., Latouche-Cottenot, S., Pissard, S., Guillot, J., 2010. Molecular monitoring of fungal communities in air samples by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC). *Journal of Applied Microbiology* 109, 910–917.
- Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Levesque, C.A., Moncalvo, J.M., Louis-Seize, G., Hebert, P.D., 2007. Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3901–3906.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596–1599.
- Vilgalys, R., Hester, M., 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172, 4238–4246.
- Wagner, A.O., Malin, C., Illmer, P., 2009. Application of denaturing high-performance liquid chromatography in microbial ecology: fermentor sludge, compost, and soil community profiling. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 956–964.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

CHAPITRE III

Caractérisation de lactobacilles antifongiques isolés du lait cru et évaluation de leur potentiel en tant que cultures bio-protectrices du yaourt

-

Characterization of antifungal lactobacilli isolated from raw milk and assessment of their potential as yogurt bioprotective cultures

Emilie Delavenne, Rached Ismail, Audrey Pawtowski, Jérôme Mounier, Georges Barbier and Gwenaëlle Le Blay. Characterization of antifungal lactobacilli isolated from raw milk and assessment of their potential as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* (submitted).

Les produits laitiers tels que les laits fermentés et les yaourts sont d'une grande importance économique. De nouveaux produits se développent, présentant à la fois des qualités sensorielles et un bénéfice pour la santé (Khurana and Kanawjia, 2007). Cependant, ces produits, et notamment ceux dans lesquels sont ajoutés des ingrédients tels que des préparations aux fruits, sont sujets aux contaminations par des champignons (Fleet, 1990 ; Rohm *et al.*, 1992 ; Cousin, 2002). Le risque de contaminations, pouvant intervenir à tous les stades, de la production à la consommation, peut entraîner de lourdes pertes économiques et limiter la stabilité des produits à l'exportation (Mayoral *et al.*, 2005). De plus, l'utilisation des conservateurs chimiques est désormais restreinte par la législation européenne et la volonté des consommateurs à avoir des produits dépourvus d'additifs. Dans ce contexte, la bio-conservation est en plein développement, et l'utilisation de bactéries lactiques semble particulièrement pertinente dans ce type de produits. L'activité antifongique de plusieurs espèces de bactéries lactiques a été décrite (Schnürer and Magnusson, 2005), mais majoritairement par des évaluations *in vitro*. La plupart des études ayant évalué l'activité antifongique de bactéries au sein du yaourt ou des laits fermentés se sont intéressées aux bactéries propioniques, seules ou en mélange avec des lactobacilles (Salih *et al.*, 1990 ; Suomalainen and Mäyrä-Mäkinen, 1999 ; Schwenninger and Meile, 2004 ; Tawfik *et al.*, 2004 ; El-Shafei *et al.*, 2008).

L'objectif de cette étude a été de caractériser 11 souches de lactobacilles précédemment isolées de laits crus de vache et de chèvre et sélectionnées pour l'intensité de leur activité antifongique et leur spectre d'action *in vitro*, et d'évaluer leur potentiel à prévenir les altérations fongiques dans les laits fermentés et les yaourts. Les techniques utilisées sont décrites dans la publication associée au chapitre III.

Résultats et discussion

Les onze isolats sélectionnés ont été identifiés, grâce à une approche polyphasique, comme appartenant aux espèces *Lb. harbinensis* (1 isolat), *Lb. zae* (2 isolats), *Lb. rhamnosus* (4 isolats) et *Lb. paracasei* (4 isolats). De par leur relation phylogénétique étroite avec l'espèce *Lb. casei*, les isolats appartenant à l'espèce *Lb. zae* ont été les plus difficiles à identifier. L'utilisation de l'électrophorèse en champs pulsés et les profils de fermentation de 49 glucides ont permis de discriminer les différentes souches.

Toutes les souches testées se sont montrées sensibles à l'érythromycine et à la tétracycline, qui sont des gènes de résistances transférables communs chez les lactobacilles (Zarazaga *et al.*, 1999 ; Van Reenen and Dicks, 2011). A l'exception de *Lb. rhamnosus* M.V8.6.2F et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, tous les isolats étaient résistants à la vancomycine, à la kanamycine, au mélange triméthoprine/sulfaméthoxazole et à la streptomycine. Dans la littérature, il est considéré que ces résistances sont intrinsèques chez les lactobacilles (CA-SFM, 2010 ; Toomey *et al.*, 2010 ; Van Reenen and Dicks, 2011).

Chacune de ces souches s'est montrée capable de métaboliser le lactose et elles ont toutes montré une capacité à se développer dans le lait. Les souches *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1 étaient les souches les moins actives, inhibant respectivement 4 et 3 cibles fongiques. Trois souches de l'espèce *Lb. rhamnosus* (K.C8.3.1I, M.V7.3.1E et P.C8.3.2A) ont été les plus actives, inhibant 8 ou 7 cibles fongiques. Cependant, l'activité des souches sélectionnées était souche-dépendante, et n'était liée ni à la capacité de croissance des souches dans le lait, ni à leurs propriétés acidifiantes. En effet, les souches *Lb. paracasei* M.V9.4.2B et *Lb. paracasei* M.V7.7.1A, qui ont présenté une croissance rapide et une forte acidification après 72 heures de fermentation à 30°C dans le lait, n'étaient pas les plus actives. De plus, les champignons les plus sensibles aux acides lactique et acétique, tels que *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa* et *Kluyveromyces lactis*, n'ont pas systématiquement été inhibés tandis que les champignons les

moins sensibles (*Penicillium brevicompactum*, *P. expansum*) ont quant à eux été inhibés. Ces données suggèrent l'intervention d'autres molécules inhibitrices.

Les challenge tests réalisés dans le yaourt ont donné des résultats bien différents de ceux obtenus dans le lait. Parmi les 3 souches les plus actives dans le lait, seule la souche *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I était toujours active dans le yaourt avec l'inhibition complète de *R. mucilaginosa* et l'inhibition partielle de *D. hansenii*.

Il est intéressant de noter que deux souches peu acidifiantes (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. zeae* K.V9.3.1Ng) ont chacune montré de fortes activités antifongiques, mais avec une intensité d'activité et un spectre d'action différents en absence (lait) ou en présence (yaourt) de ferments. Ainsi la souche *Lb. zeae* K.V9.3.1Ng a vu son activité antifongique diminuer en présence de ferments (inhibition de 5/8 vs 0/6 cibles en absence vs présence de ferments), alors qu'au contraire elle a beaucoup augmenté pour la souche *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, qui a inhibé les 6 champignons ciblés, malgré sa faible capacité de croissance à 42°C et sa concentration plus faible que celle des autres souches après 6 heures de fermentation. Ceci suggère un effet synergique entre *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et les ferments, qui ont augmenté l'activité antifongique de la souche par rapport à celle des autres souches antifongiques. Le dosage des acides lactique (compris entre 737 et 887 mg/100 g) et acétique (compris entre 3,5 et 6 mg/100 g) après six heures de fermentation suggère que d'autres métabolites seraient impliqués dans l'inhibition. Ces derniers étaient en effet en concentration inférieure à la CMI des champignons ciblés, et ce dans tous les yaourts. On peut ainsi supposer que la synthèse ou l'activité des molécules antifongiques ont été potentialisées par la présence des ferments qui ont maximisé l'expression de l'activité antifongique. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un effet synergique entre des ferments et l'espèce *Lb. harbinensis*, similaire à ce qui est déjà cité pour les bactéries lactiques et les bactéries propioniques (Suomalainen and Mäyrä-Mäkinen, 1999 ; Schwenninger and Meile, 2004 ; El-Shafei *et al.*, 2008), est décrit. C'est aussi la première fois que l'activité antifongique de *Lb. harbinensis* est mise en évidence. Dans un grand nombre d'étude, l'activité antifongique est liée aux groupes *Lb. casei* et *Lb. plantarum* (Schnürer and Magnusson, 2005).

Lb. harbinensis K.V9.3.1Np, qui, dans le modèle yaourt, inhibe toutes les cibles fongiques, apparait comme une souche particulièrement intéressante pour être utilisée comme souche bio-protectrice. Des études complémentaires seront menées afin d'élucider les mécanismes d'action mis en jeu.

Characterization of antifungal lactobacilli isolated from raw milk and assessment of their potential as yogurt bioprotective cultures

Emilie Delavenne, Rached Ismail, Audrey Pawtowski, Jerome Mounier, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay*

Université de Brest, UEB, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest-Iroise, Plouzané, France

***Corresponding author present address:**

G. Le Blay

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE)

Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)-UMR 6197, Technopôle Brest-Iroise

29280 Plouzané, France

Tel.: +33 2 90 91 53 65

Fax: ++33 2 98 49 87 05

E-mail: gwenaelle.leblay@univ-brest.fr

Abstract

Eleven antifungal *Lactobacillus* strains previously isolated from cow and goat milk were fully characterized using molecular and phenotypic methods. Their antifungal activities were tested in milk and yogurt, against fungal species (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Penicillium brevicompactum*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Yarrowia lipolytica*) commonly involved in the spoilage of dairy products. The antifungal strains belonged to *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus zeae* and *Lactobacillus harbinensis* species and showed different acidifying and growth capacities in milk. All tested *Lactobacillus* strains showed an antifungal activity in milk with strain-dependent activity spectra. *Lb. harbinensis* showed a very strong antifungal effect in yogurt by completely inhibiting all tested fungi as compared to control. The other tested strains were much less effective. It is the first time that the antifungal activity of *Lb. harbinensis* is described. This strain is a potential candidate for yogurt biopreservation.

Key words : *Lactobacillus harbinensis*, antifungal, milk, yogurt, biopreservation

1. Introduction

Dairy products such as yogurts and fermented milks are of high economic importance. A large panel of new products are now proposed to the consumers such as ‘juiceceuticals’ like fruit-yogurt beverages, or added-value products with low calorie, reduced-fat varieties or supplemented with physiologically active ingredients including fibers, phytosterols, omega-3-fatty acids, whey based ingredients, antioxidant vitamins and isoflavones (Khurana & Kanawjia, 2007). Despite fermented milks and yogurts are generally considered as microbiologically stable, they may be subjected to contaminations with acid tolerant fungi, which can occur at all stages of food processing from raw materials to finished products. *Candida parapsilosis*, *Candida diffluens*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces bailii* or *Penicillium brevicompactum* are among the most frequently encountered fungal contaminants in yogurts and fermented milks, particularly in those containing fruits or sugar (Mayoral et al. 2005). Fungal spoilage is then a major limiting factor for the stability and the commercial value of these products. It causes significant economic losses worldwide and restrains exportation’s opportunities. Moreover, evolution of European legislation together with consumers’ demand has led industrials to reduce the use of chemical preservatives in fermented dairy products. It is then necessary to find alternative strategies to prevent fungal spoilage and/or to increase their shelf life. In this context, biopreservation, that implies the use of microbial cultures selected for their ability to control the growth of spoilage microorganisms, has taken a considerable development (Mills, Stanton, Hill & Ross 2011). Lactic acid bacteria (LAB) that are closely associated with fermented foods, and of which majority possesses the generally recognized as safe (GRAS) status and belongs to the qualified presumption of safety (QPS) list in Europe, are particularly well adapted to dairy products preservation (Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet & Guéguen, 2008). LAB are known to possess antimicrobial

activities linked to their strong competition for nutrients, to the decrease of pH due to their fermentative metabolism and to the production of inhibitory metabolites. Several species of lactobacilli (*Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*...), pediococci (*P. pentosaceus*, *P. acidilactici*) and lactococci (*Lc. lactis*) have been described as antifungal (Schnürer & Magnusson 2005). However, few studies (Salih, Sandine & Ayres, 1990; Suomalainen & Mäyrä-Mäkinen, 1999; Tawfik, Sharaf, Effat & Mahanna, 2004; Schwenninger & Meile, 2004) have tested *in situ* the capacity of these bacteria to prevent fungal spoilage in yogurts or fermented milks, in spite of the significant commercial interest in using them as natural food preservatives. The objectives of this study were to characterize and to evaluate the potential of 11 *Lactobacillus* strains, previously isolated from cow and goat raw milk, to prevent the growth of common fungal spoilage encountered in fruit yogurts and fermented milks.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

The 11 antifungal *Lactobacillus* isolates tested in this study were previously obtained from cow and goat milk by Delavenne, Mounier, Déniel, Barbier, & Le Blay (2012). They were assigned to the *Lactobacillus* genus on the basis of their Gram-staining, catalase activity, and partial 16S rRNA gene sequencing. Their antifungal activity was previously confirmed by the overlay method in MRS agar. The reference strains used for identification purposes were *Lactobacillus casei* LMG 6904, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, *Lactobacillus paracasei* LMG 13087, *Lactobacillus zeae* LMG 17315, *Lactobacillus harbinensis* LMG 24040 and *Lactobacillus perolens* LMG 18936. Lactobacilli were conserved in glycerol 30% (v/v) at -80°C and reactivated by culturing in 10 ml of MRS overnight at 30°C.

Eight fungi, commonly encountered in yogurt spoilage (Filtenborg, Frisvad & Thrane, 1996; Viljoen, 2001; Mayoral et al., 2005), were chosen as indicators for antifungal assays. *Debaryomyces hansenii* LMSA 2.11.003, *Pichia anomala* LMSA 2.01.001, *Rhodotorula mucilaginosa* LMSA 2.02.007, *Yarrowia lipolytica* LMSA 2.11.004, *Penicillium brevicompactum* LMSA 1.08.095 and *Penicillium expansum* LMSA 1.08.102 came from the "Souchothèque de Bretagne" culture collection (Université de Brest, Plouzané, France), whereas *Kluyveromyces lactis* CLIB 196 and *Kluyveromyces marxianus* CLIB 282, came from the "Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique (CLIB)" (INRA, Thiverval-Grignon, France). Fungi were stored in yeast extract and malt based medium (YEMA) supplemented with glycerol (30%, v/v) at -80°C, and cultivated aerobically on YEMA at 25°C.

2.2 Identification of *Lactobacillus* spp. isolates

2.2.1 MALDI-TOF mass spectrometry analysis

Bacterial isolates were grown on MRS agar for 48 h at 30°C and a few colonies were harvested and suspended in 300 µl of sterile distilled water and 900 µl of ethanol (95%). After centrifugation at 13000 g for 2 min and elimination of the supernatant, the pellet was diluted in 50 µl of formic acid with 50 µl of acetonitrile (70%) and centrifuged again under the same conditions. The supernatant (1.2 µl) containing the protein extract was spotted in the MALDI sample plate, which was then introduced into the apparatus Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany). The analysis was performed following the supplier instructions. The produced spectra were collected by the software FlexControl 3.0 and were interpreted by software MALDI Biotyper 2.0 thanks to the database Bruker Taxonomy (Bruker Daltonics, Germany) containing 14 groups and 218 representatives of the *Lactobacillus* genus.

2.2.2 DNA extraction and sequencing of the 16s rRNA, *pheS* and *rpoA* genes

Total DNA of each selected isolate was extracted by using the FastDNA® SPIN Kit according to the manufacturer's instructions (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). DNA quantity and purity was evaluated using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Labtech, Palaiseau, France) and used as template for the 16s rRNA, *pheS* and *rpoA* genes amplification, as described by Zamfir et al (2006), Berger et al. (2007) and Naser et al. (2005), respectively. Amplicons were sequenced at the Biogenouest sequencing platform in the "Station Biologique de Roscoff" (<http://www.sb-roscoff.fr/SG/>). Sequences were compared to DNA sequences on the Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) and on the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (November 2011) for species assignment. Phylogenetic analyses were conducted by the neighbor-joining method using MEGA 5.05 software (Tamura et al., 2011).

2.2.3 Typing of isolates using pulsed-field gel electrophoresis

Isolates of the same species were typed to check for the occurrence of clonal strains. DNA preparation and electrophoresis conditions were performed following the method of Brennan et al. (2002) with some modifications. Plugs were made in the wash solution containing 1 mg lysozyme/ml (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and 40 U mutanolysin/ml (Sigma), and 100 U mutanolysin/ml was added to the lysis solution. Slices were washed in 100 µl of restriction buffer (1×) containing bovine serum albumin, for 30 min at 4°C. They were finally incubated overnight in 100 µl of restriction buffer and 20 U of restriction enzyme/ml at 25°C with *SmaI* or at 37°C for *SfiI*. Electrophoretic conditions for separating the DNA fragments were a pulse time of 0.5 to 20 s for 12 h and another of 30 to 60 s for 8 h for DNA digested using *SfiI* (Rodas, Ferrer & Pardo, 2005), and a pulse time of 0.5 to 5 s for

14 h and another from 0.5 to 10 s for 4 h for DNA digested using *Sma*I. Lambda ladder (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used as molecular size standard. The digitized patterns were normalized and analyzed numerically using Bionumerics software, version 2.0 (Applied Maths). Similarities among band patterns were calculated based on Pearson's similarity coefficient, and dendrograms were constructed by the unweighted-pair group method using average linkages (UPGMA).

2.3 Physiological characterization of antifungal bacteria

2.3.1 Antibiotic resistance tests

Antibiotic resistance patterns of *Lactobacillus* isolates were analysed by a disk diffusion method. Colonies from a 48 h culture on MRS agar were suspended in 0.1% peptone water to a 0.5 McFarland density. This suspension was homogeneously spread on MRS agar with a sterile swab. Discs of antibiotics containing 10 µg ampicillin (AMP), 30 µg chloramphenicol (CHL), 30 IU tetracycline (TET), 10 IU streptomycin (STR), 15 IU erythromycin (E), 30 IU kanamycin (K), 30 µg vancomycin (VA), and 1.25/23.75 µg trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) were deposited at the center of the plate after drying. Agar plates were then incubated for 48 h at 30°C and the diameters of inhibition zones were measured. Results were interpreted according to the cut-off levels proposed for *Enterococcus* spp. by the Committee of the antibiogram of the French society for microbiology (SFM) with strains considered resistant if inhibition zone diameters were smaller than 19 mm for chloramphenicol, 17 mm for erythromycin, vancomycin and tetracycline, 16 mm for ampicillin, and 12 mm for streptomycin, and 10 mm for trimethoprim/sulfamethoxazole and kanamycin.

2.3.2 Carbohydrate fermentations

Carbohydrate fermentation patterns were obtained by using API 50 CH galleries and 50 CHL medium following the manufacturer's instructions (BioMérieux, Lyon, France). Results interpretation was done on the Apiweb site (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify?action=prepareHome/>).

2.3.3 Growth rate in MRS

Growth at 12°C, 30°C and 42°C were monitored in filter-sterilized (0.22 µm) MRS broth by measuring the OD_{600 nm} every 5 min for 48 h in a Bioscreen plate (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) placed in an automated turbidometer Bioscreen® apparatus (Ab Ltd, Helsinki, FI). Initial concentrations of tested isolates were set at 10⁶ cfu/ml and growth curves were recorded with the NordenLab software (Ab Ltd). All experiments were carried out in triplicate.

2.3.4 Growth in milk and acidification properties

Lactobacillus isolates were grown in MRS broth for 17 h, centrifuged at 10000 g for 10 min and bacterial pellets were washed twice in peptone water (0.1%), before being resuspended in 10 ml of half-fat ultra-high-temperature (UHT) milk at a concentration of 5.10⁶ cfu/ml. Test tubes were incubated at 30°C, and plate counts (MRS agar) and pH were monitored after 0, 24, 48 and 72 h of incubation. All experiments were carried out in triplicate.

2.4 Antifungal properties

2.4.1 Antifungal activities in milk

The antifungal activity of *Lactobacillus* isolates was performed in half-fat UHT milk supplemented with agar (10 g/l) and litmus dye (6 ‰) (Réactif RAL, Martillac, France) in

order to evaluate acid production during bacterial growth. A 24-well plate (Becton Dickinson Labware Europe, Le pont de Claix, France) was used for each bacterial isolate. UHT milk agar (1.5 ml) was poured in each well. Twelve wells were not inoculated with the antifungal bacterial isolate and served as positive controls for fungal growth (8 fungal species tested per plate), whereas the 12 other wells were inoculated with $5 \cdot 10^6$ cfu/ml of the tested antifungal isolate. Plates were then incubated at 30°C for 72 h for bacterial growth. After incubation, each targeted fungi was harvested in sterile water and enumerated with a Malassez cell. Then, 10^4 spores or cells/ml were inoculated in potato dextrose (PDA) soft agar (10 g/l), (Difco, Le Pont de Claix, France) and 200 µl was poured on the top of each well. Fungal growth was then observed after three days of incubation at 25°C. Experiments were performed in triplicate.

2.4.2 Fungal tolerance to organic acids

Several concentrations of lactic and acetic acids (0.001-2 M) (Sigma-Aldrich) were separately added to MRS soft agar (7 g/l), and the pH values were adjusted to 3, 5 and 7 with either HCl (1, 3 or 10 M) or NaOH (1, 3 or 10 M). Ten microlitres of a $5 \cdot 10^3$ spores or cells/ml suspension were inoculated as a spot in the center of the plates followed by incubation for 6 days at 25°C under aerobic conditions. pH and organic acids susceptibility was monitored by measuring the diameter of fungal thalles or colonies after incubation. Experiments were performed in triplicate.

2.5 Challenge tests in yogurts

2.5.1 Preparation and contamination of yogurts

A first series of challenge tests was performed in yogurt in order to evaluate the antifungal activity of the 11 *Lactobacillus* isolates against six targeted fungi (*D. hansenii*,

R. mucilaginosa, *Y. lipolytica*, *P. brevicompactum*, *K. lactis* and *K. marxianus*). Challenge tests were then repeated for the three most active antifungal isolates (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I and *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1) in comparison to the less active isolate (*Lb. zae* K.V9.3.1Ng). Three batches of 500 ml of half-fat pasteurized milk ('Lait frais demi-écrémé pasteurisé GrandLait', Candia, France) were mixed with milk powder (4%) ('Lait en poudre écrémé', Casino, France), litmus dye (6 ‰), heated at 85°C for 30 min and cooled to 45°C before being inoculated with a commercial yogurt starter culture ('ferments lyophilisés pour yaourt brassé', Nat-Ali, Nantes, France) following instructions of the manufacturer. Thirty millilitres of the inoculated milk were distributed into forty 100 ml-sterile containers. Eight containers were used for each of the 5 experimental conditions (4 antifungal strains and control without antifungal strain). They were inoculated or not (control) with 1.5 ml of each antifungal strain ($5 \cdot 10^6$ cfu/ml), and among them, 6 were inoculated with the 6 targeted fungi and 2 were used for pH measurement and bacterial enumeration. After fermentation for 6h at 42°C, yogurts were cooled at 10°C and contaminated on the surface with the 6 tested fungi (100 spores or cells per container). Yogurts were stored at 10°C for up to 6 weeks.

2.5.2 Bacterial enumeration

Bacterial enumeration was performed every hour during fermentation at 42°C and then weekly during the 6 weeks of storage at 10°C. Lactobacilli were enumerated on acidified MRS agar (pH 5.5) (Randazzo, Torriani, Akkermans, De Vos & Vaughan, 2002), antifungal *Lactobacillus* on LAMVAB (Hartemink, Domenech & Rombouts, 1997) and *Streptococcus thermophilus* on M17 supplemented with lactose 0.5% (Ashraf & Shah, 2011).

2.5.3 Fungal quantification

Fungal growth in each yogurt was visually evaluated once a week, before quantification after 6 weeks of storage at 10°C. Yogurts contaminated with yeasts were 10-fold diluted in 270 ml of sterile peptone water (0.1%) in a stomacher bag (Stomacher® Bags, Fisher scientific, Illkirch, France) and homogenized for 1 min (Stomacher® Mix 1, AES Laboratoire, Combourg, France). One hundred microliters of each dilution were plated in duplicate on yeast extract glucose chloramphenicol agar (YEGC), and yeast colonies were enumerated after incubation for 48 h at 25°C. Results were expressed in log₁₀ cfu/g of yogurt.

Growth of the filamentous fungus *P. brevicompactum* was evaluated by quantifying the ergosterol content in the yogurt. Four grams of the upper layer of the yogurt were sampled and a particular attention was given to recover the whole fungus biomass. Each sample was then homogenized in 36 ml of 2% trisodium citrate with an Ultra Turrax® (Labortechnik, Düsseldorf, Germany) for 1 min. This mixture was then centrifuged at 9000 g for 20 min at room temperature, and the pellet was then frozen at -20°C until use. Prior to ergosterol extraction, the pellet was defrosted and suspended in 3 ml of 20% potassium hydroxide in methanol followed by incubation for 2 h at 85°C and cooling on ice. Ergosterol extraction was made twice by adding 2 ml of petroleum ether (35°C-60°C, Carlo-Erba, Val de Reuil, France) to the methanolic potassium hydroxide suspension. The suspension was shaken thrice for 20 s and centrifuged at 936 g for 10 min at 4°C. The organic phase was then transferred to an amber glass vial (Dutscher, Brumath, France) and evaporated under a nitrogen stream. This extract was stored at -20°C before quantification. The extract was defrosted, suspended in 0.5 ml of methanol, and the ergosterol quantified with a high-performance liquid chromatograph Agilent 1100 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an Zorbax Eclipse XDB C18 column (4.6 × 150 mm; 5 µm) and an UV detector set at 282 nm. The mobile phase was methanol with a flow rate of 1.2 ml/min and the volume injected was 50 µl.

Ergosterol content was determined in triplicate using external ergosterol standards (Sigma, St Louis, MO) and the results expressed in µg ergosterol/g of yogurt.

2.5.4 Organic acid analyses

Acetic and lactic acid concentrations were determined in yogurts after 6 h of fermentation using enzymatic kits (Boehringer-Mannheim, R-Biopharm, Darmstadt, Germany).

2.6 Statistical analyses

Statistical analyses were performed using STATGRAPHICS plus 5.1 package (Statistical Graphics Corp., VA, USA). A one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to detect significant differences among means. Tukey's honestly significant difference (HSD) test was used to compare mean microbial counts, acidification properties and to assess the effects of antifungal strains. Statistical significance was set at $P < 0.05$ level.

3. Results

3.1 Phylogenetic identification and typing of *Lactobacillus* isolates

Based on the partial sequencing of their 16S rRNA gene, 10 strains were previously assigned to the *Lactobacillus casei* group and one to the *Lactobacillus brevis* group (K.V9.3.1Np), but they could not be clearly assigned to the species level (Delavenne, Mounier, Déniel, Barbier, & Le Blay, 2012). The complete sequencing of the 16S rRNA gene in the present study, did not allow an identification of the strains without ambiguity. MALDI-TOF analyses allowed a better identification, with the assignation without ambiguity (spectral scores above 2.3) of two isolates (M.V9.4.2B and K.C8.3.1Hc1), and a probable species identification (spectral scores comprised between 2.000 and 2.299) for two other ones (P.C8.7.1A and M.V7.7.1A) to *Lactobacillus paracasei*. Strain K.V9.3.1Np was assigned to *Lb. harbinensis* with a spectral

score above 2. Only two isolates (K.C8.3.1I and P.C8.3.2A) over four were confirmed to belong to *Lb. rhamnosus*. The last four isolates (M.C7.5.2C, K.V9.3.1NG, M.V7.3.1E and M.V8.6.2F) could not be clearly identified using MALDI-TOF analyses (spectral scores below 1.999) (Table 1). The complete sequencing of the *rpoA* gene confirmed the identification obtained by MALDI-TOF and definitively assigned M.V8.6.2F and M.V7.3.1E to *Lb. rhamnosus*. However, as for MALDI-TOF, *rpoA* gene sequencing did not allow to clearly assigned isolates M.C7.5.2C and K.V9.3.1Ng to the species level. Indeed, these isolates could not be differentiated from two closely related species, *Lb. casei* and *Lb. zeeae*. These isolates were finally assigned to *Lb. zeeae* based on their *pheS* gene sequences.

PFGE analysis was used for strain typing. The use of *SfiI* and *SmaI* clearly showed that the two isolates belonging to *Lb. zeeae* and the four isolates belonging to the *Lb. paracasei* species were different strains (data not shown). Two of the four isolates identified as *Lb. rhamnosus* showed distinct patterns (M.V8.6.2F and M.V7.3.1E), but the two others (K.C8.3.1I and P.C8.3.2A) showed similar PFGE band patterns (data not shown).

Table 1. Species assignation of antifungal *Lactobacillus* isolates based on MALDI-TOF analyses and *rpoA* and *pheS* gene sequencing.

Strains	MALDI-TOF	<i>rpoA</i> gene sequencing	<i>pheS</i> gene sequencing	Species assignation
K.V9.3.1Np	<i>Lb. harbinensis</i>	<i>Lb. harbinensis</i>	nd [‡]	<i>Lb. harbinensis</i>
M.C7.5.2C	<i>Lb. casei</i> / <i>zeeae</i> [†]	<i>Lb. zeeae</i> / <i>casei</i>	<i>Lb. zeeae</i>	<i>Lb. zeeae</i>
K.V9.3.1Ng	<i>Lb. casei</i> / <i>zeeae</i>	<i>Lb. zeeae</i> / <i>casei</i>	<i>Lb. zeeae</i>	<i>Lb. zeeae</i>
M.V9.4.2B	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	nd	<i>Lb. paracasei</i>
P.C8.7.1A	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	nd	<i>Lb. paracasei</i>
M.V7.7.1A	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	nd	<i>Lb. paracasei</i>
K.C8.3.1Hc1	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. paracasei</i>	nd	<i>Lb. paracasei</i>
M.V8.6.2F	<i>Lb. rhamnosus</i> / <i>casei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	nd	<i>Lb. rhamnosus</i>
P.C8.3.2A	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	nd	<i>Lb. rhamnosus</i>
M.V7.3.1E	<i>Lb. rhamnosus</i> / <i>casei</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	nd	<i>Lb. rhamnosus</i>
K.C8.3.1I	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	nd	<i>Lb. rhamnosus</i>

[†] When two names are proposed, the first is with the highest percentage of identity or the best score.

[‡] not determined

3.2 Physiological characterization of isolates

3.2.1 Sugar fermentation patterns

Fermentation patterns confirmed PFGE results which showed that *Lb. paracasei* and *Lb. zeae* isolates were different strains due to their different sugar fermentation patterns (Table 2). Moreover, the two *Lb. rhamnosus* isolates (K.C8.3.1I and P.C8.3.2A), which could not be differentiated using PFGE, had distinct fermentation patterns with a differential utilization of inositol, implying that they are probably different strains (Table 2). All strains were able to metabolize D-lactose.

Table 2. Fermentation patterns of potential antifungal *Lactobacillus* spp. strains.

	<i>Lb.</i> <i>harbinensis</i>	<i>Lb. zeae</i>		<i>Lb. paracasei</i>				<i>Lb. rhamnosus</i>			
	K. V9. 3. 1Np	M. C7. 5. 2C	K. V9. 3. 1Ng	M. V9. 4. 2B	P. C8. 7. 1A	M. V7. 7. 1A	K. C8. 3. 1Hc1	M. V8. 6. 2F	P. C8. 3. 2A	M. V7. 3. 1E	K. C8. 3. 1I
Glycerol	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Erythritol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Arabinose	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
L-Arabinose	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Ribose	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
L-Xylose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Adonitol	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–
Methyl-βD- Xylopyranoside	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	–	–	–	–	+	–	–	+	+	+	+
L-Rhamnose	–	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
Dulcitol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Inositol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
D-Mannitol	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+
Methyl-αD- Mannopyranoside	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Methyl-αD- Glucopyranoside	–	–	–	+	–	+	–	+	+	+	+
N- Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Table 2 (continued)

D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose (bovine origin)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
D-Melezitose	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Raffinose	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Amidon (starch)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Glycogen	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Xylitol	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Tagatose	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Fucose	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
D-Arabitol	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
L-Arabitol	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium 2-Ketogluconate	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–
Potassium 5-Ketogluconate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

3.2.2 Growth rate in MRS

Physiological assays were performed to determine the effect of temperature on the growth capacity and growth rate of the selected strains. The highest growth rates, ranging from 0.33 to 0.5, were observed at 42°C for *Lb. rhamnosus* M.V7.3.1E, K.C8.3.1I and P.C8.3.2A, and *Lb. zeae* M.C7.5.2.C and K.V9.3.1.Ng. The other strains were also able to grow at 42°C, except *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, and *Lb. paracasei* M.V9.4.2B and M.V7.7.1A. All strains were able to grow at 30°C with growth rates ranging from 0.17 to 0.30, whereas no strain was able to grow at 12°C (Table 3).

Table 3. Acidification properties and growth of potential antifungal *Lactobacillus* spp. strains in UHT milk and MRS.

			<i>Lb. harbinensis</i>	<i>Lb. zeae</i>		<i>Lb. paracasei</i>				<i>Lb. rhamnosus</i>			
			K.V9.3.1Np	M.C7.5.2C	K.V9.3.1Ng	M.V9.4.2B	P.C8.7.1A	M.V7.7.1A	K.C8.3.1Hc1	M.V8.6.2F	P.C8.3.2A	M.V7.3.1E	K.C8.3.1I
Milk	pH	0 h	6.7 ± 0.01 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.01 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a	6.7 ± 0.05 _a
		24 h	6.3 ± 0.00 _{abc}	6.4 ± 0.03 _c	6.4 ± 0.01 _{bc}	5.9 ± 0.08 _{ab}	5.8 ± 0.05 _a	6.0 ± 0.06 _{abc}	6.3 ± 0.07 _{bc}	5.8 ± 0.42 _a	6.3 ± 0.07 _{abc}	5.8 ± 0.38 _a	6.3 ± 0.09 _{abc}
		48 h	5.9 ± 0.01 _{bcde}	6.3 ± 0.18 _{de}	6.5 ± 0.01 _e	4.9 ± 0.04 _a	4.7 ± 0.03 _a	5.0 ± 0.05 _{ab}	5.9 ± 0.10 _{cde}	4.9 ± 0.57 _a	5.6 ± 0.37 _{abcd}	4.9 ± 0.60 _a	5.4 ± 0.40 _{abc}
		72 h	5.7 ± 0.01 _{cd}	5.6 ± 0.82 _{bcd}	6.4 ± 0.01 _d	4.3 ± 0.07 _a	4.2 ± 0.04 _a	4.4 ± 0.07 _a	5.3 ± 0.13 _{abc}	4.4 ± 0.44 _a	4.7 ± 0.50 _{abc}	4.4 ± 0.47 _a	4.6 ± 0.43 _{ab}
	log cfu/ml	0 h	6.4 ± 0.0 _a	6.8 ± 0.2 _a	6.7 ± 0.0 _a	6.6 ± 0.3 _a	6.2 ± 0.6 _a	6.7 ± 0.1 _a	6.8 ± 0.2 _a	6.6 ± 0.2 _a	6.8 ± 0.2 _a	6.5 ± 0.3 _a	6.7 ± 0.2 _a
		24 h	8.3 ± 0.2 _a	8.7 ± 0.2 _{ab}	8.7 ± 0.0 _{ab}	8.7 ± 0.1 _{ab}	8.6 ± 0.1 _{ab}	8.8 ± 0.2 _{ab}	8.7 ± 0.1 _{ab}	8.9 ± 0.2 _b	8.7 ± 0.1 _{ab}	8.9 ± 0.3 _b	8.7 ± 0.3 _{ab}
		48 h	8.4 ± 0.1 _a	8.8 ± 0.4 _{ab}	8.6 ± 0.1 _{ab}	9.1 ± 0.1 _b	8.9 ± 0.1 _{ab}	8.9 ± 0.2 _{ab}	8.9 ± 0.1 _{ab}	9.1 ± 0.2 _b	9.1 ± 0.3 _b	9.1 ± 0.2 _b	9.1 ± 0.3 _b
		72 h	8.6 ± 0.0 _a	9.1 ± 0.4 _{ab}	8.8 ± 0.2 _{ab}	9.3 ± 0.1 _b	8.8 ± 0.2 _{ab}	9.1 ± 0.2 _{ab}	8.9 ± 0.1 _{ab}	9.0 ± 0.3 _{ab}	9.2 ± 0.1 _b	8.9 ± 0.3 _{ab}	9.2 ± 0.1 _b
MRS broth	growth rates	12°C	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		30°C	0.20	0.30	0.30	0.24	0.17	0.27	0.30	0.21	0.27	0.21	0.28
		42°C	–	0.45	0.33	–	0.17	–	0.13	0.30	0.45	0.50	0.46

Values with different small letters in a row are significantly different by Turkey-HSD test ($P < 0.05$); Growth rates are expressed in h⁻¹; – No growth after 48 hours

3.2.3 Antibiotic resistance profiles

The 11 strains showed very similar antibiotic resistance profiles. They were resistant to vancomycine, streptomycine, kanamycine, trimethoprine/sulfamethoxazole and sensitive to erythromycin, tetracyclin, ampicillin and chloramphenicol. However, two exceptions were observed with *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I and M.V8.6.2F that were sensitive to streptomycin.

3.2.4 Growth in milk

The most acidifying strains belonged to the *Lb. paracasei* (P.C8.7.1A, M.V9.4.2B and M.V7.7.1A) and the *Lb. rhamnosus* (M.V7.3.1E and M.V8.6.2F) with ΔpH of -2.5 and -2.3 after 72h incubation, respectively. The slowest-acidifying strains were the *Lb. zeae* (K.V9.3.1Ng and M.C7.5.2C) and the *Lb. harbinensis* (K.V9.3.1Np). All strains were able to grow in milk with concentrations comprised between 8.6 and 9.3 log₁₀ cfu/ml after 72 h incubation at 30°C, and *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np reached the lowest cell number (Table 3).

3.2.5 Antifungal activity spectrum in milk

Among the 8 targeted fungi, *K. lactis* and *P. anomala* were the most difficult to inhibit, whereas *R. mucilaginosa*, *D. hansenii* and *P. brevicompactum* were the most easily inhibited in milk. The *Lb. rhamnosus* strains exhibited the widest activity spectra with strain K.C8.3.1I inhibiting the 8 fungal targets followed by strains M.V7.3.1E and P.C8.3.2A inhibiting 7 targets. The strains showing the lowest inhibitory activity spectrum in milk were *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1 inhibiting only 4 and 3 fungal targets, respectively (Table 4). Within a same species, inhibition spectra were strain-dependent.

Table 4. Antifungal activity spectrum of *Lactobacillus* spp. strains in milk.

Fungi	<i>Lb. harbinensis</i>	<i>Lb. zeae</i>		<i>Lb. paracasei</i>				<i>Lb. rhamnosus</i>			
	K. V9. 3. 1Np	M. C7. 5. 2C	K. V9. 3. 1Ng	M. V9. 4. 2B	P. C8. 7. 1A	M. V7. 7. 1A	K. C8. 3. 1Hc1	M. V8. 6. 2F	P. C8. 3. 2A	M. V7. 3. 1E	K. C8. 3. 1I
<i>D. hansenii</i>	±	—	±	+	±	+	—	++	++	+	++
<i>K. lactis</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±
<i>K. marxianus</i>	—	±	±	±	±	±	—	±	±	—	±
<i>P. anomala</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	±	±	±
<i>R. mucilaginosa</i>	++	±	++	±	±	±	+	+	++	++	++
<i>Y. lipolytica</i>	—	±	—	±	—	±	—	±	±	±	±
<i>P. brevicompactum</i>	+	+	++	±	±	±	+	±	++	±	+
<i>P. expansum</i>	±	±	++	±	±	±	±	±	±	±	±

Results shown are the combination of three tests. — indicates that fungal growth was not inhibited;

± indicates that fungal growth was lower on the filled well than on the control well in at least two assays;

+ indicates that growth inhibition was complete in two assays, whereas ++ indicates that growth inhibition was complete in the three assays.

3.2.6 Fungal sensitivity to acetic and lactic acids

Independently of pH, fungi were more resistant to lactic acid than acetic acid and their sensitivity decreased with pH increase. *P. anomala*, *Y. lipolytica* and *P. expansum* were the most resistant fungi to acetic acid, whereas the most sensitive ones were *D. hansenii* and *R. mucilaginosa* (Table 5).

Table 5. Minimal concentrations (M) of lactic and acetic acids completely inhibiting fungal growth at pH 3, 5 and 7.

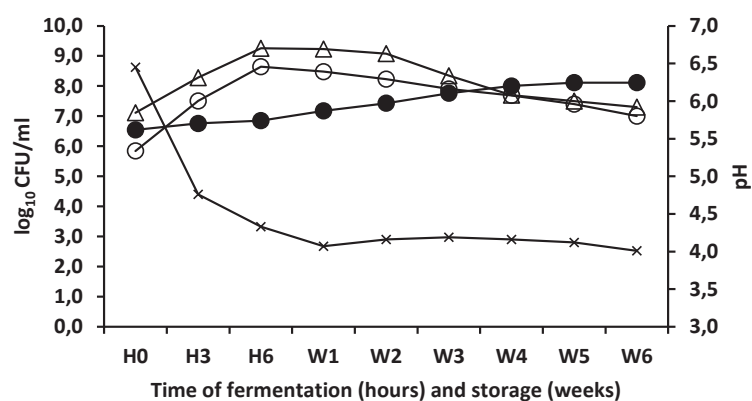
Acids			<i>D. hansenii</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	<i>P. brevicompactum</i>	<i>P. expansum</i>	<i>Y. lipolytica</i>	<i>P. anomala</i>
Acetic acid	pH	7	0.5	0.5	0.5	1	0.5	1	1	1
		5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
		3	0.005	0.02	0.01	0.01	0.02	0.05	0.05	0.05
Lactic acid	pH	7	1	1	1	1	2	2	2	2
		5	0.5	0.5	1	0.5	2	2	2	2
		3	0.1	> 0.1	> 0.1	0.1	> 0.1	> 0.1	> 0.1	> 0.1

The eight fungi *Debaryomyces hansenii*, *Pichia anomala*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium brevicompactum* and *P. expansum* used for the characterization of fungal activity spectrum of the eleven strains came from the "Souchothèque de Bretagne" culture collection (Université de Brest, Plouzané, France) or from the "Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique (CLIB)" (INRA, Thiverval-Grignon, France).

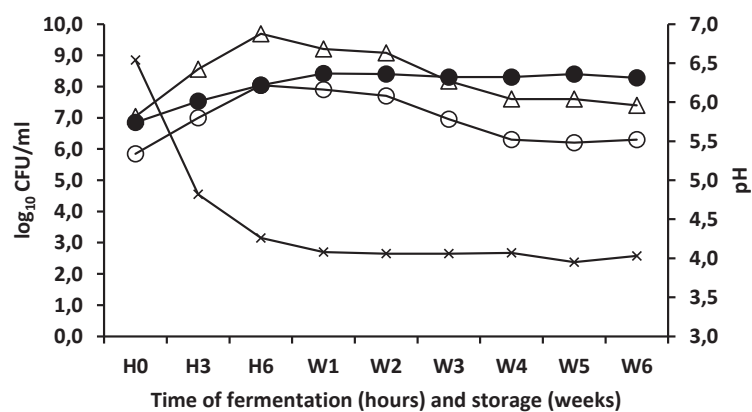
3.3 Challenge tests in yogurts

The three strains totally inhibiting the growth of at least one fungus in the first series of experiments were *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I and *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1. They were then chosen with the less active strain, *Lb. zaeae* K.V9.3.1Ng for one more repetition in comparison to a negative control without antifungal strain. The four antifungal strains neither modified the acidification properties nor the growth of starters that was similar with or without protective strain (Figure 1). No significant differences in pH (ranging from 3.9 to 4.1), lactic acid (ranging from 737 to 887 mg/100 g) nor acetic acid (ranging from 3.5 to 6 mg/100 g) concentrations were observed between the supplemented yogurts and the control yogurts after 6 h of fermentation. Moreover, *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, *Lb. zaeae* K.V9.3.1Ng, *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1 and the starter *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reached similar cell numbers with $\sim 8 \log_{10}$ cfu/ml. In contrast, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np grew much slowly with $6.9 \pm 0.1 \log_{10}$ cfu/ml after 6 h of fermentation. Nevertheless, it reached a similar population to that of the three other antifungal strains after 6 weeks of storage at 10°C. Concerning fungal growth, the control yogurt and the yogurt supplemented with *Lb. zaeae* K.V9.3.1Ng showed a heavy fungal growth after 6 weeks of storage regardless of the inoculated fungus (Table 6). In contrast, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np totally prevented the growth of all targeted fungi, while *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I significantly reduced the growth of *D. hansenii* and *R. mucilaginosa*, and *Lb. paracasei* K.C8.3.1Hc1 only significantly reduced the growth of *D. hansenii*.

A. Yogurt supplemented with *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np



B. Yogurt supplemented with *Lb. zeae* K.V9.3.1Ng



C. Yogurt control

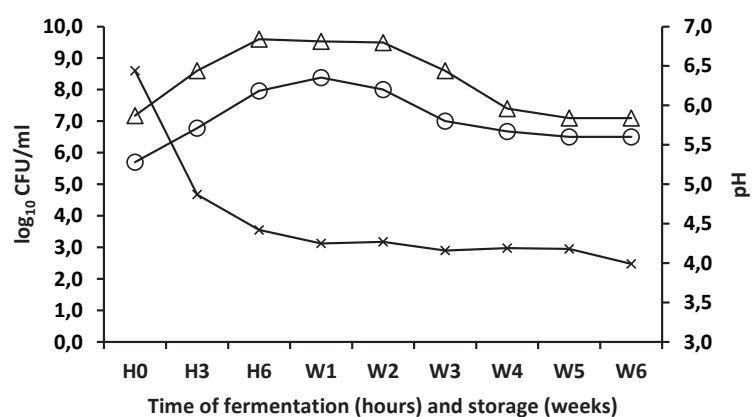


Figure 1. Bacterial growth and pH decrease in yogurts supplemented with *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np (A), *Lb. zeae* K.V9.3.1Ng (B) compared to control without antifungal strain (C) after 6 h of fermentation at 42°C and after 6 weeks of storage at 10°C. ● Protective strain; ○ *Lb. bulgaricus*; Δ *S. thermophilus*; × pH.

Table 6. Fungal quantification, expressed in log₁₀ cfu/g of yogurt for yeasts, and in µg ergosterol/g of yogurt surface for *P. brevicompactum*.

Fungi	Control	<i>Lb. harbinensis</i> K.V9.3.1Np	<i>Lb. zeae</i> K.V9.3.1Ng	<i>Lb. paracasei</i> K.C8.3.1He1	<i>Lb. rhamnosus</i> K.C8.3.1I
<i>D. hansenii</i>	8.1 ± 0.5a	< 2b	7.4 ± 0.2a	2.3 ± 0.4b	3.8 ± 2.5b
<i>R mucilaginoso</i>	8.3 ± 0.4a	< 2b	7.9 ± 0.1a	7.6 ± 0.5a	< 2b
<i>K marxianus</i>	7.2 ± 0.4a	< 2b	7.4 ± 0.2a	7.3 ± 0.5a	7.6 ± 0.3a
<i>K lactis</i>	8.4 ± 0.3a	< 2b	8.2 ± 0.1a	7.7 ± 0.6a	8.0 ± 0.2a
<i>Y. lipolytica</i>	8.4 ± 0.1a	< 2b	7.6 ± 0.2a	7.8 ± 0.1a	7.6 ± 0.1a
<i>P. brevicompactum</i>	137 ± 19	nd [†]	87 ± 4	80 ± 16	77 ± 25

[†] not detected.

Values with different small letters in a row are significantly different by Turkey-HSD test ($P < 0.05$).

4. Discussion

In this study, antifungal *Lactobacillus* spp. previously isolated from cow and goat milk were tested for their potential as protective culture in yogurt and fermented milk. These isolates were clearly identified and assigned without ambiguity at the species level using a polyphasic approach combining phenotypic (MALDI-TOF) and molecular (16S rRNA, *pheS*, *rpoA* gene sequencing) methods as suggested by Vanhaverbeke et al., (1998), whereas strain typing was performed using PFGE. Interestingly, it was found that *pheS* gene sequencing was the most useful to identify isolates of *Lb. zeae* that is very closely related with *Lb. casei* (Felis, Dellaglio, Mizzi & Torriani, 2001).

Concerning antibiotic resistance profiles, all strains were resistant to vancomycin, kanamycin, trimethoprine/sulfamethoxazole, and streptomycin (except strains of *Lb. rhamnosus* M.V8.6.2F and K.C8.3.1I being sensitive to the latter). These results were in agreement with literature data since it is traditionally considered that lactobacilli are intrinsically resistant to these antibiotics (Danielsen & Wind, 2003). None of the strains were resistant to

erythromycine nor tetracycline, two common transferable resistant genes among lactobacilli (Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet & Guéguen, 2008).

Preliminary antifungal tests were performed in UHT milk at 30°C in order to provide a favorable temperature for growth of all strains. This test showed that *Lb. rhamnosus* strains K.C83.1I, M.V7.3.1E, P.C8.3.2A were the most effective by inhibiting 8 or 7 fungi. In contrast, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np and *Lb. paracasei* K.8.3.1.Hcl were the least effective with inhibition of 4 and 3 fungi, respectively. These antifungal effects were strain-dependent, and were not related to the growth capacity of the strains in milk neither to their acidification properties. Indeed, strains such as *Lb. paracasei* M.V9.4.2B and M.V7.7.1A, with a rapid growth and deep acidification after 72 h of fermentation at 30°C in milk, were not the most effective against fungi. Moreover, the most acid sensitive fungi, *i.e.* *D. hansenii*, *R. mucilaginosa* and *K. lactis*, were not systematically inhibited, whereas less acid sensitive fungi (*P. expansum* and *P. brevicompactum*) were inhibited. This suggests that antifungal molecules other than acetic and lactic acids may be also involved.

Very interestingly, challenge tests performed in yogurts gave very different results. Most of the strains (8 of 11 strains tested) did not completely inhibit the targeted fungi. Among the three most effective strains in milk, *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I was the only strain still active in yogurt with a complete inhibition of *R. mucilaginosa* and a partial inhibition of *D. hansenii*. On the opposite, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np that was the least active strain in milk, completely inhibited all targeted fungi in yogurt, despite its slowest growth capacity at 42°C. This dramatic increase in the antifungal activity of *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np in yogurt suggests that an additive and/or synergistic effect between *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np and yogurt starters occurred, while such an effect was not observed for the other antifungal strains. The yogurt starters probably increased the antifungal effect via the production of lactic acid concomitant to a strong pH decrease (final pH of 4.1) that probably participated in

the inhibition of acid sensitive fungi such as *D. hansenii* and *R. mucilaginosa*. However, this was certainly not the main mechanism of action since no significant differences were observed in pH, lactic and acetic acid concentrations between yogurts. Moreover, acetic and lactic acid concentrations were below their minimal inhibitory concentration toward the tested fungi. The strong antifungal effect of *Lb. harbinensis* compared to the other antifungal strains was rather linked to the production of other metabolites. It seems that either the synthesis or the activity of the antifungal molecules was potentiated in the presence of yogurt starters. In other words, the growth and metabolic activities of yogurt starters created a more favorable environment for the expression of the antifungal activity induced by *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np.

It is the first time that such a synergistic effect is described between *Lactobacillus harbinensis* and yogurt starters. Generally, mixed cultures of *Propionibacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. are necessary to provide an effective antifungal effect in dairy products (Schwenninger & Meile 2004; Suomalainen & Mäyrä-Mäkinen, 1999; El-Shafei, Abd El-Gawad, Dabiza, Sharaf & Effat, 2008). Until now, most of active antifungal strains in fermented milk products were related to the *Lactobacillus casei* group (*Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Lb. rhamnosus*). The *Lb. harbinensis* species has been described in 2005 (Miyamoto et al. 2005) and was originally isolated from a Chinese fermented vegetable product. To our best knowledge, this is the first time that a strain of *Lb. harbinensis* with antifungal properties is described.

Lb. harbinensis K.V9.3.1Np is a good candidate for food preservation. Complementary studies are actually performed in our laboratory in order to elucidate the mechanisms of action and the modulation of its antifungal activity in fermented milks.

Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of the french National Agency for Research (ANR) program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), and the French ministry of higher education and research. We thank Geneviève Héry-Arnaud for giving us access to the apparatus Microflex LT MALDI-TOF.

References

- Ashraf, R., & Shah, N. P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 194-208.
- Berger, B., Pridmore, R. D., Barretto, C., Delmas-Julien, F., Schreiber, K., Arigoni, F., & Brüssow, H. (2007). Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology*, 189, 1311–1321.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.
- Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M., & Cogan, T. M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 820 -830.
- Communiqué. (2009). *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (Edition de Janvier). Société Française de

Microbiologie. http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2009-1.pdf 50 pp.

- Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1–11.
- Delavenne, E., Mounier, J., Déniel, F., Barbier, G., & Le Blay, G. (2012). Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155, 185–190.
- El-Shafei, K., Abd El-Gawad, M. A. M., Dabiza, N., Sharaf, O. M., & Effat, B. A. (2008). A mixed culture of *Propionibacterium thoenii* P-127, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* as protective cultures in kareish cheese. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58, 433–441.
- Felis, G. E., Dellaglio, F., Mizzi, L., & Torriani, S. (2001). Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 2113–2117.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33, 85–102.
- Hartemink, R., Domenech, V., & Rombouts, F. (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 29, 77–84.
- Khurana, H., & Kanawjia, S. (2007). Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, 3, 91–108.

- Mayoral, M. B., Martín, R., Sanz, A., Hernández, P. E., González, I., & García, T. (2005). Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 27-34.
- Miyamoto, M., Seto, Y., Hai Hao, D., Teshima, T., Bo Sun, Y., Kabuki, T., Bing Yao, L., 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. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, 688–694.
- Mills, S., Stanton, C., Hill, C., & Ross, R. (2011). New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 299–329.
- Naser, S. M., Thompson, F. L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M., & Swings, J. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology*, 151, 2141–2150.
- Randazzo, C. L., Torriani, S., Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M., & Vaughan, E. E. (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1882–1892.
- Rodas, A., Ferrer, S., & Pardo, I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 197–207.

- Salih, M., Sandine, W., & Ayres, J. (1990). Inhibitory effects of Microgard™ on yogurt and cottage cheese spoilage organisms. *Journal of Dairy Science*, 73, 887–893.
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 70–78.
- Schwenninger, S. M., & Meile, L. (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 229–237.
- Suomalainen, T. H., & Mäyrä-Mäkinen, A. M. (1999). Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Le Lait*, 79, 165–174.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Tawfik, N. F., Sharaf, O. M., Effat, B. A., & Mahanna, N. S. (2004). Preserving Domiati cheese using metabolites of *Propionibacterium thoenii* P-127. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 13, 269–272.
- Vanhaverbeke, C., Bosso, C., Colin-Morel, P., Gey, C., Gamar-Nourani, L., Blondeau, K., Simonet, J. M., et al. (1998). Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Carbohydrate Research*, 314, 211–220.
- Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 37–44.

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., et al. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487–495.

CHAPITRE IV

Modulation de l'activité antifongique de *Latobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I *in situ*

1. Introduction

A ce jour, peu de cultures protectrices adaptées aux produits laitiers fermentés sont disponibles sur le marché alors qu'il s'agit d'une alternative intéressante aux conservateurs chimiques. Pour être utilisée en tant que culture bio-protectrice, une souche bactérienne doit être compétitive au sein de l'aliment dans lequel on souhaite l'ajouter. Elle doit s'implanter sans avoir d'effet antagoniste vis-à-vis des ferments et doit exprimer son activité inhibitrice au sein de la matrice d'intérêt (Holzapfel *et al.*, 1995).

Dans l'étude précédente (Chapitre III), les activités antifongiques de 11 souches de lactobacilles ont été évaluées dans le yaourt contre 6 contaminants fongiques rencontrés fréquemment dans les altérations des yaourts. Parmi ces 11 souches, 2 souches, *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I et *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, se sont montrées particulièrement actives en inhibant 6 et 3 cibles fongiques, respectivement. Dans cette étude, l'effet antifongique des souches dans le yaourt avait été étudié dans une seule condition expérimentale standardisée (taux d'inoculations des souches protectrices et des contaminants, temps de fermentation, taux de sucre). Or, on sait que l'activité antimicrobienne d'une bactérie dans un aliment peut varier en fonction des conditions environnementales, qu'elles soient biotiques ou abiotiques (Pfeiler and Klaenhammer, 2007 ; Rouse *et al.*, 2008 ; Schillinger and Villareal, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010). En effet, les interactions avec les autres microorganismes présents dans l'écosystème, les nutriments disponibles et les paramètres technologiques mis en jeu lors de la fabrication des aliments, peuvent affecter positivement ou négativement la croissance et/ou l'activité métabolique des ferments lactiques (Masle and Morgan, 2001). Par exemple, Vinderola *et al.* (2002) ont montré que l'ajout de 15 % de saccharose diminuait significativement la croissance de certaines souches de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (*S. thermophilus*) et de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*). L'hypothèse que des facteurs biotiques ou abiotiques puissent également moduler l'activité inhibitrice des souches présentant un effet protecteur peut être émise. Les travaux de Guerra *et al.* (2001) ont montré notamment que, *in vitro*, les productions de nisine et de pédiocine étaient réduites en présence de concentrations importantes d'azote total et de sucre. D'autre part,

Dallagnol *et al.* (2011) ont mis en évidence que des concentrations plus élevées de phénylalanine et de tyrosine dans le milieu de fermentation augmentaient significativement les concentrations d'acides phényllactique et hydroxyphényllactique, qui sont des composés antifongiques.

Parmi les champignons responsables d'altérations des yaourts et des produits laitiers en général, *Yarrowia lipolytica* est une levure fréquemment rencontrée (Viljoen, 2001). Elle est en effet bien adaptée à ce type de produit car elle est capable de croître à faible pH et d'utiliser le lactate et les acides aminés comme sources de carbone et d'énergie (Mansour *et al.*, 2008). De plus, des travaux précédents (Chapitre III) ont montré qu'une seule souche de lactobacille parmi les 11 souches testées était capable d'exercer une activité antagoniste contre cette levure.

L'objectif de cette étude a été de déterminer, à l'aide d'un plan d'expérience, l'influence (i) du temps de fermentation, (ii) de l'ajout de saccharose, (iii) du taux d'inoculation des souches protectrices et (iv) du taux de contamination de *Y. lipolytica*, sur l'activité bio-protectrice de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I et *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np.

2. Matériels et méthodes

2.1 Souches

2.1.1 Cible fongique

Y. lipolytica LMSA 2.11.004 est issue de la « Souchothèque de Bretagne » (Université de Brest, Plouzané, France). Cette levure a été conservée à -80°C dans un milieu YEMA (yeast extract and malt based medium) supplémenté en glycérol (30 %, v/v). Elle était cultivée sur milieux gélosés YEMA ou YEGC (Yeast extract glucose chloramphenicol) en aérobiose à 25°C. Les suspensions utilisées pour contaminer les yaourts ont été préparées dans de l'eau stérile à partir de colonies prélevées sur boîtes de Pétri. Les cellules ont été dénombrées avec une cellule de Malassez puis ont été ajustées à 10⁴ cellules/ml.

2.1.2 Bactéries lactiques antifongiques

Lb. harbinensis K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I ont été isolées lors d'un criblage à partir respectivement de lait de vache et de lait de chèvre. Elles étaient conservées à -80°C dans du milieu MRS (AES Chemunex, Bruz, France) avec 30 % de glycérol (v/v) et cultivées en bouillon MRS. Pour la préparation des inocula ajoutés dans le yaourt, les souches étaient d'abord cultivées dans du bouillon MRS jusqu'à atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance (17 heures). Un volume adéquat des cultures était ensuite centrifugé 10 min à 10000g, puis les cellules étaient lavées avec de l'eau peptonée (0.1 %) avant d'être resuspendues dans du lait pasteurisé demi-écrémé (Lait frais demi-écrémé pasteurisé GrandLait, Candia, France), pour obtenir une concentration de 10^8 UFC/ml.

2.2 Plan d'expérience

Les effets du saccharose (absence *vs* présence), de l'inoculation avec une seule souche ou un mélange des deux souches antifongiques *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, de la durée de fermentation (3h *vs* 6h) et du taux de contamination (100 *vs* 1000 UFC/pot) par *Y. lipolytica*, sur l'inhibition de ce contaminant ont été étudiés dans un modèle yaourt. Pour ce faire, la fabrication et la contamination des yaourts ont été conduites selon un plan d'expérience de type factoriel fractionné construit sur 5 facteurs : ajout de saccharose, inoculation de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, inoculation de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, durée de fermentation, et taux de contamination fongique, notés respectivement A, B, C, D et E. A chaque facteur étaient associés deux niveaux codés : une valeur basse (-1) et une valeur haute (+1), comme indiquées dans le tableau 1. Dans cette étude, l'expérimentation a été répartie en deux blocs correspondants au plan (bloc 1) et à la répétition de ce plan (bloc 2). Le plan d'expérience est une fraction du plan complet de 5 facteurs à 2 niveaux, soit 2^{5-1} essais par bloc, ce qui permet, en un nombre limité d'essais (réduction du plan complet 2^5 de moitié), d'évaluer les effets des facteurs et des interactions entre 2 facteurs, en considérant que les interactions entre 3 facteurs, et plus, sont négligeables. Chaque bloc était constitué de 16 essais ainsi que de 4 essais (répétitions)

correspondants à un point central. Pour les facteurs B, C, D et E, les niveaux des points centraux (codés 0) sont équidistants des niveaux (-1) et (+1). Dans cette étude, 8 répétitions du point central ont été faites, ou plus exactement, 4 répétitions avec du lait nature et 4 répétitions avec du lait sucré (Tableau 1), le facteur nature/sucré étant considéré dans cette étude comme un facteur qualitatif. Ces points centraux sont utilisés afin, d'une part, de définir un manque d'ajustement éventuel du modèle polynomial proposé et, d'autre part, de préciser, dans une démarche séquentielle d'optimisation, la direction de la plus grande pente (Box and Hunter, 1957).

Tableau 1. Valeurs attribuées à chaque niveau (-1, +1 et 0) associé aux différents facteurs (A, B, C, D et E) étudiés. Le niveau 0 correspond aux points centraux de l'expérience.

		-1	+1	0
A	Saccharose	0	10 %	
B	<i>Lb. harbinensis</i> K.V9.3.1Np	0	5.10 ⁶ UFC/ml	2,5.10 ⁶ UFC/ml
C	<i>Lb. rhamnosus</i> K.C8.3.1I	0	5.10 ⁶ UFC/ml	2,5.10 ⁶ UFC/ml
D	Durée de fermentation	3 heures	6 heures	4,5 heures
E	Taux de contamination	100 UFC	1000 UFC	500 UFC

Un essai est défini par un niveau donné pour chacun des 5 facteurs et toutes les combinaisons de niveaux sont effectuées au cours de l'expérimentation (Tableau 2).

Tableau 2. Essais réalisés et combinaisons de niveaux des 5 facteurs associées. Les essais surlignés correspondent aux points centraux de l'expérience.

Bloc	Essai	A	B	C	D	E
1	1	+1	+1	+1	+1	-1
	2	-1	0	0	0	0
	3	-1	+1	+1	-1	-1
	4	+1	0	0	0	0
	5	+1	-1	-1	+1	-1
	6	-1	+1	-1	+1	-1
	7	-1	+1	+1	+1	+1
	8	-1	0	0	0	0
	9	+1	-1	-1	-1	+1
	10	-1	-1	-1	-1	-1
	11	+1	-1	+1	+1	+1
	12	-1	-1	+1	+1	-1
	13	-1	-1	+1	-1	+1
	14	-1	-1	-1	+1	+1
2	21	+1	0	0	0	0
	22	+1	-1	-1	+1	+1
	23	+1	+1	+1	-1	-1
	24	+1	-1	+1	-1	+1
	25	-1	0	0	0	0
	26	-1	+1	+1	-1	+1
	27	-1	-1	+1	+1	+1
	28	-1	0	0	0	0
	29	-1	+1	-1	+1	+1
	30	-1	-1	-1	+1	-1
	31	+1	+1	-1	-1	+1
	32	-1	+1	-1	-1	-1
	33	-1	+1	+1	+1	-1
	34	+1	-1	-1	-1	-1

Tableau 2 (suite)

Bloc	Essai	A	B	C	D	E
1	15	+1	-1	+1	-1	-1
	16	-1	+1	-1	-1	+1
	17	+1	+1	-1	-1	-1
	18	+1	0	0	0	0
	19	+1	+1	+1	-1	+1
	20	+1	+1	-1	+1	+1
Bloc	Essai	A	B	C	D	E
2	35	+1	0	0	0	0
	36	+1	+1	+1	+1	+1
	37	+1	+1	-1	+1	-1
	38	-1	-1	-1	-1	+1
	39	-1	-1	+1	-1	-1
	40	+1	-1	+1	+1	-1

2.3 Analyses statistiques des résultats

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Statgraphics plus (Statistical Graphics Corp., VA, USA). La réponse Y calculée dans cette expérience était la croissance de *Y. lipolytica*.

Lorsque l'effet d'un facteur est significatif, et que cet effet est positif, la réponse augmente à mesure que les niveaux du facteur augmentent. Si nous limitons l'étude à la détermination des effets des facteurs et des interactions entre deux facteurs, la réponse Y est supposée suivre une régression polynomiale de premier ordre, dont l'équation est : $Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j$ où a_0 est la valeur moyenne de la réponse, a_i est le coefficient du facteur X_i (effet principal/2) dans un plan factoriel à 2^k essais, où k représente le nombre de facteurs testés (dans cette étude k=5). a_{ij} est le coefficient de l'interaction entre les deux facteurs $X_i X_j$ (interaction d'effet/2). Les estimations de ces coefficients sont calculées par approximation des moindres carrés (Box *et al.*, 1978). Dans le plan 2^{5-1} , 16 effets sont estimés : le terme constant a_0 , les effets principaux des facteurs A, B, C, D, et E, ainsi que les interactions de degré 1 AB, AC, AD, AE, BC, BD, BE, CD, CE et DE.

La variance expérimentale est utilisée pour calculer les écart-types des effets des facteurs et des interactions précédemment détaillés, qui sont donc tous égaux. Ces écart-types fournissent des statistiques t de Student et les probabilités correspondantes, indiquant la signification des effets. Des signes (+) et (-) sont affectés aux principaux effets et interactions d'effets, selon qu'ils sont positifs ou négatifs. Ceux-ci sont inclus dans la régression pour calculer la réponse Y maximale prédite (Box *et al.*, 1978).

2.4 Préparation des yaourts

Les yaourts ont été fabriqués à partir de lait demi-écrémé pasteurisé additionné de poudre de lait écrémé (4 %) (Lait en poudre écrémé, Casino, France) et de teinture de tournesol (6 ‰) (RAL, Martillac, France). Ce lait supplémenté a été réparti en deux lots de 500 ml, et l'un des deux a été additionné en saccharose 10 % (Sucre en poudre, Carrefour, France) pour les essais correspondants aux yaourts sucrés. Les deux lots (sucré, non sucré) ont ensuite été chauffés 30 min à 85°C, puis refroidis rapidement à 45°C avant d'être inoculés avec des ferments lactiques commerciaux (ferments lyophilisés pour yaourt brassé, Nat-Ali, Nantes, France), comprenant les espèces *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. Les laits, naturels et sucrés, ont ensuite été répartis dans des pots de 100 ml correspondants aux différents essais à raison de 27, 28,5 ou 30 ml en fonction du volume de culture ajouté par la suite et sachant que le volume final était de 30 ml. Selon la combinaison de facteurs associée à chaque essai, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et/ou *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, préparés à une concentration de 10^8 UFC/ml dans du lait, ont été ou non inoculés dans les pots à une concentration de $5 \cdot 10^6$ UFC/ml (essais) ou $2,5 \cdot 10^6$ UFC/ml (points centraux). La fermentation a ensuite été menée durant 3, 4,5 ou 6 heures en fonction de la combinaison de valeurs attribuée à chaque essai. Après refroidissement à 10°C, les yaourts ont été contaminés en surface par 100, 500 ou 1000 cellules de *Y. lipolytica*, puis stockés pendant 6 semaines à 10°C. Parallèlement, ces mêmes quantités de *Y. lipolytica* ont été déposées sur des milieux gélosés YEGC incubés à 10°C et 25°C pour contrôler la viabilité et la croissance de la levure.

2.5 Estimation de la croissance de *Y. lipolytica* à la surface des yaourts

La croissance de la levure a été suivie visuellement chaque semaine pendant les six semaines de stockage. A la fin de cette période, chaque yaourt (30 g) a été dilué au dixième dans 270 ml d'eau peptonée stérile (0,1 ‰) dans un sac stomacher (Fisher Scientific, Illkirch, France), puis cette préparation a été homogénéisée pendant 1 minute (Stomacher® Mix 1, AES Laboratoire, Combourg, France). Une série de dilutions au dixième a ensuite été effectuée à partir de cette suspension. Cent microlitres de chacune des dilutions (10^{-1} à 10^{-7}) ont étéensemencés en duplicat

sur un milieu gélosé YEGC. La levure a été énumérée après 48 heures d'incubation à 25°C. Le seuil de détection était de 100 UFC/g soit de $2 \log_{10}$ UFC/g.

2.6 Vérification de la croissance des souches bactériennes

Les énumérations bactériennes ont été réalisées sur des milieux spécifiques additionnés d'amphotéricine B (5,6 mg/l) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), avec les dilutions réalisées pour chaque yaourt. Les lactobacilles ont été énumérés sur milieu MRS acidifié à pH 5.5 (Randazzo *et al.*, 2002), la souche antifongique sur milieu LAMVAB (Hartemink *et al.*, 1997), et *S. thermophilus* sur milieu M17 additionné de 0,5 % de lactose (Tabasco *et al.*, 2007 ; Ashraf and Shah, 2011).

3. Résultats

3.1 Erreur résiduelle et analyse statistique

Au niveau statistique, il n'a pas été possible de faire de test d'ajustement ou de préciser la direction de la plus grande pente car le point central a donné les mêmes valeurs pour les 8 essais correspondants. Plus précisément, aucune croissance de *Y. lipolytica* n'a été observée sur les essais correspondants aux points centraux.

Par contre, le fait de travailler sur 2 journées n'a pas eu d'incidence sur les résultats (effet bloc non significatif).

3.2 Acidification et croissance des bactéries lactiques

Le pH a été déterminé dans des yaourts avec les ferments lactiques uniquement, mais permet une comparaison des pH après 3 heures et après 6 heures de fermentation, dans des yaourts naturels et sucrés. Le pH était similaire entre yaourts naturels et sucrés, après 3 heures et 6 heures de fermentation, et la différence de pH après 3 heures et 6 heures de fermentation était de 0,6 unités de pH (Figure 1).

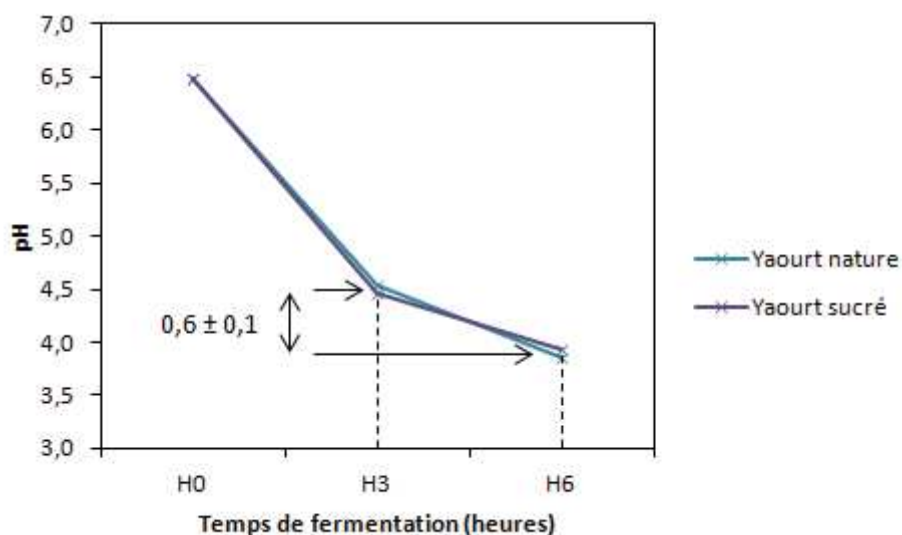


Figure 1. Evolution du pH pendant la fermentation à 42°C de lait nature et sucré (10 % de saccharose) ensemencé avec *Lb. bulgaricus* et *S. thermophilus*.

Les concentrations des souches antagonistes ont été évaluées après six semaines de stockage à 10°C. Dans tous les yaourts supplémentés, les souches antagonistes se sont développées. La concentration de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np était comprise entre 6,9 (essai 1) et 8,6 log₁₀ UFC/g (essai 17), et celle de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I entre 8,3 (essais 2, 3, 7, 12, 18, 25 et 33) et 9,0 log₁₀ UFC/g (essai 39). La concentration finale de *Lb. bulgaricus* dans les yaourts non supplémentés par l'une et/ou l'autre des souches antagonistes était comprise entre 6,0 (essai 22) et 6,9 log₁₀ UFC/g (essais 9 et 14) mais n'a pas pu être évaluée dans les yaourts supplémentés avec l'une ou l'autre des souches antagonistes. *S. thermophilus* a été dénombré dans tous les essais à une concentration comprise entre 6,0 (essais 14 et 38) et 8,1 log₁₀ UFC/g (essai 4) (Tableau 3).

Tableau 3. Concentrations des souches bactériennes (ferments et souches antagonistes) dans les yaourts après six semaines de stockage à 10°C. Chaque yaourt (essai) est associé à une combinaison de valeurs (–1, 0, +1) des 5 facteurs A (saccharose), B (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np), C (*Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I), D (durée de fermentation) et E (taux de contamination).

			Facteurs					Concentration (log ₁₀ UFC/g)			
			A	B	C	D	E	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lb. harbinensis</i> K.V9.3.1Np	<i>Lb. rhamnosus</i> K.C8.3.1Hcl
Bloc 1	Essai	1	+1	+1	+1	+1	–1	7,8	< 7 [†]	6,9	8,5
		2	–1	0	0	0	0	7,6	< 7	7,6	8,3
		3	–1	+1	+1	–1	–1	7,9	< 7	7,7	8,3
		4	+1	0	0	0	0	8,1	< 7	7,4	8,4
		5	+1	–1	–1	+1	–1	7,5	6,6		
		6	–1	+1	–1	+1	–1	6,4	< 7	8,1	
		7	–1	+1	+1	+1	+1	7,4	< 7	7,5	8,3
		8	–1	0	0	0	0	7,3	< 7	7,5	8,2
		9	+1	–1	–1	–1	+1	7,5	6,9		
		10	–1	–1	–1	–1	–1	7,2	nd [‡]		
		11	+1	–1	+1	+1	+1	7,1	< 7		8,5
		12	–1	–1	+1	+1	–1	7,2	< 7		8,3
		13	–1	–1	+1	–1	+1	6,6	< 7		8,5
		14	–1	–1	–1	+1	+1	6,0	6,9		
		15	+1	–1	+1	–1	–1	6,8	< 7		8,8
		16	–1	+1	–1	–1	+1	7,3	< 7	8,3	
		17	+1	+1	–1	–1	–1	6,8	< 7	8,6	
		18	+1	0	0	0	0	7,5	< 7	7,5	8,3
		19	+1	+1	+1	–1	+1	7,2	< 7	8,0	8,6
		20	+1	+1	–1	+1	+1	6,8	< 7	8,1	
Bloc 2	Essai	21	+1	0	0	0	0	8,0	< 7	7,3	8,6
		22	+1	–1	–1	+1	+1	6,8	6,0		
		23	+1	+1	+1	–1	–1	7,5	< 7	7,8	8,6
		24	+1	–1	+1	–1	+1	7,4	< 7		8,7
		25	–1	0	0	0	0	7,4	< 7	7,3	8,3
		26	–1	+1	+1	–1	+1	7,8	< 7	8,0	8,5
		27	–1	–1	+1	+1	+1	7,3	< 7		8,8
		28	–1	0	0	0	0	8,0	< 7	7,2	8,4
		29	–1	+1	–1	+1	+1	6,8	< 7	8,1	
		30	–1	–1	–1	+1	–1	7,0	6,5		
		31	+1	+1	–1	–1	+1	7,2	< 7	8,3	
		32	–1	+1	–1	–1	–1	7,8	< 7	8,3	

Tableau 3 (suite)

Bloc	2	Essai	33	Facteurs					Concentration (log ₁₀ UFC/g)			
				A	B	C	D	E	<i>S. thermophilus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	<i>Lb. harbinensis</i> K.V9.3.1Np	<i>Lb. rhamnosus</i> K.C8.3.1Hcl
			33	-1	+1	+1	+1	-1	7,5	< 7	7,3	8,3
			34	+1	-1	-1	-1	-1	6,3	6,4		
			35	+1	0	0	0	0	7,5	< 7	7,3	8,4
			36	+1	+1	+1	+1	+1	7,1	< 7	7,2	8,6
			37	+1	+1	-1	+1	-1	6,7	< 7	8,1	
			38	-1	-1	-1	-1	+1	6,0	6,5		
			39	-1	-1	+1	-1	-1	7,1	< 7		9,0
			40	+1	-1	+1	+1	-1	7,7	< 7		8,8

[†] La méthode utilisée ne permettait pas de dénombrer *Lb. bulgaricus* dans les yaourts supplémentés avec *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et/ou *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I.

[‡] Non déterminée.

3.3 Effet des facteurs sur la croissance de *Y. lipolytica*

Les observations visuelles après six semaines de stockage à 10°C, corrélées aux données des combinaisons de facteurs, ont montré que *Y. lipolytica* s'était développé à la surface des yaourts nonensemencés avec *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Au contraire, aucune croissance de *Y. lipolytica* n'a été détectée dans les yaourtsensemencés avec *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, à l'exception de l'essai 36 (présence de saccharose, présence de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, présence de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, fermentation de 6 heures, 1000 UFC de *Y. lipolytica*), où *Y. lipolytica* a atteint une population de 3,4 log₁₀ UFC/g (Tableau 4).

L'analyse statistique a révélé que *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np est le seul facteur responsable de la variance des résultats. Plus exactement, seul *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np a eu un effet inhibiteur significatif sur la croissance de *Y. lipolytica*. Inversement, aucun des autres facteurs testés n'avait d'effet significatif (Figure 2).

Tableau 4. Concentration de *Y. lipolytica* dans tous les essais (1 à 40), exprimée en $\log_{10}$ UFC/g. Chaque essai est associé à une combinaison de valeurs (-1, 0, +1) des 5 facteurs A (saccharose), B (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np), C (*Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I), D (durée de fermentation) et E (taux de contamination).

Bloc	1	Essai	Facteurs					<i>Y. lipolytica</i> ($\log_{10}$ UFC/g)
			A	B	C	D	E	
Bloc 1	1	Essai 1	+1	+1	+1	+1	-1	< 2 [†]
		2	-1	0	0	0	0	< 2
		3	-1	+1	+1	-1	-1	< 2
		4	+1	0	0	0	0	< 2
		5	+1	-1	-1	+1	-1	7,8
		6	-1	+1	-1	+1	-1	< 2
		7	-1	+1	+1	+1	+1	< 2
		8	-1	0	0	0	0	< 2
		9	+1	-1	-1	-1	+1	7,9
		10	-1	-1	-1	-1	-1	8,3
		11	+1	-1	+1	+1	+1	6,5
		12	-1	-1	+1	+1	-1	7
		13	-1	-1	+1	-1	+1	7,6
		14	-1	-1	-1	+1	+1	7,6
		15	+1	-1	+1	-1	-1	7,3
		16	-1	+1	-1	-1	+1	< 2
		17	+1	+1	-1	-1	-1	< 2
		18	+1	0	0	0	0	< 2
		19	+1	+1	+1	-1	+1	< 2
		20	+1	+1	-1	+1	+1	< 2
Bloc 2	2	Essai 21	+1	0	0	0	0	< 2
		22	+1	-1	-1	+1	+1	8
		23	+1	+1	+1	-1	-1	< 2
		24	+1	-1	+1	-1	+1	7,2
		25	-1	0	0	0	0	< 2
		26	-1	+1	+1	-1	+1	< 2
		27	-1	-1	+1	+1	+1	7,9
		28	-1	0	0	0	0	< 2
		29	-1	+1	-1	+1	+1	< 2
		30	-1	-1	-1	+1	-1	8,5
		31	+1	+1	-1	-1	+1	< 2
		32	-1	+1	-1	-1	-1	< 2
		33	-1	+1	+1	+1	-1	< 2

Tableau 4 (suite)

Bloc	2	Essai		Facteurs					<i>Y. lipolytica</i> (log ₁₀ UFC/g)
				A	B	C	D	E	
			34	+1	-1	-1	-1	-1	7,9
			35	+1	0	0	0	0	< 2
			36	+1	+1	+1	+1	+1	3,4
			37	+1	+1	-1	+1	-1	< 2
			38	-1	-1	-1	-1	+1	8,2
			39	-1	-1	+1	-1	-1	8,1
			40	+1	-1	+1	+1	-1	6,8

† Une concentration < 2 log₁₀ UFC/g signifie que la population de *Y. lipolytica* était sous le seuil de détection de la méthode de dénombrement utilisée.

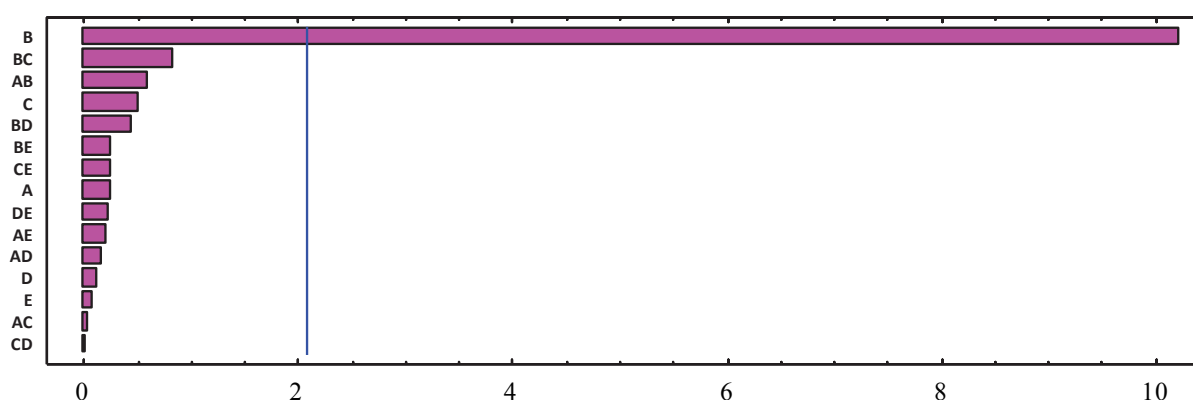


Figure 2. Diagramme de Pareto représentant l'effet standardisé des différents facteurs et différentes interactions de facteurs sur la croissance de *Y. lipolytica*. A, facteur sucre ; B, facteur *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np , C, facteur *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I ; D, facteur durée de fermentation ; E, facteur taux de contamination. La ligne bleue indique le seuil à partir duquel l'effet est significatif. L'échelle des abscisses représente l'effet centré réduit (en valeur absolue) de chaque facteur et des interactions d'ordre 1.

La modélisation de l'effet négatif du facteur *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np sur la croissance de *Y. lipolytica* montre qu'il est extrêmement significatif (Figure 3). On voit que la croissance de *Y. lipolytica* diminue parallèlement à l'augmentation du niveau du facteur (lié à la présence de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np). Au niveau -1 (absence de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np), la croissance de *Y. lipolytica* est forte, au niveau +1 (présence de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np), sa croissance est nulle ou quasiment nulle.

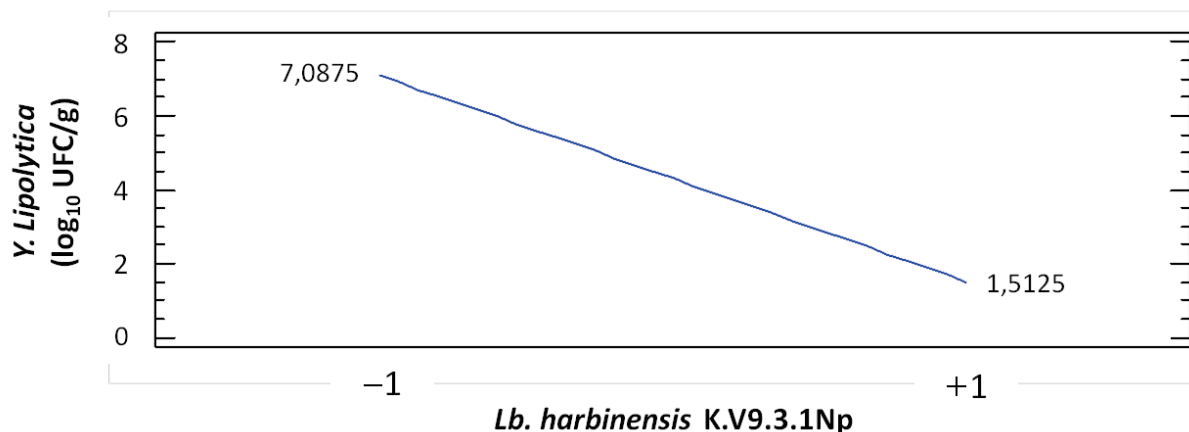


Figure 3. Modélisation de l'effet principal du facteur B (*Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np) sur la croissance de *Y. lipolytica*.

En moyenne, la concentration de *Y. lipolytica* sur l'ensemble de l'expérience est égale à $4,3 \log_{10} \text{UFC/g}$ (a_0) avec un coefficient de variation égal à $(0,244/4,3) \%$. Les valeurs des coefficients des facteurs A, B, C, D et E sont respectivement $-0,06$, **$-2,7875$** , $-0,1375$, $-0,03125$ et $0,01875$. Finalement, l'équation du modèle ajusté aux données, et réduite aux effets principaux (les termes d'interaction étant non significatifs) est donc : $Y (\log_{10} \text{UFC/g}) = 4,3 - 2,7875 \times B$, le facteur B pouvant prendre les valeurs -1 et $+1$.

La croissance de *Y. lipolytica* n'a pas été influencée significativement par *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I ou par une interaction entre *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I et l'un ou l'autre des facteurs testés. Ainsi, il n'y a pas d'effet de synergie visible entre ces deux souches dans la réponse étudiée. De même, aucun des facteurs testés n'a entraîné d'interaction significative (positive ou négative) sur l'activité antagoniste exercée par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np sur *Y. lipolytica*.

4. Discussion

Dans un modèle yaourt, deux souches de lactobacilles présentant un effet protecteur potentiel pour ce type de produit ont été sélectionnées. Dans l'étude précédente (Chapitre III), *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np inhibait complètement *Y. lipolytica*, tandis que *Lb. rhamnosus*

K.C8.3.1I n'avait montré qu'une faible activité. L'objectif de cette étude a été d'évaluer l'effet modulateur de facteurs technologiques, seuls ou en interactions, sur la croissance de *Y. lipolytica*, et par conséquent sur l'activité antifongique des deux souches sélectionnées.

L'addition de saccharose ou le temps de fermentation sont des paramètres technologiques susceptibles de varier en fonction du type de yaourt désiré. Or, une concentration en saccharose de 10 % abaisse significativement l'activité de l'eau et peut affecter négativement la croissance et l'activité acidifiante des ferments lactiques (Vinderola *et al.*, 2002 ; Béal and Sodini, 2003). Dans notre étude, une supplémentation de 10 % en saccharose n'a eu aucune incidence sur la cinétique d'acidification des ferments lactiques pendant la fermentation. D'autre part, les populations des ferments lactiques et des souches antifongiques étaient identiques après la période de stockage, avec ou sans ajout de saccharose. Enfin, cette supplémentation n'a pas eu d'effet significatif sur l'activité antifongique de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Cette donnée peut présenter un intérêt industriel dans la mise en œuvre de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np car le saccharose, au cours du procédé de fabrication, pourrait être ajouté en une seule fois avant fermentation sans perturber l'activité antifongique de la souche. D'après les analyses statistiques, l'addition de saccharose n'a pas eu non plus d'influence sur la croissance de *Y. lipolytica*. Cette levure est incapable d'utiliser le saccharose car elle ne possède pas d'invertase (Moeller *et al.*, 2011). On peut se demander quel aurait été l'effet d'un tel ajout sur d'autres champignons capables de l'assimiler facilement comme source de carbone et d'énergie et si ce paramètre aurait eu un impact sur le pouvoir antagoniste de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. On peut également faire l'hypothèse que, pour des champignons moins xérotolérants, l'addition de saccharose renforcerait l'effet antifongique d'une souche protectrice.

La réduction du temps de fermentation n'a pas affecté l'activité antifongique de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Il serait intéressant de connaître à quel stade de la croissance sont produites les molécules impliquées dans l'inhibition et si la température de stockage a également un effet sur la production de ces métabolites. Par exemple, Rouse *et al.* (2008) ont montré que l'activité

antifongique de *Lb. plantarum* CM8 sur milieu gélosé était plus importante à 25 ou à 30°C qu'à 21°C, alors que la croissance était identique.

Dans certains produits fermentés, il est impératif que les souches bio-protectrices n'exercent pas d'effet antagoniste sur les ferments utilisés, au risque d'avoir un effet délétère sur le processus de fermentation et/ou de détériorer les qualités organoleptiques du produit (Gálvez *et al.*, 2007). Il a été montré, par exemple, que des bactéries lactiques productrices de bactériocines étaient capables d'inhiber partiellement des ferments commerciaux, les bactéries lactiques thermophiles étant plus sensibles que les bactéries lactiques mésophiles (Oumer *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'activité acidifiante et la croissance des ferments n'ont pas été modifiées, ce qui signifierait que le ou les métabolites antifongiques produits par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np n'ont pas d'effet significatif sur la croissance des ferments. Il serait néanmoins intéressant de vérifier l'absence d'activité antagoniste sur d'autres ferments commerciaux.

A sa plus faible concentration (6,9 log₁₀ UFC/g, contre une concentration maximale de 8,6 log₁₀ UFC/g), *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np a exercé son activité antagoniste contre *Y. lipolytica*. De même, une inhibition totale par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np a été observée, qu'elle qu'ait été la concentration initiale de *Y. lipolytica*. Ceci montre que *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np possède un fort effet protecteur bien que la majeure partie des altérations dans les yaours et les laits fermentés soient la résultante de contaminations aéroportées impliquant un nombre peu élevé de cellules.

Son effet pourrait être intéressant pour éviter les contaminations liées aux matières contaminées, et notamment aux préparations de fruits, tels que les myrtilles, qui sont extrêmement sensibles aux contaminations fongiques et qui supportent mal les traitements thermiques (Penney *et al.*, 2004).

Lb. harbinensis K.V9.3.1Np semble donc être une souche très prometteuse pour une utilisation dans la bio-protection du yaourt et éventuellement d'autres produits laitiers fermentés. Cependant d'autres travaux doivent également être menés pour élucider les mécanismes d'action et vérifier son innocuité.

Références

- Ashraf, R. and Shah, N.P.** (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology* **149**, 194-208.
- Béal, C. and Sodini, I.** (2003). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés F6 315*, 1–16.
- Box, G.E.P. and Hunter, J.S.** (1957). Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. *Annals of Mathematical Statistics* **28**, 195–241.
- Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S.** (1978). *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, John Wiley & sons, New-York.
- Dallagnol, A.M., Catalán, C.A.N., Mercado, M.I., Font de Valdez, G. and Rollán, G. C.** (2011). Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 1447–1455.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. and Omar, N.B.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 51–70.
- Guerra, N.P., Rua, M.L. and Pastrana, L.** (2001). Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *International Journal of Food Microbiology* **70**, 267–281.
- Hartemink, R., Domenech, V. and Rombouts, F.** (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods* **29**, 77–84.
- Holzappel, W., Geisen, R. and Schillinger, U.** (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 343–362.
- Mansour, S., Beckerich, J. and Bonnarme, P.** (2008). Lactate and amino acid catabolism in the cheese-ripening yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 6505–6512.
- Masle, I. and Morgan, F.** (2001). Aptitude du lait de chèvre à l'acidification par les ferments lactiques-Facteurs de variation liés à la composition du lait. *Le Lait* **81**, 561–569.

- Moeller, L., Zehnsdorf, A., Aurich, A., Bley, T. and Strehlitz, B.** (2011). Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–8.
- Oumer, A., Garde, S., Gaya, P., Medina, M. and Nunez, M.** (2001). The effects of cultivating lactic starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* **64**, 81–86.
- Penney, V., Henderson, G., Blum, C. and Johnson-Green, P.** (2004). The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 369–375.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R.** (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* **15**, 546–553.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M. and Vaughan, E.E.** (2002). Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1882–1892.
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. and Sinderen, D.** (2008). Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 915–923.
- Schillinger, U. and Villarreal, J.V.** (2010). Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* **21**, 107–111.
- Tabasco, R., Paarup, T., Janer, C., Peljez, C. and Requena, T.** (2007). Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal* **17**, 1107–1114.
- Vinderola, C., Costa, G., Regenhardt, S. and Reinheimer, J.** (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal* **12**, 579–589.
- Viljoen, B.C.** (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 37–44.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bao, Y. and Zhang, H.** (2010). Influence of pH, heat and enzymatic treatments on the activity of antibacterial substance in MRS and milk media produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China* **9**, 911–920.

DISCUSSION GENERALE

De par leur omniprésence dans les produits laitiers fermentés, leur innocuité et leurs propriétés physiologiques, technologiques et antimicrobiennes, les bactéries lactiques, et plus particulièrement celles du genre *Lactobacillus*, semblent être de bonnes candidates pour la bio-protection des produits laitiers fermentés. L'utilisation des bactéries lactiques comme culture protectrice apparaît comme une solution parfaitement envisageable pour améliorer la DLC et/ou remplacer les conservateurs chimiques dans ces produits.

Pourquoi utiliser les bactéries lactiques comme cultures protectrices ?

Les produits laitiers fermentés sont sujets aux contaminations fongiques, ce qui limite leur stabilité microbiologique, notamment à l'export où les risques de rupture de la chaîne du froid sont plus importants. Bien que les chiffres des pertes réelles ne soient pas connus, les conséquences économiques des contaminations fongiques ne sont pas négligeables (Mayoral *et al.*, 2005). Les industriels laitiers sont donc à la recherche de méthodes de conservation efficaces, répondant aux attentes des consommateurs qui recherchent des produits savoureux, stables, possédant des DLC allongées, si possible bénéfiques pour leur santé, et dépourvus de conservateurs chimiques. Ces derniers (sorbate de potassium, natamycine, etc.), utilisés dans certains produits laitiers fermentés, véhiculent une mauvaise image auprès des consommateurs, et ont tendance à perdre de leur efficacité en raison de l'augmentation des résistances observées chez de nombreux champignons (Brul and Coote, 1999 ; Viljoen, 2001). De plus, la législation européenne tend à limiter leur utilisation, et les industriels laitiers restreignent donc leur usage au maximum.

Qu'est-ce que la bio-conservation ?

La bio-conservation consiste à ajouter à un aliment une culture simple ou mixte de microorganisme(s) ou une molécule purifiée d'origine microbienne en vue d'augmenter sa DLC (Ross *et al.*, 2002). Cette stratégie de conservation s'applique parfaitement aux produits laitiers fermentés par des bactéries lactiques, dont certaines possèdent des propriétés antimicrobiennes, interviennent dans l'acidification et parfois dans l'affinage, et présentent un intérêt considérable

pour leur bio-conservation. La recherche de microorganismes antifongiques s'est donc concentrée sur les bactéries lactiques, dont le potentiel antifongique a été mis en exergue depuis quelques années (Schnürer and Magnusson, 2005).

Dans ce contexte, l'objectif général du projet était d'obtenir une ou plusieurs souche(s) de bactéries lactiques utilisables pour la bio-conservation de produits laitiers fermentés tels que les laits fermentés, les yaourts ou les fromages frais.

Le lait est-il un réservoir de bactéries lactiques antifongiques ?

Le point de départ de ce projet a consisté à constituer une importante collection de bactéries lactiques antifongiques susceptibles d'être compétitives dans une matrice laitière. Pour cela, les colonies présentant une activité antifongique contre 4 contaminants fongiques (*K. lactis*, *P. anomala*, *M. plumbeus* et *P. expansum*) fréquemment rencontrés dans les produits laitiers fermentés ont été systématiquement isolées à partir d'échantillons de lait cru de vache, de chèvre et de brebis. Cette étude a permis de montrer que les échantillons de lait cru de vache et de chèvre étaient des réservoirs de bactéries lactiques antifongiques, contrairement au lait de brebis. De plus, l'influence significative du milieu d'isolement des bactéries, de la période d'échantillonnage, et du champignon ciblé sur l'activité antifongique et sur la diversité des bactéries lactiques isolées, a été mise en évidence.

Comme il a été montré dans la littérature et confirmé dans cette étude, le milieu de criblage a une influence considérable sur l'activité et la diversité des bactéries antifongiques isolées. La présence d'inhibiteurs (acétate de sodium, pH acide, température d'incubation, etc.) donnant leur sélectivité aux milieux choisis, la diversité des souches capables d'y croître, ainsi que la nature des substrats présents (glucose, protéines, etc.) influencent le métabolisme bactérien et par conséquent la production de molécules antifongiques.

Dans les conditions testées, nous avons remarqué que, selon l'espèce d'origine (vache, chèvre ou brebis) des échantillons de lait, les proportions de bactéries antifongiques pouvaient être très différentes. Ainsi, les échantillons de lait de brebis ont induit une très faible proportion (0,5 % *vs*

2,5 % et 1,8 % pour les vaches et les chèvres) de bactéries lactiques antifongiques. Bien qu'il soit difficile d'apporter une explication définitive à cette différence, le test n'ayant pas été fait dans des conditions suffisamment standardisées, l'absence d'ensilage dans la ration alimentaire des brebis semble être une hypothèse raisonnable expliquant la faible proportion de bactéries lactiques antifongiques retrouvées dans le lait de brebis. En effet l'ensilage est une source déjà mise en évidence de bactéries lactiques antifongiques (Broberg *et al.*, 2007 ; Kalač, 2011).

Les données du criblage ont également révélé une différence de sensibilité des cibles fongiques aux différentes souches antifongiques ainsi qu'une dépendance entre taxons bactériens et cibles fongiques. Ces dépendances étaient fort probablement liées à la sensibilité des cibles fongiques aux différents acides produits par les bactéries lactiques suite à la fermentation du glucose présent dans les milieux utilisés (Lind *et al.*, 2005). *Pichia anomala*, la cible fongique la plus difficilement inhibée, l'était majoritairement par des souches hétérofermentaires strictes appartenant au groupe *Lactobacillus buchneri*. Les tests de sensibilité des champignons aux acides (chapitre III) montrent bien l'effet antifongique des acides lactique et acétique, et plus particulièrement de l'acide acétique. Ils confirment également la forte résistance de *P. anomala* à ces acides. En revanche, la forte sensibilité de *P. expansum* observée lors du criblage n'était pas uniquement due aux effets des acides, car *P. expansum* était, avec *P. anomala*, l'une des souches fongiques testées la plus résistante aux acides lactique et acétique. D'autres molécules antagonistes étaient donc probablement impliquées.

Une modification de la proportion des souches lactiques inhibant des champignons particuliers a également été observée au cours des différentes périodes d'échantillonnage. Par exemple, le groupe *Lb. plantarum* était sur-représenté dans les isolats inhibant *K. lactis*, dans les laits de chèvre de la première période d'échantillonnage. Ainsi, la sur-représentation de bactéries ciblant un champignon plutôt qu'un autre dans certains laits et à certaines périodes d'échantillonnage, a conduit à supposer un impact de la présence des champignons sur l'expression de l'activité antifongique des bactéries lactiques.

Existe-t-il un effet inducteur des champignons présents dans les échantillons de lait ?

L'étude de la biodiversité fongique dans les laits a donc été effectuée parallèlement à l'isolement des souches lactiques antifongiques. La D-HPLC a été choisie pour analyser la biodiversité fongique des échantillons de lait récoltés durant la première période de collecte car elle permet de séquencer les fractions collectées et ainsi d'identifier les champignons présents (Mounier *et al.*, 2010). L'objectif était également de mettre en évidence un lien entre la concentration fongique totale et le nombre de bactéries lactiques antifongiques isolées dans un même échantillon. Bien que la proportion de bactéries lactiques antifongiques isolées ait été bien plus importante à partir des laits de vache que des laits de brebis, les concentrations fongiques n'étaient pas significativement différentes dans les laits de vache que dans les laits de brebis. Cependant, il a été observé que la diversité de bactéries lactiques antifongiques et la diversité fongique étaient plus élevées dans les laits de vache que dans les laits de chèvre et de brebis.

La D-HPLC a permis d'identifier les champignons majoritaires des échantillons, et les champignons détectés dans cette étude correspondaient majoritairement à ceux évoqués dans la littérature. Cette étude a ainsi permis de confirmer la présence de champignons dans les laits crus analysés, et d'évaluer leur diversité. Cependant, aucun lien direct entre l'isolement de bactéries lactiques inhibant une cible fongique et la forte présence simultanée de cette cible dans un échantillon de lait n'a pu être démontré. A l'exception de l'espèce *Kluyveromyces lactis*, retrouvée dans les échantillons de laits dans lesquels les bactéries actives contre cette espèce étaient sur-représentées, la D-HPLC n'a pas permis de mettre en évidence les espèces spécifiquement retenues dans le criblage. Il est donc probable que les espèces ciblées (*P. anomala* notamment) n'étaient pas présentes en concentration suffisante dans les échantillons de laits analysés pour être détectées par la D-HPLC. Cependant, seuls les échantillons de la première semaine de chaque période d'échantillonnage ont été testés et l'analyse aurait pu être élargie à l'ensemble des prises d'échantillonnages. On a fait l'hypothèse que l'ensilage pouvait être la source principale des bactéries lactiques antifongiques isolées lors du criblage. Or, ce biotope est fortement colonisé par des champignons filamenteux et des levures (O'Brien *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant

d'étudier le lien entre les champignons retrouvés et l'activité antifongique des bactéries lactiques présentes dans l'ensilage.

Les souches antifongiques isolées sont-elles actives in situ ?

Le yaourt, dont la production peut être facilement reproduite en laboratoire, a été choisi comme modèle d'étude afin de répondre à notre objectif principal qui était d'obtenir une culture protectrice pour des produits laitiers fermentés frais. Les champignons ont donc été plus spécifiquement retenus en fonction de cette matrice. Ainsi, *Y. lipolytica*, *D. hansenii*, *R. mucilaginosa*, *K. lactis*, *K. marxianus* et *P. brevicompactum* ont été choisis car ils sont fréquemment rencontrés dans les altérations des yaourts aux fruits (Mayoral *et al.*, 2005). L'effet protecteur des souches antifongiques a été évalué par la quantification des champignons après six semaines de stockage à 10°C suite à la fabrication et à la contamination des yaourts. Cette température est supérieure à la température de 6 °C qui doit être appliquée dans des conditions de réfrigération adaptées à ce type de produit et la durée a été choisie pour dépasser la DLC des yaourts qui est de 4 semaines.

Comme il a été montré par la première étude (Chapitre I), l'environnement d'une bactérie joue un rôle considérable dans l'expression de son activité. Les substrats disponibles ainsi que les microorganismes environnants ont des conséquences plus ou moins importantes sur la croissance et le métabolisme des bactéries. Toutes les souches de la collection ont été, à la base, sélectionnées pour leur capacité à inhiber les champignons sur milieux de culture. La plupart des isolats provenaient de milieux à base de MRS, connu pour potentialiser l'action des acides organiques grâce à son contenu en acétate (Schillinger and Villarreal, 2010). Ces conditions sont très éloignées de celles rencontrées dans un environnement tel que le lait. Les différences de paramètres de croissance et de nutriments disponibles peuvent induire des différences dans la croissance des souches et dans les molécules qu'elles produisent. Il est donc difficile de prédire l'efficacité, au sein d'un produit laitier, d'une souche qui aura présenté des activités antifongiques en milieu de laboratoire. Les 11 isolats ont été sélectionnés parmi la collection en fonction de

l'intensité de leur activité et de leur spectre d'action en milieu de laboratoire, il était donc nécessaire d'évaluer leur activité antifongique *in situ*.

Bien qu'ayant choisi des milieux permettant la sélection de tous les genres de bactéries lactiques potentiellement présents dans le lait cru, la collection de bactéries lactiques constituée dans la première étude comprenait une majorité de souches appartenant au genre *Lactobacillus* et plus particulièrement au groupe *Lb. casei*. C'est le groupe le plus fréquent parmi les lactobacilles du lait (Medina *et al.*, 2001 ; Franciosi *et al.*, 2009), mais c'est également un de ceux le plus fréquemment décrit dans les activités antifongiques des bactéries lactiques (Schnürer and Magnusson, 2005). Or dans cette étude, bien que 10 souches parmi les 11 sélectionnées appartenaient à ce genre, c'est finalement une souche appartenant à l'espèce *Lb. harbinensis* qui a révélé la plus forte activité antifongique dans le yaourt.

Quels sont les paramètres du procédé de fabrication pouvant influencer sur l'activité antifongique in situ ?

Afin d'affiner l'étude de l'activité de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np au sein du yaourt, ainsi que celle de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I, l'influence de la variation de certains facteurs clefs du procédé industriel de production de yaourt, seuls ou en interaction, a été évaluée sur la croissance de *Y. lipolytica*, et par conséquent sur l'activité des deux souches sélectionnées. La faible activité antifongique de *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I sur *Y. lipolytica* nous a conduits à choisir ce champignon comme cible dans cette dernière étude. La présence de 10 % de saccharose, le temps de fermentation et le taux de contamination ainsi que la présence ou l'absence de chacune des souches ont été les facteurs choisis. Dans cette étude, le seul facteur ayant eu un effet significatif sur la croissance de *Y. lipolytica* a été la présence de la souche *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Cette souche n'a pas présenté d'influence négative sur les ferments, qui, eux-mêmes, n'ont pas affecté son activité antagoniste. Ni l'addition de saccharose, ni la réduction du temps de fermentation n'ont présenté d'impact sur l'activité de cette souche, et ces données confirment l'intérêt de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np en vue de son utilisation industrielle. L'activité de cette souche est maintenue en présence d'une quantité initiale de cellules fongiques plus élevée. Ceci laisse

présager que son utilisation éventuelle pourrait être efficace aussi bien dans le cas de contaminations aéroportées, où la quantité de cellules ou spores fongiques initiaux est relativement faible, que dans le cas de contaminations dues à l'incorporation de matières premières contaminées, tels que les fruits ou les préparations de fruits. Le risque d'altération de ces produits est en effet élevé, de par leur forte sensibilité aux contaminations fongiques, et leur faible résistance aux traitements thermiques (Penney *et al.*, 2004). De plus l'activité antifongique de cette souche n'a pas été affectée par l'ajout de 10 % de saccharose. On peut supposer que cette activité antagoniste sera maintenue dans un yaourt aux fruits, lesquels peuvent contenir jusqu'à 20 % de sucre.

Lb. harbinensis K.V9.3.1Np présente donc un fort effet protecteur et semble intéressante pour une utilisation dans la bio-conservation du yaourt. L'isolement de cette espèce à partir du lait est une nouveauté. Celle-ci n'a effectivement été décrite que très récemment (Miyamoto *et al.*, 2005) et a été isolée d'un produit fermenté chinois à base de choux. Parmi les souches identifiées dans la collection, seules 6 appartenaient à l'espèce *Lb. harbinensis*. La croissance lente de la souche *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np dans le lait pourrait expliquer la faible occurrence de cette espèce lors du criblage. Cependant, malgré cette faible capacité à croître dans le lait, cette souche présente une forte activité antifongique. Ainsi, il ne semble pas nécessaire à une souche active d'être compétitive dans le lait pour présenter une activité antifongique.

Ni cette espèce, ni aucune espèce du groupe phylogénétique auquel elle appartient (*Lb. perolens*) n'ont jusqu'à présent été citées dans des études sur les activités antifongiques de bactéries lactiques. On remarque d'ailleurs que les espèces de lactobacilles les plus actives citées appartiennent majoritairement aux groupes *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* et *Lb. plantarum*. La découverte de l'activité antifongique de cette espèce est donc innovante, et les résultats obtenus dans ce projet de thèse ouvrent la voie à de nombreuses études complémentaires. Les recherches devront notamment être approfondies afin de déterminer le mécanisme impliqué dans l'activité

de cette souche. L'influence de l'environnement microbien semble jouer un rôle prépondérant dans son activité. La comparaison des résultats obtenus dans le lait et dans le yaourt a mis en évidence un fort effet synergique entre les ferments et *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. D'autres molécules que les acides lactique et acétique semblent également être impliquées dans l'effet inhibiteur de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Notamment, des résultats préliminaires obtenus en collaboration avec l'un des partenaires du projet ANR-Fuginib (UR1268, INRA, Nantes) semblent indiquer la forte implication de l'acide caproïque dans l'inhibition des contaminants fongiques. Des études préliminaires ont montré que l'acide caproïque était produit par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np parallèlement à l'épuisement du glucose dans un milieu à base de MRS enrichi en protéines laitières. Associée à la lipolyse et au catabolisme des acides aminés (Ganesan *et al.*, 2004), il est possible que la synthèse d'acides gras, tels que l'acide caproïque, dans le lait, soit favorisée en présence des ferments, qui peuvent par exemple, fournir les acides aminés ou peptides nécessaires à *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, que cette souche ne trouve pas lorsqu'elle est seule dans le lait. Cependant, l'analyse des composés présents dans le yaourt, et notamment de l'acide caproïque, n'a pas encore été réalisée.

Ces résultats devront être confirmés par d'autres analyses, notamment en remplaçant *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np dans le yaourt et dans le lait par l'acide caproïque au taux retrouvé avec *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. Comme dans l'étude de Dallagnol *et al.* (2006), des intermédiaires métaboliques de la croissance des ferments dans le yaourt, et notamment des peptides ou acides aminés, pourront être ajoutés dans un lait inoculé par *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np afin de tester leur effet sur l'activité antagoniste de cette souche et sur sa production de molécules antifongiques. Il sera nécessaire d'évaluer son efficacité avec d'autres ferments, mais également dans d'autres matrices laitières, contenant par exemple différents taux de matière grasse. Il serait également intéressant de déterminer à partir de quel taux d'inoculation la souche présente son efficacité. Un plan d'expérience monofactoriel testant l'effet de la concentration de la souche à une gamme étendue est envisagé. Enfin, l'étude de son spectre d'action devra être élargie à d'autres espèces de champignons et souches de même espèces. Il faudra également

déterminer si *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np reste efficace lorsque la contamination a lieu au cours du stockage, bien après la fabrication du produit.

L'espèce *Lb. harbinensis* ne possède pas d'historique de consommation avant mai 1997. En vue d'une application industrielle, et selon la réglementation en vigueur, cette espèce entrerait théoriquement dans la catégorie « Novel food » (Wessels *et al.*, 2004). Une attention particulière devra ainsi être portée sur l'évaluation de l'innocuité de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np. L'absence de production d'amines biogènes au sein des produits laitiers fermentés devra notamment être vérifiée. Comme pour les dix autres souches testées (Chapitre III), *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np ne porte *a priori* pas de résistances aux antibiotiques problématiques. Bien entendu, en vue d'une utilisation commerciale, le spectre d'antibiotiques testés devra être élargi. Par ailleurs, l'évaluation sensorielle des produits dans laquelle cette souche sera introduite pourra également être envisagée.

Conclusion

Ce projet, dont l'objectif principal était de développer une culture bio-protectrice antifongique adaptée aux produits laitiers fermentés a permis : (i) de connaître la biodiversité des lactobacilles antifongiques présents dans des échantillons de lait de trois espèces laitières au cours d'une année et de montrer que les laits de vache et de chèvre sont des réservoirs en bactéries lactiques antifongiques ; (ii) de connaître en parallèle la biodiversité fongique dans ces mêmes laits, sans pour autant mettre en évidence de lien entre les bactéries lactiques antifongiques et les champignons présents dans les laits ; (iii) de caractériser et de tester l'activité antifongique de 11 souches de lactobacilles dans un modèle yaourt et (iv) de déterminer l'influence des facteurs intervenant dans la production des yaourts et le niveau de contamination fongique sur l'activité antifongique de deux souches actives, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np et *Lb. rhamnosus* K.C8.3.1I. Finalement, ce projet a permis de mettre en avant une souche particulière, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, ayant montré une forte activité antifongique dans le yaourt malgré sa faible capacité

à croître dans le lait. Le laboratoire envisage de poursuivre l'étude approfondie de cette souche et notamment de comprendre comment son activité peut être modulée au sein des produits laitiers fermentés, et de mieux appréhender son mécanisme d'action. L'objectif final est de concrétiser son application en tant que culture bio-protectrice de produit(s) laitier(s) fermenté(s).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

- Aarestrup, F.M.** (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **96**, 271–281.
- Abriouel, H., Martin-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E. and Martinez-Bueno, M.** (2008). Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **127**, 200–208.
- Acedo-Félix, E. and Pérez-Martínez, G.** (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 67–75.
- Agroscope** (s. d.). Denrées alimentaires d'origine animale dans la nutrition : différents composants du lait. Disponible sur : http://www.db-alp.admin.ch/fr/ueberuns/faq_detail.php?id=278 (page consultée le 11 janvier 2012).
- Aguirre, M. and Collins, M.** (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Microbiology* **75**, 95–107.
- Al-Zoreky, N., Ayres, J. and Sandine, W.** (1991). Antimicrobial activity of Microgard™ against food spoilage and pathogenic microorganisms. *Journal of Dairy Science* **74**, 758–763.
- Ammor, M.S., Belen Florez, A. and Mayo, B.** (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* **24**, 559–570.
- Ampuero, S. and Bosset, J.** (2003). The electronic nose applied to dairy products: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **94**, 1–12.
- Angelov, M., Kostov, G., Simova, E., Beshkova, D. and Koprinkova-Hristova, P.** (2009). Proto-cooperation factors in yogurt starter cultures. *Revue de Génie Industriel* **3**, 4–12. Disponible sur : <http://www.revue-genie-industriel.info>
- ANSES** (2002). Recommandations du 22 novembre 2002 « Recommandations pour la présentation des données permettant l'évaluation de l'innocuité des microorganismes utilisés dans le secteur agro-alimentaire (souches nouvelles ou modifiées, application différente de souches déjà utilisées) ». Disponible sur : <http://www.anses.fr/Documents/MIC2001sa0311.pdf>

ANSES (2008). Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria Monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible sur : http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/shelflife_listeria_monocytogenes_en.pdf

Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S. and Clementi, F. (2007). Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 948–960.

Ardo, Y. (2006). Flavour formation by amino acid catabolism. *Biotechnology Advances* **24**, 238–242.

Armaforte, E., Carri, S., Ferri, G. and Caboni, M.F. (2006). High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. *Journal of Chromatography A* **1131**, 281–284.

Arrêté du 2 octobre 1997 relatif aux additifs pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. Disponible sur : www.legifrance.gouv.fr

Atanassova, M., Choiset, Y., Dalgalarrrondo, M., Chobert, J.M., Dousset, X., Ivanova, I. and Haertle, T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 63–73.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 3e Ed. Marcel Dekker, Inc, New-York, 1–66.

- B -

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D., Tornadijo, M. and Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* **21**, 343–349.

Banina, A., Vukasinovic, M., Brankovic, S., Fira, D., Kojic, M. and Topisirovic, L. (1998). Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 593–599.

Béal, C. and Sodini, I. (2003). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. *Techniques de l'ingénieur. Bioprocédés* **F6 315**, 1–16.

Bekal, S., Belguesmia, Y., Drider, D. & Prévost, H. (2009). Le citrate. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries lactiques: physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles*, Economica, 51-72.

- Beresford, T. and Williams, A.** (2004). The microbiology of cheese ripening. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3e Ed., Elsevier Academic Press, London, 1, 287–317.
- Berger, B., Pridmore, R.D., Barretto, C., Delmas-Julien, F., Schreiber, K., Arigoni, F. and Brüssow, H.** (2007). Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. *Journal of Bacteriology* **189**, 1311–1321.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, O. and Thormar, H.** (2001). In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 3209–3212.
- Bernardeau, M., Guguen, M. and Vernoux, J.P.** (2006). Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 487–513.
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. and Guéguen, M.** (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 278–285.
- Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M. and Cogan, T.M.** (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 820–830.
- Brillet, A., Pilet, M.F., Drider, D. and Prevost, H.** (2005). La biopréservation : une technologie innovante de conservation des aliments. *Revue Générale du Froid* **1053**, 32–35.
- Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S. and Dellaglio, F.** (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argenteratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 1629–1634.
- Broberg, A., Jacobsson, K., Ström, K. and Schnürer, J.** (2007). Metabolite profiles of lactic acid bacteria in grass silage. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 5547–5552.
- Brul, S. and Coote, P.** (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 1–17.

- C -

- Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. and Montel, M.C.** (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 172–180.

- Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R. and Montel, M.C.** (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* **30**, 547–560.
- Calvez, E.** (2006). *L'économie laitière en France et dans le monde: approche géographique*. Presses universitaires de Rennes.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F.** (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 131–149.
- CA-SFM** (2010). Recommandation 2010, édition de janvier 2010. Disponible sur : http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/CASFM/casfm_2010.pdf
- Chamba, J.F. and Irlinger, F.** (2004). Secondary and adjunct cultures. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3e Ed., Elsevier Academic Press, London, **1**, 191–206.
- Chamba, J.F.** (2009). Les bactéries lactiques : historique et perspectives. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles*, Economica, 1-14.
- Chen, L., Wang, N., Wang, X., Hu, J. and Wang, S.** (2010). Characterization of two anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B10. *Bioresource Technology* **101**, 8822–8827.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M. and Le Blay, G.** (2007). Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiology* **7**, 101.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L.** (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 1–20.
- CNIEL** (2011). L'économie laitière en chiffres. Disponible sur : <http://asp.zone-secure.net/v2/index.jsp?id=24/34/15296&lng=fr> (consulté le 17 octobre 2011).
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G.** (2002). An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* **12**, 407–411.
- CODEX Alimentarius Commission** (2003). CODEX standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. Disponible sur : www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf

- Collins, M., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J., Martinez-Murcia, A., Phillips, B., Williams, A. and Wallbanks, S.** (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters* **77**, 5–12.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H. and Wilkinson, M.G.** (2003). Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* **13**, 841–866.
- Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M. and Sinigaglia, M.** (2001). Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 147–152.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**, 253–256.
- Cousin, M.A.** (2002). Moulds in dairy products. In Roginski H. (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Elsevier Science Ltd, USA, 2072-2078.
- Crielly, E.M., Logan, N.A. and Anderton, A.** (1994). Studies on the *Bacillus* flora of milk and milk products. *Journal of Applied Microbiology* **77**, 256-263.

- D -

- Dal Bello, F., Clarke, C., Ryan, L., Ulmer, H., Schober, T., Strom, K., Sjogren, J., Van Sinderen, D., Schnurer, J. and Arendt, E.** (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science* **45**, 309–318.
- Dalié, D., Deschamps, A. and Richard-Forget, F.** (2010). Lactic acid bacteria-Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* **21**, 370–380.
- Dallagnol, A.M., Catalán, C.A.N., Mercado, M.I., Font de Valdez, G. and Rollán, G.C.** (2011). Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778. *Journal of Applied Microbiology* **111**, 1447–1455.
- Daly, C., Fitzgerald, G.F. and Davis, R.** (1996). Biotechnology of lactic acid bacteria with special reference to bacteriophage resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 99-110.
- Danielsen, M. and Wind, A.** (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 1–11.

- Davidson, M.P.** (2001). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, ASM press, Washington, 593-627.
- Deák, T.** (2008). *Handbook of food spoilage yeasts*, 2e Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, LLC, New-York.
- Deblanc, C., Linel, D. and Brocart, J.-L.** (2010). *Baraques, cabanes et autres vacheries*. Ed. Mardaga.
- Décret n°89-674** du 18 septembre 1989 relatif aux additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine. Disponible sur : www.legifrance.gouv.fr
- Dellaglio, F., Dicks, L.M.T., Du Toit, M. and Torriani, S.** (1991). Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989). Request for an opinion. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 340 -342.
- Dellaglio, F., Felis, G.E. and Torriani, S.** (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 285–287.
- De Muynck, C., Leroy, A.I.J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. and Vandamme, E.J.** (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research* **159**, 339–346.
- Desai, A., Shah, N.P. and Powell, I.** (2006). Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. *Journal of Dairy Science* **89**, 3345–3351.
- Desmazeaud, M.** (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Le lait* **63**, 267–316.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L. and Debevere, J.** (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal* **14**, 273–285.
- De Vuyst, L. and Degeest, B.** (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 153–177.
- De Vuyst, L. and Leroy, F.** (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**, 194-199.

- Dicks, L.M.T., Du Plessis, E.M., Dellaglio, F. and Lauer, E.** (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 337 -340.
- Directive 89/107/CEE** (1989) du Conseil du 21 décembre 1988, relative au rapprochement des législations des États membres concernant les additifs pouvant être employés dans les denrées destinées à l'alimentation humaine. Journal officiel n° 40 du 11/02/1989, modifiée par la Directive 94/34/CE.
- Directive 93/113/CE** (1993) du Conseil du 14 décembre 1993, relative à l'utilisation et à la commercialisation des enzymes, des micro-organismes et de leurs préparations dans l'alimentation des animaux. Journal officiel n° L 334 du 31/12/1993 p. 0017 – 0023.
- Directive 95/2/CE** (1995) du Parlement européen et du Conseil du 20 février 1995, concernant les additifs alimentaires autres que les colorants et les édulcorants. Journal officiel n° L 61 du 18/03/1995, modifiée par la Directive 98/72/CE.
- Directive 2000/13/CE** (2000) du Parlement européen et du Conseil du 20 mars 2000, relative au rapprochement des législations des États membres concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires ainsi que la publicité faite à leur égard. Journal officiel n° L 109 du 06/05/2000, modifiée par la Directive 2006/142/CE.
- Doleyres, Y.** (2003). Production en continu de ferments lactiques probiotiques par la technologie des cellules immobilisées. Thèse, Université de Laval, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation, Département des Sciences des aliments de de nutrition, Quebec.
- Dortu, C.** (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Académie Universitaire Wallonie-Europe. Belgique.
- Dortu, C. and Thonart, P.** (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* **13**, 143–154.
- Douaud, C.** (2007). Yoghurt drinks lead food market growth. *DairyReporter.com*. Disponible sur : <http://www.dairyreporter.com/Markets/Yoghurt-drinks-lead-food-market-growth> (consulté le 21 décembre 2011).
- Doyle, M.P. and Busta, F.F.** (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5**, 71–137.

- Drakoularakou, A.P., Kehagias, C., Karakanas, P., Koulouris, S. and Timbis, D.** (2003). A study of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in bovine, ovine and caprine milk. *International journal of dairy technology* **56**, 59–61.
- Drouault, S. and Corthier, G.** (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Veterinary Research* **32**, 101–117.
- Duan, J., Park, S.I., Daeschel, M. and Zhao, Y.** (2007). Antimicrobial chitosan-lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of Mozzarella cheese. *Journal of Food Science* **72**, M355–M362.
- Durlu-Özkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E.** (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 861–870.
- Durlu-Özkaya, F., Karabicak, N., Kayali, R. and Esen, B.** (2005). Inhibition of yeasts isolated from traditional Turkish cheeses by *Lactobacillus* spp. *International Journal of Dairy Technology* **58**, 111–114.
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P. and Gruss, A.** (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology* **183**, 4509-4516.

- E -

- EFFCA** (2011). Definition of microbial food culture (MFC). EFFCA/2011/25. Disponible sur : <http://www.effca.org/content/microbial-food-culture> (consulté le 21 novembre 2011).
- EFSA** (2009). Scientific opinion of the panel on biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *EFSA Journal*, **712**, 1-93.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S. and Mykkanen, H.** (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3545–3549.
- El-Shafei, K., Abd El-Gawad, M.A.M., 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. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **58**, 433–441.

Erdogan, A., Gurses, M. and Sert, S. (2003). Isolation of moulds capable of producing mycotoxins from blue mouldy Tulum cheeses produced in Turkey. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 83–85.

- F -

Fadda, M., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M. and Cosentino, S. (2010). Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology* **136**, 376–380.

Faye, B. and Loiseau, G. (2000). Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. *Actes atelier int. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité, Montpellier, France* 11–13.

FEEDAP (2008). Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* **732**, 1-15.

Felis, G.E. and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **8**, 44–61.

Filtenborg, O., Frisvad, J.C. and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 85–102.

Fleet, G. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Microbiology* **68**, 199–211.

Florianowicz, T. (2001). Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology* **212**, 282–286.

Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J.S., Manning, S.D. and Marrs, C.F. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* **2**, 10–17.

Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* **19**, 3–11.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. and Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* **47**, 1–24.

Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. and Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 1398–1407.

- G -

- Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N. and Narvhus, J.A.** (2001). The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *International Journal of Food Microbiology* **68**, 21–32.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R.L. and Omar, N.B.** (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* **120**, 51–70.
- Ganesan, B., Seefeldt, K., Koka, R.C., Dias, B. and Weimer, B.C.** (2004). Monocarboxylic acid production by lactococci and lactobacilli. *International Dairy Journal* **14**, 237–246.
- Gänzle, M.G., Höltzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W.P.** (2000). Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4325–4333.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M.A., Paparella, A. and Suzzi, G.** (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausages: effect on the biogenic amine content. *Meat Science* **61**, 275–283.
- Garneau, J.E. and Moineau, S.** (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories* **10**, S20.
- Gatti, M., Trivisano, C., Fabrizi, E., Neviani, E. and Gardini, F.** (2004). Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 182–190.
- Gaya, P., Babín, M., Medina, M. and Nuñez, M.** (1999). Diversity among lactococci isolated from ewes' raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 849–855.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G. and Font de Valdez, G.** (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* **20**, 144–148.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J.** (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **205**, 31–36.
- Golubev, W.I.** (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In Rosa, C., Péter, G. (Eds.), *The yeast handbook, Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, Springer, Germany, 197–219.
- Gould, G.** (1995). Biodeterioration of foods and an overview of preservation in the food and dairy industries. *International Biodeterioration & Biodegradation* **36**, 267–277.
- Gould, G.W.** (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 51–64.

- Gourama, H. and Bullerman, L.** (1997). Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplatantarum*. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 131–143.
- Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L. and Lacroix, C.** (2008). Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science & Technology* **88**, 421–444.
- Gratz, S., Taubel, M., Juvonen, R., Viluksela, M., Turner, P., Mykkanen, H. and El-Nezami, H.** (2006). *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 7398–7400.
- Guillot, A., Gitton, C., Anglade, P. and Mistou, M.Y.** (2003). Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* **3**, 337–354.
- Gwiazdowska, D. and Trojanowska, K.** (2006). Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *shermanii*. *Le Lait* **86**, 141–154.

- H -

- Hadji-Sfaki, I., El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Batdorj, B., Le Blay-Laliberté, G., Barbier, G., Haertlé, T. and Chobert, J.M.** (2011). Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4. 1 isolated from Mongol yogurt. *Food Control* **22**, 2020–2027.
- Hansen, E.B.** (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* **78**, 119–131.
- Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpää, P.E., Salminen, S. and Ahokas, J.T.** (2001). Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3086–3091.
- Hassan, Y.I. and Bullerman, L.B.** (2008). Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 112–115.
- Heinz, V., Alvarez, I., Angersbach, A. and Knorr, D.** (2001). Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields–basic concepts for process design. *Trends in Food Science & Technology* **12**, 103–111.
- Helander, I., Von Wright, A. and Mattila-Sandholm, T.** (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology* **8**, 146–150.
- Hemme, D. and Foucaud-Scheunemann, C.** (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* **14**, 467–494.

- Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F.** (1992). *Les groupes microbiens d'intérêt laitier*. CEPIL, Paris.
- Herrera, P., Kwon, Y.M. and Ricke, S.C.** (2009). Ecology and pathogenicity of gastrointestinal *Streptococcus bovis*. *Anaerobe* **15**, 44–54.
- Heuberger, C.** (2005). Cyanide content of cassava and fermented products with focus on attiéké and attiéké garba. *Dissertation*, Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Switzerland.
- Holzappel, W., Geisen, R. and Schillinger, U.** (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 343–362.
- Holzappel, W.** (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* **8**, 241–258.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. and Schillinger, U.** (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* **73**, 365S.
- Holzappel, W.** (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 197–212.
- Hugenholtz, J., Sybesma, W., Nierop Groot, M., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., van Sinderen, D., Piard, J.C., Eggink, G., Smid, E.J., et al.** (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**, 217–235.
- Huis in't Veld, J.H.J.** (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *International Journal of Food Microbiology* **33**, 1–18.
- Hummel, A.S., Hertel, C., Holzappel, W.H. and Franz, C.M.A.P.** (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 730–739.
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M.** (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **167**, 101–134.

- I -

- IDF** (1988). Code of practices for the preservation of raw milk by the lactoperoxidase system. *Bulletin of the International Dairy Federation* **234**, 1-15.

- J -

- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B.** (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **59**, 171–200.
- Jakobsen, M. and Narvhus, J.** (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* **6**, 755–768.
- Jamet, E.** (2009). Les bactéries lactiques : une composante de l'écosystème microbien des fromages. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries Lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Economica, 319–348.
- Jenssen, H. and Hancock, R.E.W.** (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* **91**, 19–29.
- Jespersen, L. and Josephsen, J.** (2004). Starter cultures and fermented products. In Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Hansen, Å.S., Josephsen, J., Nip, W.-K., Stanfield, P.S., Toldrá, F. (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, Marcel Dekker, Inc., 27–59.
- Joshi, S., Bharucha, C. and Desai, A.J.** (2008). Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology* **99**, 4603–4608.

- K -

- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P. and Cogan, T.M.** (2007). *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* **114**, 243–251.
- Kalač, P.** (2011). The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chemistry* **125**, 307–317.
- Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T. and Katikou, P.** (2005). Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. *Food Control* **16**, 257–261.
- Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Sun, X., Punj, V., Matta, H., Morley, S.M., Parratt, A., Puri, M. and Sehgal, R.** (2009). Molecular and biotechnological advances in milk proteins in relation to human health. *Current Protein and Peptide Science* **10**, 308–338.
- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix, C. and Meile, L.** (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 145–155.

- Kavitha, S., Senthilkumar, S., Gnanamanickam, S., Inayathullah, M. and Jayakumar, R.** (2005). Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16. *Process Biochemistry* **40**, 3236–3243.
- Khurana, H. and Kanawjia, S.** (2007). Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science* **3**, 91–108.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G.** (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 103–125.
- Knorr, D.** (1998). Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology* **9**, 295–306.
- Korhonen, H., Marnila, P. and Gill, H.** (2000). Milk immunoglobulins and complement factors. *British Journal of Nutrition* **84**, 75–80.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V., Pinto, C., Egounlety, M., Sossa, C., Mbugua, S., Dortu, C., Thonart, P., Taljaard, L., et al.** (2007). Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* **114**, 342–351.
- Küçükoner, E. and Tarakçı, Z.** (2004). Influence of different fruit additives on some properties of stirred yoghurt during storage. *Milchwissenschaft* **59**, 159–160.

- L -

- Lado, B.H. and Yousef, A.E.** (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection* **4**, 433–440.
- Laitila, A., Alakomi, H., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A.** (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds *in vitro* and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 566–576.
- LaPointe, G.** (2009). La production d'exopolysaccharides. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Economica, 73–98.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobbetti, M.** (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4084–4090.
- Lavermicocca, P., Valerio, F. and Visconti, A.** (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 634–640.

- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D. and Brugère, H.** (1999). Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Médecine Vétérinaire* **150**, 413–430.
- Leistner, L.** (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181–186.
- Leroy, F. and De Vuyst, L.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67–78.
- Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L.** (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 270–285.
- Leuschner, R.G.K., Robinson, T.P., Hugas, M., Cocconcelli, P.S., Richard-Forget, F., Klein, G., Licht, T.R., Querol, A., Richardson, M., Suarez, J.E., et al.** (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* **21**, 425–435.
- Levy, S.B. and Marshall, B.** (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* **10**, S122–129.
- Li, X., Jiang, B. and Pan, B.** (2007). Biotransformation of phenylpyruvic acid to phenyllactic acid by growing and resting cells of a *Lactobacillus* sp. *Biotechnology Letters* **29**, 593–597.
- Licitra, G., Ogier, J., Parayre, S., Pediliggieri, C., Carnemolla, T., Falentin, H., Madec, M., Carpino, S. and Lortal, S.** (2007). Variability of bacterial biofilms of the “Tina” wood vats used in the Ragusano cheese-making process. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6980–6987.
- Lind, H., Jonsson, H. and Schnurer, J.** (2005). Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 157–165.
- Lind, H., Sjögren, J., Gohil, S., Kenne, L., Schnürer, J. and Broberg, A.** (2007). Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS Microbiology Letters* **271**, 310–315.
- Lind, H.** (2010). Antifungal properties of dairy propionibacteria. Doctoral thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala, Sweden.
- Liu, S.Q. and Tsao, M.** (2009). Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control* **20**, 852–855.

- Lopandic, K., Zelger, S., Banszky, L., Eliskases-Lechner, F. and Prillinger, H.** (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* **23**, 341–350.
- Loubière, P. and Cocaïgn-Bousquet, M.** (2009). Devenir du carbone. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries Lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Economica, 29-50.
- Lowes, K., Shearman, C., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D., Merry, R. and Gasson, M.** (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1066–1076.
- Lucey, J.A.** (2004). Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3e Ed., Elsevier Academic Press, London **1**, 105–122.
- Lück, H.** (1966). L'emploi de l'eau oxygénée dans le lait et les produits laitiers. *Hygiène du lait* 431–456.

- M -

- Magnusson, J. and Schnürer, J.** (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1–5.
- Magnusson, J.** (2003). *Antifungal activity of lactic acid bacteria*. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala. Sweden.
- 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 Microbiology Letters* **219**, 129–135.
- Maragkoudakis, P.A., Papadelli, M., Georgalaki, M., Panayotopoulou, E.G., Martinez-Gonzalez, B., Mentis, A.F., Petraki, K., Sgouras, D.N. and Tsakalidou, E.** (2009). *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *International Journal of Food Microbiology* **133**, 141-147.
- Martín, R., Olivares, M., Marín, M., Xaus, J., Fernández, L. and Rodríguez, J.** (2005). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 267–277.

- Matamoros, S., Pilet, M.F., Gigout, F., Prevost, H. and Leroi, F.** (2009). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* **26**, 638–644.
- Mathur, S. and Singh, R.** (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 281–295.
- Maurice, S., Le Floch, G., Le Bras-Quere, M. and Barbier, G.** (2010). Improved molecular methods to characterise *Serpula lacrymans* and other Basidiomycetes involved in wood decay. *Journal of Microbiological Methods* **84**, 208–215.
- Mayoral, M.B., Martin, R., Sanz, A., Hernandez, P.E., Gonzalez, I. and Garcia, T.** (2005). Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. *International Journal of Food Microbiology* **105**, 27–34.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., et al.** (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet* **370**, 1560–1567.
- McSweeney, P.L.H. and Fox, P.F.** (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3e Ed., Elsevier Academic Press, London **1**, 361–371.
- Medina, R., Katz, M., Gonzalez, S. and Oliver, G.** (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *Journal of Food Protection* **64**, 559–563.
- Meer, R., Baker, J., Bodyfelt, F. and Griffiths, M.** (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection* **54**, 969–979.
- Michel, V., Hauwuy, A. and Chamba, J.F.** (2001). La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Le Lait* **81**, 575–592.
- Millet, L., Saubusse, M., Didienné, R., Tessier, L. and Montel, M.** (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 105–114.
- Mission scientifique de Syndifrais** (1997). Yaourts, laits fermentés. *Le Lait* **77**, 321–358.
- Miyamoto, M., Seto, Y., Hai Hao, D., Teshima, T., Bo Sun, Y., Kabuki, T., Bing Yao, L. and Nakajima, H.** (2005). *Lactobacillus harbinensis* sp. nov., consisted of strains isolated from traditional fermented vegetables ‘Suan cai’ in Harbin, Northeastern China and *Lactobacillus perolens* DSM 12745. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 688–694.

- Mofredj, A., Bahloul, H. and Chanut, C.** (2007). *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Médecine et Maladies Infectieuses* **37**, 200–207.
- Moineau, S.** (1999). Applications of phage resistance in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 377–382.
- Monnet, V., Atlan, D., Béal, C., Champomier-Vergès, M.C., Chapot-Chartier, M.P., Chouayekh, H., Cocaïgn-Bousquet, M., Deghorain, M., Gaudu, P., Gilbert, C., et al.** (2008). Métabolisme et ingénierie métabolique. In Corrieu, G., Luquet, F.-M. (Eds.), *Bactéries lactiques, De la génétique aux ferments*, Tec&Doc Lavoisier, Paris, 271–509.
- Montel, M.C., Beuvier, E. and Hauwuy, A.** (2003). Pratiques d'élevage, microflore du lait et qualités des produits laitiers. *INRA Productions Animales* **16**, 279–282.
- Mounier, J., Le Blay, G., Vasseur, V., Le Floch, G., Jany, J.L. and Barbier, G.** (2010). Application of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for yeasts identification in red smear cheese surfaces. *Letters in Applied Microbiology* **51**, 18–23.
- Mu, W., Liu, F., Jia, J., Chen, C., Zhang, T. and Jiang, B.** (2009). 3-Phenyllactic acid production by substrate feeding and pH-control in fed-batch fermentation of *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology* **100**, 5226–5229.
- Mufandaedza, J., Viljoen, B., Feresu, S. and Gadaga, T.** (2006). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 147–152.
- Murdock, C., Cleveland, J., Matthews, K. and Chikindas, M.** (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology* **44**, 255–261.

- N -

- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J.** (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* **151**, 2141–2150.
- Naser, S.M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M. and Swings, J.** (2007). Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2777–2789.
- Nelson, C.E.** (1993). Strategies of mold control in dairy feeds. *Journal of Dairy Science* **76**, 898–902.

- Nes, I.F. and Johnsborg, O.** (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 100–104.
- Nieguitsila, A., Goldenberg, O., Deville, M., Arné, P., Benoît-Valiergue, H., Chermette, R., Latouche-Cottenot, S., Pissard, S. and Guillot, J.** (2010). Molecular monitoring of fungal communities in air samples by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC). *Journal of Applied Microbiology* **109**, 910–917.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A.** (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 29–35.
- Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F.** (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* **167**, 67–77.
- Novella-Rodriguez, S., Veciana-Nogués, M.T. and Vidal-Carou, M.C.** (2000). Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 5117–5123.

- O -

- O'Brien, J., Crittenden, R., Ouwehand, A.C. and Salminen, S.** (1999). Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science & Technology* **10**, 418–424.
- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P. D. and Fuller, H.T.** (2005). Fungi isolated from contaminated baled grass silage on farms in the Irish Midlands. *FEMS Microbiology Letters* **247**, 131–135.
- Odet, G.** (1999). Qualité bactériologique des fromages au lait cru. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **34**, 47–53.
- Ohhira, I., Kuwaki, S., Morita, H., Suzuki, T., Tomita, S., Hisamatsu, S., Sonoki, S. and Shinoda, S.** (2004). Identification of 3-phenyllactic acid as a possible antibacterial substance produced by *Enterococcus faecalis* TH10. *Biocontrol Science* **9**, 77–81.
- 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*. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 726–734.
- Orla-Jensen, S.** (1919). *The lactic acid bacteria*. Høst and Son, Copenhagen, Denmark.
- Osman, M.M.** (2004). Factors affecting the antifungal properties of *Brevibacterium linens*. *International Dairy Journal* **14**, 713–722.

- P -

- Penney, V., Henderson, G., Blum, C. and Johnson-Green, P.** (2004). The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **5**, 369-375.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Dalgalarrrondo, M., Haertlé, T., Mozzi, F., Chobert, J.-M. and Font De Valdez, G.** (2009). Effect of exopolysaccharides on the hydrolysis of beta-lactoglobulin by *Lactobacillus acidophilus* CRL 636 in an in vitro gastric/pancreatic system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5571-5577.
- Pfeiler, E.A. and Klaenhammer, T.R.** (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* **15**, 546–553.
- Pilet, M.F., Calvez, S., Brillet, A. and Prévost, H.** (2009). La biopréservation. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Economica, 421–439.
- Pitt, J.** (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *British medical bulletin* **56**, 184–192.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D.** (2009). *Fungi and food spoilage*, 3e Ed. Springer Science and Business Media, New York.
- Pot, B.** (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In Corrieu, G., Luquet, F.-M. (Eds.), *Bactéries lactiques, De la génétique aux ferments*, Tec&Doc Lavoisier, Paris, 1–152
- Privat, K. and Thonart, P.** (2011). Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **15**, 339–348.

- R -

- Raats, D., Offek, M., Minz, D. and Halpern, M.** (2011). Molecular analysis of bacterial communities in raw cow milk and the impact of refrigeration on its structure and dynamics. *Food Microbiology* **28**, 465–471.
- Rachman, C., Guilbaud, M., Jaffrès, E., Kabadjova, P. and Dousset, X.** (2009). Caractérisations et identification moléculaire des bactéries lactiques. In Drider, D., Prevost, H. (Eds.), *Bactéries lactiques: Physiologie, Métabolisme, Génomique et Applications industrielles*, Economica, 273-293.
- Règlement 258/97/CE** (1997), du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 1997, relatif aux nouveaux aliments et aux nouveaux ingrédients alimentaires. Journal officiel n° L 43 du 14/02/1997 p. 0001 – 0006.

- Règlement 178/2002/CE** (2002), du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002, établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. Journal officiel n° L 31 du 01/02/2002 p. 0001 - 0024.
- Règlement 852/2004/CE** (2004), du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004, relatif à l'hygiène des denrées alimentaires. Journal officiel n° L 226 du 25/06/2004 p. 0003 - 0021.
- Règlement 1935/2004/CE** (2004), du Parlement européen et du Conseil du 27 octobre 2004, concernant les matériaux et objets destinés à entrer en contact avec des denrées alimentaires. Journal officiel n° L 338 du 13/11/2004 p. 0004 – 0017.
- Rodas, A., Ferrer, S. and Pardo, I.** (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 197–207.
- Rodgers, S.** (2008). Novel applications of live bacteria in food services: probiotics and protective cultures. *Trends in Food Science & Technology* **19**, 188–197.
- Rohm, H., Eliskases-Lechner, F. and Bräuer, M.** (1992). Diversity of yeasts in selected dairy products. *Journal of Applied Microbiology* **72**, 370–376.
- Roostita, R. and Fleet, G.** (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 205–219.
- Ross, P.R., Morgan, S. and Hill, C.** (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 3–16.
- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. and Sinderen, D.** (2008). Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology* **104**, 915–923.
- Roy, U., Batish, V., Grover, S. and Neelakantan, S.** (1996). Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *International Journal of Food Microbiology* **32**, 27–34.
- Ryan, L.A.M., Zannini, E., Bello, F.D., Pawlowska, A., Koehler, P. and Arendt, E.K.** (2011). *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as novel food-grade antifungal agent for bakery products. *International Journal of Food Microbiology* **146**, 276–283.
- Rysstad, G. and Kolstad, J.** (2006). Extended shelf life milk—advances in technology. *International Journal of Dairy Technology* **59**, 85–96.

- Salih, M., Sandine, W. and Ayres, J.** (1990). Inhibitory effects of Microgard™ on yogurt and cottage cheese spoilage organisms. *Journal of Dairy Science* **73**, 887–893.
- Salyers, A.A., Gupta, A. and Wang, Y.** (2004). Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends in Microbiology* **12**, 412–416.
- Santos, M.** (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 213–231.
- Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.** (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology* **7**, 158–164.
- Schillinger, U. and Villarreal, J.V.** (2010). Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods. *Food Control* **21**, 107–111.
- Schnürer, J. and Magnusson, J.** (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* **16**, 70–78.
- Schwenninger, S.M. and Meile, L.** (2004). A mixed culture of *Propionibacterium jensenii* and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* inhibits food spoilage yeasts. *Systematic and Applied Microbiology* **27**, 229–237.
- Seifu, E., Buys, E.M. and Donkin, E.** (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends in Food Science & Technology* **16**, 137–154.
- Sengun, I., Yaman, D. and Gonul, S.** (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal* **1**, 291–298.
- Shalaby, A.R.** (1996). Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* **29**, 675–690.
- Sieuwerds, 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. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4997–5007.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnurer, J. and Kenne, L.** (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 7554.
- Sjögren, J.** (2005). Bioassay-guided isolation and characterisation of antifungal metabolites. Doctoral thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Chemistry, Uppsala. Sweden.

- 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 Microbiology Reviews* **29**, 591–610.
- Smith, J. and Hong-Shum, L.** (2003). *Food additives data book*. Blackwell Science, Great Britain.
- Sobrinho-López, A. and Martín-Belloso, O.** (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* **18**, 329–343.
- Sofos, J.N., Beuchat, L.R., Davidson, P.M. and Johnson, E.A.** (1998). Naturally occurring antimicrobials in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **28**, 71–72.
- Soomro, A., Masud, T. and Anwaar, K.** (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health—a review. *Pakistan Journal of Nutrition* **1**, 20–24.
- Sorokulova, I.B., Pinchuk, I.V., Denayrolles, M., Osipova, I.G., Huang, J.M., Cutting, S.M. and Urdaci, M.C.** (2008). The safety of two *Bacillus* probiotic strains for human use. *Digestive Diseases and Sciences* **53**, 954–963.
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R. and Tzia, C.** (2007). Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *Journal of Dairy Science* **90**, 2641–2654.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 1–29.
- Stiles, J., Penkar, S., Plockova, M., Chumchalova, J. and Bullerman, L.** (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protection* **65**, 1188–1191.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. and Schnürer, 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.
- Ström, K.** (2005). *Fungal inhibitory lactic acid bacteria*. Doctoral thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Uppsala. Sweden.
- Suomalainen, T.H. and Mäyrä-Mäkinen, A.M.** (1999). Propionic acid bacteria as protective cultures in fermented milks and breads. *Le Lait* **79**, 165–174.

Sutherland, K. (2009). Filtration and separation technology: What's new with centrifuges? *Filtration & Separation* **46**, 30–32.

Suzuki, I., Nomura, M. and Morichi, T. (1991). Isolation of lactic acid bacteria which suppress mold growth and show antifungal action. *Milchwissenschaft* **46**, 635–639.

Swindell, S.R., Benson, K.H., Griffin, H.G., Renault, P., Ehrlich, S. and Gasson, M.J. (1996). Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2641–2643.

- T -

Tailliez, P. (2001). Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il ya près de 3 milliards d'années. *Le Lait* **81**, 1–11.

Tailliez, P. (2004). Les lactobacilles: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques* **6**, 35–41.

Tamang, B., Tamang, J.P., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Gores, M. and Holzapfel, W.H. (2008). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. *International Journal of Food Microbiology* **121**, 35–40.

Tantaoui-Elaraki, A. and Khabbazi, N. (1984). Contamination éventuelle des fromages par les mycotoxines: une revue. *Le Lait* **64**, 46–71.

Tawfik, N.F., Sharaf, O.M., Effat, B.A. and Mahanna, N.S. (2004). Preserving Domiati cheese using metabolites of *Propionibacterium thoenii* P-127. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **13**, 269–272.

Teuber, M. (1993). Lactic acid bacteria. In Rehm, J., Reed, G., Pühler, A., Stadler, P. (Eds.), *Biotechnology*, 2e Ed., Verlag Chemie, Weinheim, **1**, 325–366.

Teuber, M., Meile, L. and Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **76**, 115–137.

Teuber, M. and Geis, A. (2006). The genus lactococcus. *Prokaryotes* **4**, 205–228.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., Frost, J.A. and Willshaw, G.A. (2000). The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 1–5.

Toomey, N., Bolton, D. and Fanning, S. (2010). Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Research in Microbiology* **161**, 127–135.

- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J.** (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **112**, 230–235.
- Tran, M.A., Caldwell-McMillan, M., Khalife, W. and Young, V.** (2008). *Streptococcus intermedius* causing infective endocarditis and abscesses: a report of three cases and review of the literature. *BMC Infectious Diseases* **8**, 154.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. and Guamis, B.** (2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **3**, 295–307.
- Tsai, G.J. and Cousin, M.** (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in cheese and yogurt. *Journal of Dairy Science* **73**, 3366–3378.
- Tungjaroenchai, W., White, C., Holmes, W. and Drake, M.** (2004). Influence of adjunct cultures on volatile free fatty acids in reduced-fat Edam cheeses. *Journal of Dairy Science* **87**, 3224–3234.

- V -

- Vacheyrou, M., Normand, A.C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R. and Bouton, Y.** (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* **146**, 253–262.
- Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M. and Visconti, A.** (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiology Letters* **233**, 289–295.
- 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. *Systematic and Applied Microbiology* **32**, 438–448.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J.** (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **60**, 407–438.
- 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.** (2008). Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science & Technology* **19**, 102–114.

- Van Reenen, C.A. and Dicks, L.M.T.** (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology* **193**, 157–158.
- Van Veen, S., Claas, E. and Kuijper, E.J.** (2010). High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in routine medical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 900–907.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbès, C. and Montel, M.C.** (2009). Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* **26**, 305–310.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Van Beest, M., De Kruijf, N. and Debevere, J.** (1999). Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology* **10**, 77–86.
- Viljoen, B.C.** (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 37–44.
- Viljoen, B.C., Lourens-Hattingh, A., Ikalafeng, B. and Peter, G.** (2003). Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. *Food Research International* **36**, 193–197.
- Vollenweider, S. and Lacroix, C.** (2004). 3-Hydroxypropionaldehyde: applications and perspectives of biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **64**, 16–27.
- Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N.** (2010). Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control* **21**, 136–142.

- W -

- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and von Wright, A.** (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 498–505.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.** (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), *PCR protocols A guide to methods and applications*, Academic Press, San Diego, 315–322.
- Wong, H., Chang, M. and Fan, J.** (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 699–702.

Wouters, J., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. and Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* **12**, 91–109.

- Y -

Yang, Z. (2000). Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: structures and properties. Academic Dissertation, University of Helsinki, Department of Food technology, Helsinki. Finland.

Yang, E. and Chang, H. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology* **139**, 56–63.

Yvon, M. and Rijnen, L. (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* **11**, 185–201.

- Z -

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 487–495.

Zarazaga, M., Sáenz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., Del Campo, R., Baquero, F. and Torres, C. (1999). *In Vitro* activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 3039–3041.

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C. and Gu, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology* **101**, 292–297.

VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE

Communications affichées :

Delavenne E., Déniel F., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. Evaluation de la diversité des bactéries lactiques antifongiques dans des laits de vaches, de chèvres et de brebis. 8ème congrès de la Société Française de Microbiologie, 2-4 Juin 2010, Marseille, France.

Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G. Evaluation of antifungal lactic acid bacteria diversity in raw milk samples. 13th International Symposium on Microbial Ecology, 22-27 August 2010, Seattle, USA.

Delavenne E., Mounier J., Asmani K., Jany J.L., Barbier G., Le Blay G. Fungal diversity in raw ewe, goat and cow milk determined using denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC). FEMS 4th congress of European microbiologists, 26-30 June 2011, Geneva, Switzerland.

Delavenne E., Pawtowski A., Arzur D., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. *Lactobacillus* spp. Isolated from raw milk exert a protective effect against fungal spoilage in yogurt. FEMS 4th congress of European microbiologists, 26-30 June 2011, Geneva, Switzerland.

Delavenne E., Ismail R., Pawtowski A., Deniel F., Arzur D., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. Caractérisation de lactobacilles antifongiques isolés de laits crus. SFM, colloque Ecosystèmes Microbiens et Bioprotection des Aliments, 17-18 Novembre 2011, Nantes.

Communications orales :

Delavenne E., Déniel F., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. Evaluation de la diversité des bactéries lactiques antifongiques dans des laits crus. Journée des doctorants et post-doctorants en biologie-santé en Bretagne, 14 Juin 2010, Rennes.

Delavenne E., Mounier J., Déniel F., Barbier G., Le Blay G. Goat and cow milk are natural reservoirs of antifungal lactic acid bacteria. International Conference On Antimicrobial Research, 3-5 November 2010, Valladolid, Spain.

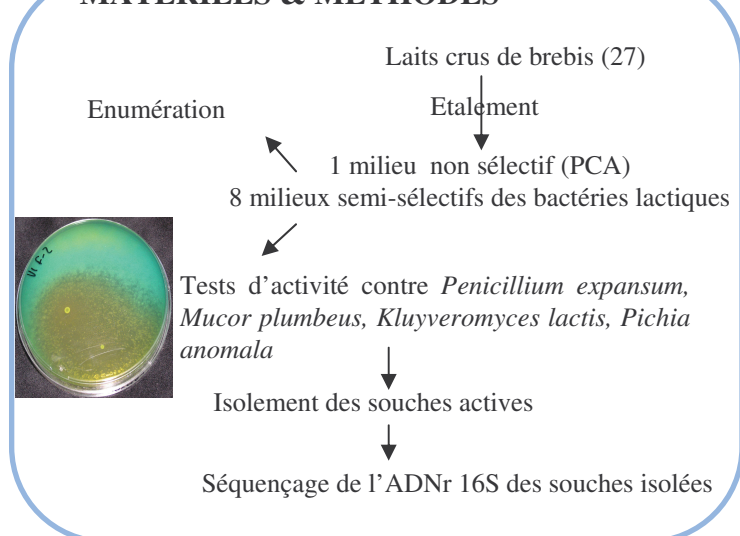
Delavenne E., Pawtowski A., Arzur D., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. Effet protecteur de lactobacilles isolés de laits crus contre les altérations fongiques du yaourt. Journée des doctorants et post-doctorants en biologie-santé en Bretagne, 20 Juin 2011, Brest.

Delavenne E., Pawtowski A., Deniel F., Mounier J., Barbier G., Le Blay G. *Lactobacillus harbinensis* s'avère particulièrement efficace pour lutter contre les altérations fongiques du yaourt. SFM, colloque Ecosystèmes Microbiens et Bioprotection des Aliments, 17-18 Novembre 2011, Nantes.

Emilie Delavenne, Jérôme Mounier, Franck Déniel, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay
Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

Les bactéries lactiques antifongiques représentent une alternative à l'utilisation de conservateurs chimiques dans les produits laitiers fermentés. Le lait cru pourrait être un réservoir de bactéries lactiques antifongiques susceptibles d'être compétitives dans ce milieu. L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans des laits crus de vaches, de brebis et de chèvres en début, milieu et fin de lactation.

MATÉRIELS & MÉTHODES



RÉSULTATS

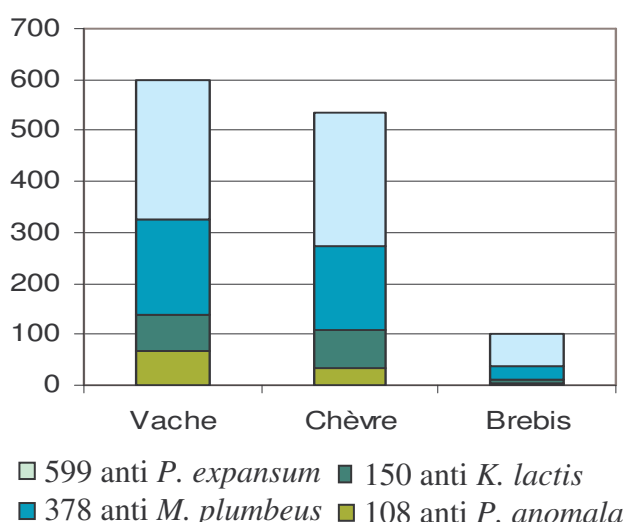


Figure 2. Nombre d'isolats selon les animaux et les cibles fongiques

Tableau 1. Enumération des flores totales (log UFC / ml) et pourcentage de colonies antifongiques isolées.

	Vache	Chèvre	Brebis
PCA	4,7 ± 0,3	5,7 ± 0,2	5,4 ± 1,0
LAMVAB	3,9 ± 0,1 9,5 %	3,9 ± 0,5 5,6 %	3,1 ± 1,6 1,1 %
MRS acidifié	3,8 ± 0,3 4,9 %	4,5 ± 0,2 2,3 %	4,2 ± 1,0 1,7 %
Isolats	49 %	43 %	8 %

86 % des isolats provenaient de milieux à base de MRS

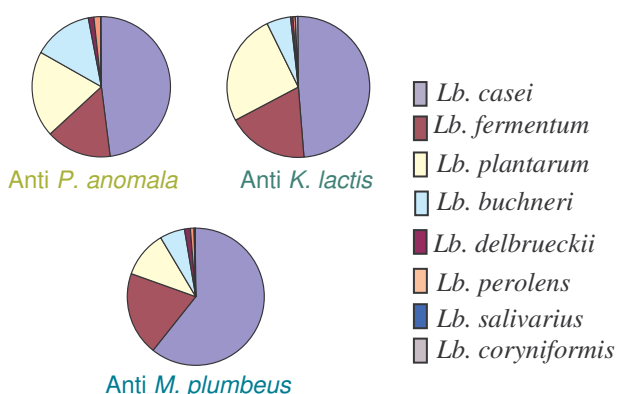


Figure 3. Proportion des différents groupes de lactobacilles antifongiques selon la cible fongique

PCA : milieu non sélectif; LAMVAB : milieu sélectif des lactobacilles; MRS acidifié : milieu semi-sélectif des pédiocoques et autres bactéries lactiques.

CONCLUSION

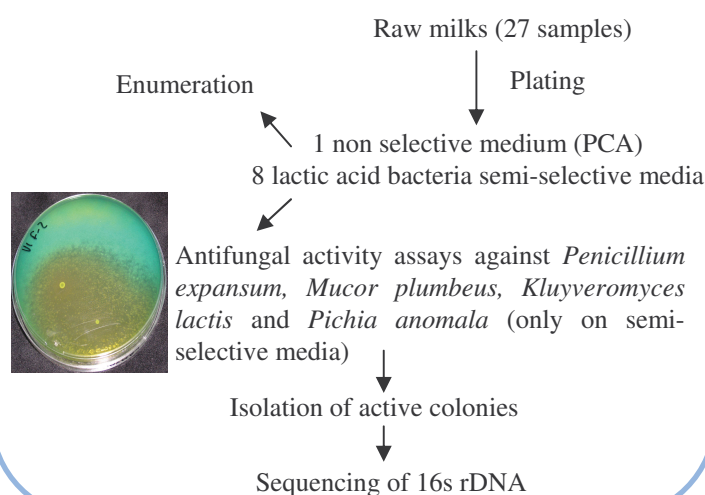
La majorité des colonies actives sont des lactobacilles isolés sur LAMVAB, avec une proportion dix fois plus forte de colonies isolées des laits de vache que des laits de brebis. Quarante-vingt cinq pour cent des isolats appartiennent aux groupes *Lb. casei*, *Lb. fermentum* et *Lb. plantarum*. Les isolats du groupe *Lb. plantarum* sont plus fortement représentés parmi les bactéries actives contre *Kluyveromyces lactis*, tandis que ceux du groupe *Lb. buchneri* sont plus fortement représentés chez les bactéries actives contre *Pichia anomala*.

Emilie Delavenne, Jérôme Mounier, Franck Déniel, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay
Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882, IFR148 ScInBioS,
ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

Contacts : gwenaelle.leblay@univ-brest.fr emilie.delavenne@univ-brest.fr

Antifungal lactic acid bacteria (ALAB) could be a good alternative to chemical preservatives for fermented dairy products. Raw milk may consequently be a potential reservoir of ALAB for biopreservation. The objective of this work was then to analyze biodiversity of ALAB communities in raw milk samples depending on animal species (cow, ewe and goat).

MATERIALS & METHODS



RESULTS

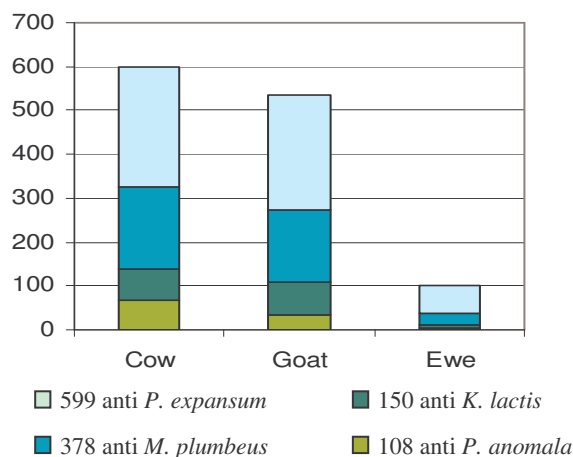
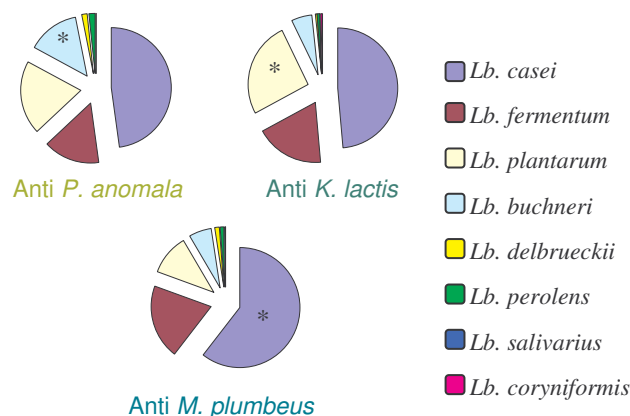


Figure 2. Number of isolates according to animals and targeted fungi

Table 1. Enumeration of total bacteria (mean Log(CFU/ ml)±SD) and percentage of isolated antifungal colonies (86 % of active isolates came from MRS-based media)

	Cow	Goat	Ewe
PCA	4.7 ± 0.3	5.7 ± 0.2	5.4 ± 1.0
LAMVAB	3.9 ± 0.1 9.5 %	3.9 ± 0.5 5.6 %	3.1 ± 1.6 1.1 %
MRS pH 5.5	3.8 ± 0.3 4.9 %	4.5 ± 0.2 2.3 %	4.2 ± 1.0 1.7 %
ALAB isolates	49 %	43 %	8 %



* $P \leq 0.05$ (Chi-square distribution test)

Figure 3. Proportion of antifungal *Lactobacillus* groups according to targeted fungi

PCA : non selective medium; LAMVAB : *Lactobacillus* selective medium; MRS pH 5.5 : *Pediococcus* and other lactic acid bacteria selective medium.

CONCLUSION

Majority of active colonies were lactobacilli isolated from LAMVAB and MRS media inoculated with cow or goat milks. Among lactobacilli, 85% of isolates belong to the *Lb. casei*, *Lb. fermentum* and *Lb. plantarum* groups. Isolates from the *Lb. plantarum* group were over-represented among bacteria active against *Kluyveromyces lactis*, whereas isolates from the *Lb. buchneri* group were over-represented among bacteria active against *Pichia anomala*.

This study was conducted with the financial support of the french National Agency for Research (ANR) and the french ministry of higher education and research

Fungal diversity in raw ewe, goat and cow milk determined using denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC)

Emilie Delavenne, Jerome Mounier, Katia Asmani, Jean-Luc Jany, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay
Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882, IFR148 ScInBioS,
ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

Contacts : gwenaelle.leblay@univ-brest.fr; emilie.delavenne@univ-brest.fr

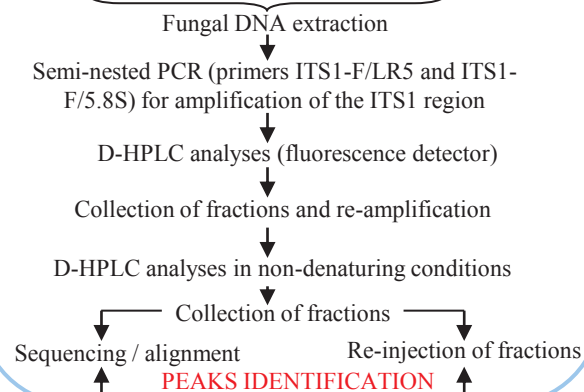
INTRODUCTION

Compared to bacterial diversity, few authors have studied the biodiversity of fungi in raw milk, whereas the knowledge of fungal contaminants may be of interest for the maintenance of high hygienic practices as well as the monitoring of fungi with technological interest for cheese-making. Fungal diversity assessment is usually done by cultural methods or molecular techniques such as DGGE or SSCP, but these techniques are laborious and/or do not easily allow the identification of fungal species.

The objective of this study was to set up a rapid method for assessing the diversity of dominant fungi in raw milk samples from three dairy species (cow, ewe and goat) after PCR-amplification of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) region and analysis by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC).

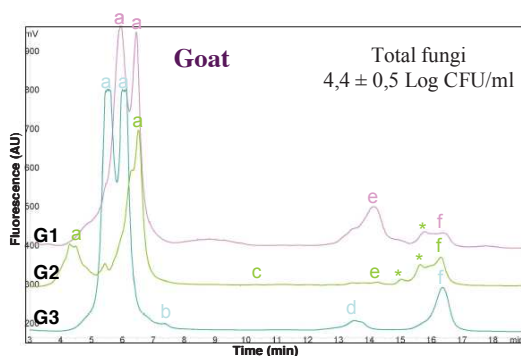
METHODS

	J	F	M	A	M	Jun	Jul	A	S	O	N	D	Sampling periods
Ewe	E1			E2			E3						First
Goat		G1				G2					G3		Second
Cow			C1				C2		C3				Last

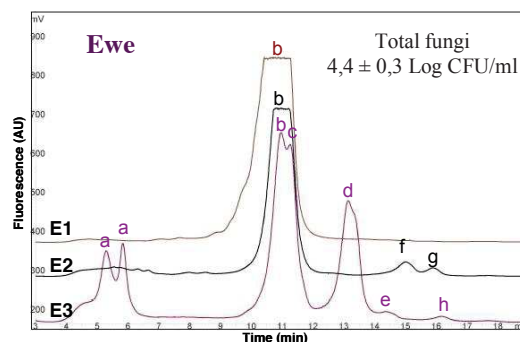


RESULTS

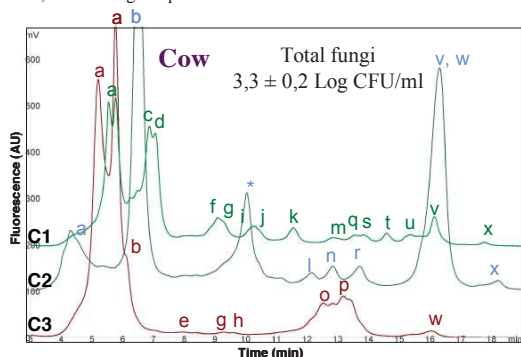
D-HPLC analyses of the fungal diversity in raw milk from goat (G), ewe (E) and cow (C) during the first (G1, E1, C1), second (G2, E2, C2) and last (G3, E3, C3) sampling periods.



a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida inconspicua*; c, *C. parapsilosis*; d, *Engyodontium album*; e, *Candida globosa/pseudoglobosa*; f, *Cluyveromyces marxianus*; * non-assigned peaks



a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida parapsilosis*; c, *Rhodotorula mucilaginosa*; d, *Engyodontium album*; e, *Debaryomyces hansenii*; f, *Malassezia restricta*; g, Uncultured *Malassezia* sp.; h, Uncultured fungus clone



a, *Geotrichum candidum*; b, *Candida catenulata*; c, *Pichia fermentans*; d, *Candida sake*; e, *Candida inconspicua*; f, *Trichosporon cutaneum*; g, *Trichosporon lactis/caseorum*; h, *Cryptococcus curvatus*; i, *Cryptococcus victorae*; j, *Cryptococcus carnesensis*; k, *Cladosporium* sp.; l, *Fusarium merismoides*; m, *Penicillium glabrum*; n, Uncultured fungus clone; o, *Penicillium roqueforti*; p, *Engyodontium album*; q, *Aspergillus fumigatus*; r, *Torubiella* sp.; s, *Candida* sp.; t, *Debaryomyces hansenii*; u, *Malassezia restricta*; v, *Cluyveromyces marxianus*; w, *Cluyveromyces lactis*; x, *Malassezia globosa*; * non-assigned peak

DISCUSSION

A total of 27 fungal species (18 yeasts and 9 molds) were identified. Cow milk harbored the highest fungal diversity with a maximum of 15 species in a single sample, whereas a maximum of 4 and 6 different species were recovered in goat and ewe milk respectively. Commonly encountered genera in cow and goat milk were *Geotrichum candidum*, *Cluyveromyces marxianus* and *Candida* spp. (*C. catenulata* and *C. inconspicua*); whereas *Candida parapsilosis* was frequently found in ewe milk samples.

Most of detected species were previously described in literature data. A few species were uncultured fungi and others (*Torubiella* and *Malassezia*) were described for the first time in milk.

As compared to cultural and other molecular fingerprinting techniques, D-HPLC is a promising tool for the rapid identification of main fungal species in milk, especially those of technological importance such as *G. candidum*, *D. hansenii*, *K. lactis* or *K. marxianus* which were easily detected in the present study.

This study was conducted with the financial support of the french National Agency for Research (ANR) program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), and the french ministry of higher education and research

- FEMS 4th congress of european microbiologists – June 26-30 2011 – Geneva, Switzerland -

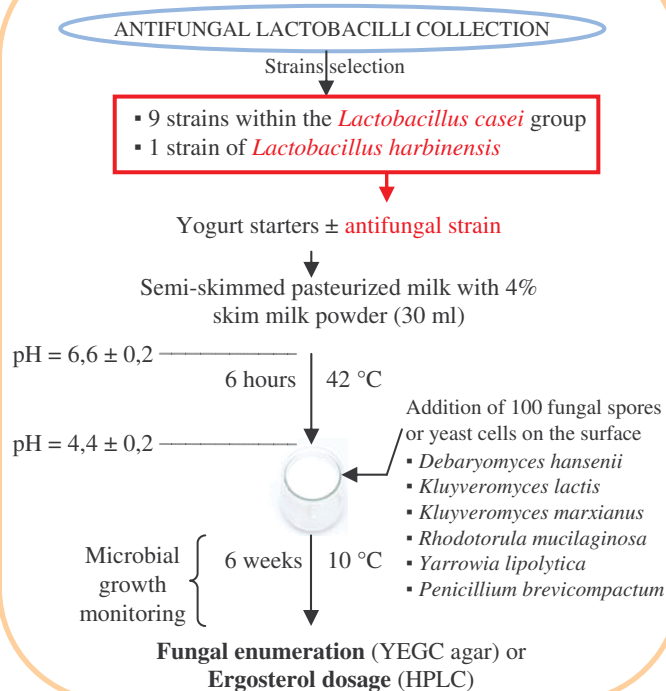
Lactobacillus spp. isolated from raw milk exert a protective effect against fungal spoilage in yogurt

Emilie Delavenne, Audrey Pawtowski, Danielle Arzur, Jérôme Mounier, Georges Barbier, Gwenaelle Le Blay
Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

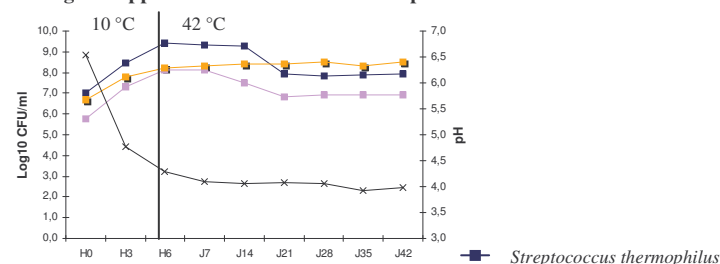
Contacts : gwenaelle.leblay@univ-brest.fr emilie.delavenne@univ-brest.fr

Fermented dairy products such as yogurts, are sensitive to fungal spoilage and need to be protected from contaminations. However, consumers demand and food legislations asking for less food chemicals, incite the search for alternatives to chemical preservatives. The objective of this study was to evaluate *in situ* properties of ten antifungal lactobacilli strains isolated from raw milk, by analyzing their capacity to inhibit fungal contaminants in yogurt matrices.

MATERIALS & METHODS



A. Yogurt supplemented with *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*



B. Yogurt supplemented with *Lb. harbinensis*

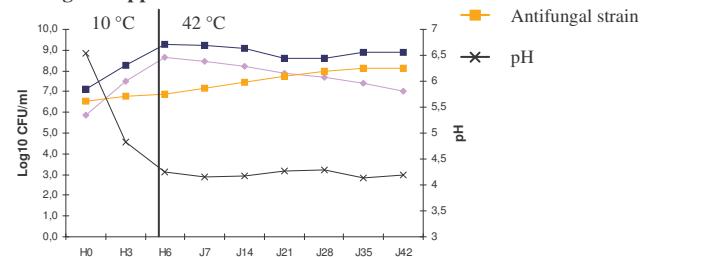


Figure 1. Bacterial growth (Log_{10} CFU/ml) and pH monitoring from the beginning of fermentation (6 H at 42 °C) to the end of storage (6 weeks at 10 °C) of yogurts supplemented with the 2 most active antifungal strains. *Streptococcus thermophilus* was enumerated on M17 supplemented with lactose 0,5 %; *Lb. bulgaricus* and antifungal strains were enumerated on acidified MRS (pH 5,4), and were distinguishable by their size and aspect.

Table 1. Concentrations of 3 antifungal strains and 6 targeted fungi after 6 weeks of storage at 10 °C.

		Yogurts supplemented with ^(A)			
		Control ^(A)	K.C8.3.1 _H c1 (<i>Lb. paracasei</i>)	K.C8.3.1 _I (<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>)	K.V9.3.1 _N (<i>Lb. harbinensis</i>)
Antifungal strains (Log_{10} CFU/ml)	pH	4,1	4,0	4,0	4,2
		-	8,5	8,2	8,1
Targeted fungi	<i>D. hansenii</i> (Log_{10} CFU/ml)	7,8	2,5	5,6	< 2
	<i>K. lactis</i> (Log_{10} CFU/ml)	8,1	7,3	7,8	< 2
	<i>K. marxianus</i> (Log_{10} CFU/ml)	6,9	7,0	7,4	< 2
	<i>R. mucilaginosa</i> (Log_{10} CFU/ml)	8,0	7,9	< 2	< 2
	<i>Y. lipolytica</i> (Log_{10} CFU/ml)	8,4	7,7	7,6	< 2
	<i>P. brevicompactum</i> ($\mu\text{g/g}$) ^(B)	123	91	59	Not detected

(A) Representative results of 3 independent experiments; (B) ergosterol concentrations.

The 6 targeted fungi were completely inhibited on yogurts supplemented with *Lb. harbinensis*. Yogurts supplemented with *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* completely inhibited *R. mucilaginosa* and partially inhibited *D. hansenii* and *P. brevicompactum*, whereas yogurts supplemented with *Lb. paracasei* only partially inhibited *D. hansenii*. The 7 other *Lactobacillus* strains partially inhibited *D. hansenii* and / or *R. mucilaginosa* only. Each experiment was performed three times.

CONCLUSION

Among the 10 tested strains, the addition of *Lb. harbinensis* (n° K.V9.3.1_N) induced a strong protective effect, compared to the control without protective strain, with a complete inhibition of the 6 targeted fungi. The second most effective strain belonged to the *Lb. casei* group (n° K.C8.3.1_I) and inhibited *R. mucilaginosa*, *D. hansenii* and *P. brevicompactum*. *Lb. harbinensis* is a good candidate for food preservation and next studies will focus on mechanisms involved in inhibition.

This study was conducted with the financial support of the french National Agency for Research (ANR) program FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), and the french ministry of higher education and research

- FEMS 4th congress of european microbiologists – June 26-30 2011 – Geneva, Switzerland -

Caractérisation de lactobacilles antifongiques isolés de laits crus

Emilie Delavenne, Rached Ismail, Audrey Pawtowski, Franck Deniel, Danielle Arzur, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay
Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne EA3882, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

Contacts : gwenaëlle.leblay@univ-brest.fr emilie.delavenne@univ-brest.fr

La bioprotection permet de maîtriser la croissance des flores pathogènes ou d'altération par l'ajout de microorganismes protecteurs tout en préservant les qualités organoleptique et nutritionnelle des aliments. Elle a pour objectif de répondre à la demande croissante des consommateurs ainsi qu'à l'évolution de la législation européenne qui incite à réduire l'utilisation de conservateurs chimiques. Dans cette étude, nous avons caractérisé onze souches de lactobacilles antifongiques isolés de laits crus et potentiellement utilisables comme souches bioprotectrices afin de lutter contre les altérations fongiques des yaourts. Les onze souches ont été identifiées par analyse phylogénétique. Leur capacité de croissance dans le lait a été évaluée, ainsi que leur activité antifongique dans du lait en absence ou en présence de ferments.

Matériels & Méthodes

Collection de lactobacilles antifongiques isolés de laits crus

Sélection de 11 souches homofermentaires ou hétérofermentaires facultatifs

IDENTIFICATION : Séquençage des gènes *pheS* et *rpoA* et du gène de l'ARNr 16S
Spectrométrie de masse : MALDI-TOF

TYPAGE : Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

CARACTÉRISATION : Profils de fermentation de divers glucides (Galerie API)
Résistances à 9 antibiotiques
Croissance dans du lait et dans du MRS sans acétate (MRSm)
Spectre d'activité antifongique dans le lait et le yaourt

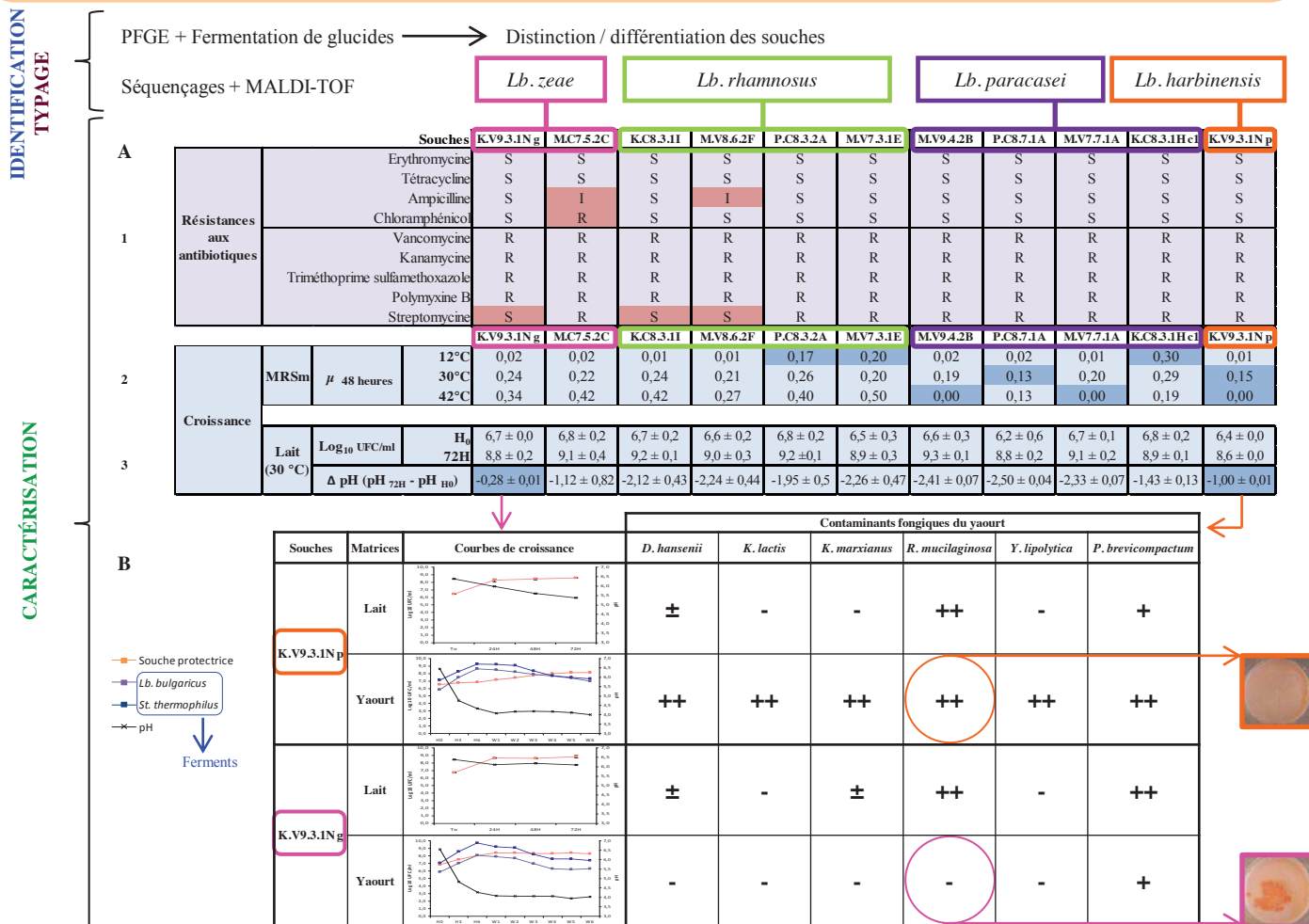


Figure 1. Caractérisation des souches. A. Caractérisation phénotypique des souches. 1. Profils de résistances aux antibiotiques. S: sensible, R: résistant et I: intermédiaire. 2. Taux de croissance (μ) des souches à 12°C, 30°C et 42°C dans du MRS sans acétate (MRSm) 3. Croissance des souches dans du lait à 30 °C (Log₁₀ UFC/ml) et mesure de la baisse de pH 72 heures après l'inoculation (72H). B. Spectre d'activité des souches dans le lait, sans ou avec ferments (yaourt). Dans le lait sans ajout de ferments, la fermentation a été menée à 30 °C et l'activité antifongique a été évaluée 3 jours après contamination par les cibles fongiques. Dans le cas du yaourt, la fermentation a été menée à 42 °C et l'activité antifongique a été évaluée 6 semaines après contamination et stockage à 10°C. Seuls les résultats de la souche la moins active et de la souche la plus active sont représentés. ++: inhibition totale de la cible fongique, + inhibition supérieure à celle du contrôle (sans souche antifongique); ±: inhibition légèrement supérieure à celle obtenue sur le contrôle; -: pas d'inhibition.

Conclusion

Les profils de PFGE et de fermentation des glucides ont permis de confirmer la diversité des isolats. Toutes les souches testées se sont montrées sensibles à l'érythromycine, à la tétracycline et à l'ampicilline. Les 8 souches de *Lb. paracasei* et de *Lb. rhamnosus* ont provoqué de fortes acidifications par rapport aux autres souches testées, sans pour autant exercer de plus fortes activités antifongiques. Deux souches peu acidifiantes (K.V9.3.1N p et K.V9.3.1N g) mais fortement antifongiques suggèrent que l'acide lactique n'est pas la seule molécule impliquée dans l'inhibition. Enfin, l'intensité et les spectres d'activité antifongique de ces deux souches sont différents en absence (lait) ou en présence de ferments (yaourts). Ainsi la souche K.V9.3.1N g voit son activité antifongique diminuer en présence de ferments, alors qu'on contraire elle augmente beaucoup pour la souche K.V9.3.1N p. Ceci suggère un effet synergique entre les ferments et la souche K.V9.3.1N p (*Lb. harbinensis*).

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), programme FUNGINIB (ANR-09-ALIA-005-01), et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

- SFM - Ecosystèmes Microbiens et Bioprotection des Aliments – 17, 18 novembre 2011– Nantes -

JOURNÉE DES DOCTORANTS ET POST-DOCTORANTS EN BIOLOGIE SANTÉ EN BRETAGNE

ÉVALUATION DE LA DIVERSITÉ DES BACTÉRIES LACTIQUES ANTIFONGIQUES DANS DES LAITS CRUS

Emilie Delavenne, Jérôme Mounier, Franck Déniel, Georges Barbier, Gwenaëlle Le Blay,
laboratoire universitaire de biodiversité et d'écologie microbienne, Technopôle Brest-Iroise
29280 Plouzané, emilie.delavenne@univ-brest.fr

Résumé de la communication orale ☒ ou par poster ☐ (cocher la case souhaitée)

Le remplacement des conservateurs chimiques par des conservateurs "naturels" s'avère aujourd'hui primordial. L'utilisation de bactéries lactiques semble être une bonne alternative de biopréservation des produits laitiers potentiellement susceptibles aux contaminations fongiques. Le lait cru pourrait constituer un réservoir de bactéries lactiques à potentiel antifongique. L'objectif de cette étude a donc été d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques dans des laits crus de vache, brebis et chèvre. Un total de 27 laits crus a été collecté en début, milieu et fin de la période de lactation de chaque espèce. Les bactéries totales ont été dénombrées sur milieu non sélectif et les bactéries lactiques sur 8 milieux semi-sélectifs. Après comptage, 18000 colonies ont été criblées pour leur activité antifongique contre *Mucor plumbeus*, *Cluyveromyces lactis* et *Pichia anomala*. Deux pour cent des colonies testées ont révélé une activité antifongique et plus de 600 isolats ont été purifiés et identifiés par séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. Quatre-vingt-quatorze pour cent des isolats provenaient des laits de vache et de chèvre (51 % et 43 %, respectivement) et seulement 6 %, des laits de brebis. La plupart des souches actives (86 %) a été isolée sur des milieux à base de MRS et la majorité de ces souches était active contre *M. plumbeus* (52 %), puis contre *K. lactis* (28 %) et enfin contre *P. anomala* (21 %). Cinquante-cinq pour cent des isolats appartenaient au groupe *Lactobacillus casei* et étaient actifs contre tous les champignons ciblés ; 21 % appartenaient au groupe *Lb. fermentum* et 14 % au groupe *Lb. plantarum* lesquels ciblaient principalement *K. lactis*. Les 10 % restants appartenaient aux groupes *Lb. buchneri* et *Lb. acidophilus*, et aux genres *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* ou *Pediococcus*. Les isolats du groupe *Lb. buchneri* étaient quant à eux majoritairement actifs contre *P. anomala*. Enfin, les isolats actifs contre *P. anomala* ont pour la plupart été isolés en milieu de lactation, tandis que ceux actifs contre *M. plumbeus* provenaient essentiellement de laits de fin de lactation. Cette étude a permis de mettre en évidence que les laits crus de vache et de chèvre constituaient des réservoirs de bactéries lactiques antifongiques. La très grande majorité des souches actives isolées appartenaient au genre *Lactobacillus* mais il semble que les différents groupes de *Lactobacillus* sont actifs contre des espèces différentes de champignons.

Goat and cow milk are natural reservoirs of antifungal lactic acid bacteria

E Delavenne, J Mounier, F Déniel, G Barbier and G Le Blay

Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopôle de Brest Iroise, 29280 Plouzané, France.

Fermented dairy products susceptible to fungal spoilage are usually preserved by chemicals that prevent their alteration and the growth of potentially toxigenic fungi. In recent years, the new European legislation demanding for less chemical preservatives together with consumer's expectation for minimally processed foods with minimal amounts of chemical preservatives has increased the interest for alternative strategies of food preservation. Replacing chemical preservatives by antifungal lactic acid bacteria (ALAB), used as bio-protective cultures on dairy products, appears to be a promising way to fulfil consumers and legislation demands. Facing the need for protective cultures adapted to dairy products, we wondered whether milk could be a natural reservoir of ALAB. The aim of this study was then to evaluate the biodiversity of ALAB in 27 raw milk samples from cow, goat and ewe collected during three successive weeks at three lactation periods (beginning, middle and end).

For each sample, total bacteria were enumerated on non selective medium, whereas lactic acid bacteria (LAB) were enumerated on 8 semi-selective media. After counting, around 12,000 colonies were overlaid with one of the four targeted fungi, *Penicillium expansum*, *Mucor plumbeus*, *Kluyveromyces lactis* or *Pichia anomala* on 8 semi selective media for antifungal activity screening. Colonies active against *Mucor plumbeus*, *Kluyveromyces lactis* and *Pichia anomala* were isolated and their 16S rRNA gene sequenced for identification.

Milk samples, whatever their origin, were dominated by LAB cocci (presumptive lactococci and leuconostoc). Enterococci, *Lactobacillus* spp. and psychrotolerant LAB were present in lower concentrations (values ≥ 4.3 Log₁₀ CFU/ml) ($P < 0.05$). In most media, cow milk samples harbored significantly lower plate counts ($P < 0.05$) than goat milk, whereas ewe milk counts lied in between. According to activity tests, the number of recovered antifungal colonies depended on milk origin, lactation periods, growth medium and targeted fungi. Among the 1,235 isolated antifungal colonies, 8% were recovered from ewe milk, whereas 43 % and 49 % were recovered from goat and cow milks, respectively. Most of them (1,057 isolats) came from MRS-based media and half of them (634) were recovered in cow and goat milks from end lactation. An increase in the percentage of active colonies grown on LAMVAB and MRS was noticed for cow and goat milks between the middle and end lactation periods independently of bacterial concentrations. *P. expansum* was the most frequently inhibited fungi, followed by *M. plumbeus*, *K. lactis* and *P. anomala* in decreasing order. Isolates active against *P. expansum* were over-represented in ewe milk, the ones active against *M. plumbeus* and *P. anomala* were over-represented in cow milk in end and middle lactation periods respectively, and those active against *K. lactis* were over-represented in goat milk.

Among the 733 sequenced isolates active against *M. plumbeus*, *K. lactis* or *P. anomala*, 0.4% belonged to *Lactococcus*, 1.9% to *Enterococcus*, 3.7 % to *Leuconostoc*, and 94% to the *Lactobacillus* genus. Lactobacilli were ranked into eight phylogenetic groups: *Lb. casei* (55%), *Lb. fermentum* (19%), *Lb. plantarum* (17%) and *Lb. buchneri* (7%). The remaining 2 % lactobacilli belonged to the *Lb. delbrueckii*, *perolens*, *salivarius* and *coryniformis* groups. The *Lb. casei* group, mainly isolated on LAMVAB medium, contained isolates active against all fungi but over-represented in the population targeting *M. plumbeus*. Isolates from the *Lb. plantarum* group, frequently isolated in MRS incubated at 10°C were over-represented in the population targeting *K. lactis*, and the ones belonging to the *Lb. buchneri* group, frequently isolated in MRS at pH 5.5, were over-represented in the population targeting *P. anomala*.

In conclusion, raw milk from cow and goat are natural container of a high diversity of ALAB varying according to lactation periods. In the tested conditions, the great majority of active colonies belonged to the *Lactobacillus* genus. Among this antifungal bacterial population, it appeared that targeted fungal species differed according to the *Lactobacillus* group tested whose presence largely depended on lactation period and milk origin.

Keywords milk; antifungal lactic acid bacteria



JOURNEE DES DOCTORANTS ET POST-DOCTORANTS EN BIOLOGIE SANTE EN BRETAGNE

EFFET PROTECTEUR DE LACTOBACILLES ISOLES DE LAITS CRUS CONTRE LES ALTÉRATIONS FONGIQUES DU YAOURT

Emilie Delavenne, Audrey Pawtowski, Jérôme Mounier, Georges Barbier, Gwenaelle Le Blay, **Laboratoire universitaire de biodiversité et d'écologie microbienne, Technopôle Brest-Iroise 29280 Plouzané, emilie.delavenne@univ-brest.fr**

Résumé de la communication orale ☒ ou par poster ☐ (cocher la case souhaitée)

Les nouvelles législations alimentaires combinées à la demande des consommateurs pour des produits « naturels » favorisent le remplacement des conservateurs chimiques par des méthodes de conservation biologiques. La biopréservation est une des méthodes privilégiées pour la conservation des produits laitiers fermentés. Dix souches de *Lactobacillus* isolées de laits crus, caractérisées par biologie moléculaire, et criblées pour leurs activités antifongiques *in vitro* ont été utilisées en combinaison avec des ferments lactiques lors de challenge tests pratiqués sur des yaourts. Les spectres d'activité antifongique des 10 souches de *Lactobacillus* (9 appartenant au groupe *Lb. casei* et un *Lb. harbinensis*) ont été mis en évidence par une méthode en double couche contre 6 contaminants fongiques des yaourts : *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* et *Penicillium brevicompactum*. Lors des challenge tests, les ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* & *Lactobacillus bulgaricus*) ont été inoculés à $5 \cdot 10^6$ UFC/ml dans du lait pasteurisé avec ou sans la souche protectrice ($5 \cdot 10^6$ UFC/ml) dans des pots individuels. Ces derniers ont été placés 6 heures à 42 °C et cent spores ou cellules ont ensuite été inoculés à la surface des caillés. Les croissances fongiques et bactériennes ont été suivies pendant 6 semaines par mesure du diamètre de croissance des thalles et étalement sur boîtes respectivement. Une quantification finale de la croissance fongique a été effectuée par dénombrement sur boîtes de Petri pour les levures et dosage de l'ergostérol pour *Penicillium brevicompactum*. Sur les 10 souches testées, un net effet souche a été constaté avec un fort effet protecteur de *Lactobacillus harbinensis* ainsi qu'un effet de *Lactobacillus rhamnosus* par rapport au contrôle avec une inhibition complète de 6 et 2 contaminants fongiques respectivement. Les autres souches se sont révélées beaucoup moins efficaces. La souche appartenant au groupe *Lb. harbinensis* est une candidate potentielle pour la biopréservation du yaourt et fera l'objet d'investigations supplémentaires.



PROPOSITION DE COMMUNICATION ORALE ☒ AFFICHEE ☐

A envoyer à secretariat@sfm-microbiologie.org
avant le 30 mai 2011

Nom de l'auteur principal : Delavenne E.....

Nom Institution et adresse : Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, EA3882

Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, ESMISAB, Technopole de Brest

Iroise, Plouzane 29280, France

Adresse mail : emilie.delavenne@univ-brest.fr.....

Téléphone : 02 98 05 61 00Fax : 02 98 05 61 01

**LACTOBACILLUS HARBINENSIS S'AVERE PARTICULIEREMENT EFFICACE POUR
LUTTER CONTRE LES ALTERATIONS FONGIQUES DU YAOURT**

**Emilie Delavenne, Audrey Pawtowski, Franck Deniel, Jérôme Mounier, Georges Barbier,
Gwenaëlle Le Blay**

Université Européenne de Bretagne, Université de Brest, EA3882 Laboratoire Universitaire de
Biodiversité et Ecologie Microbienne, IFR148 ScInBioS, ESMISAB, Technopole de Brest Iroise,
Plouzane 29280, France

La bioconservation est une des méthodes privilégiées pour remplacer les conservateurs chimiques parfois utilisés pour la conservation des produits laitiers fermentés comme les yaourts. En effet, ceux-ci peuvent être contaminés par des flores d'altération fongiques. Une dizaine de souches de lactobacilles isolés de lait cru a précédemment été caractérisée phylogénétiquement et phénotypiquement. L'objectif de cette étude a été d'évaluer les propriétés antifongiques *in situ* de ces souches en vérifiant leur capacité à inhiber la croissance de contaminants fongiques dans des matrices yaourts.

Le spectre d'activité de 9 souches appartenant au groupe *Lactobacillus casei* et un *Lactobacillus harbinensis* a été mis en évidence par des challenge tests contre 6 contaminants fongiques communément retrouvés dans les yaourts (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Yarrowia lipolytica* et *Penicillium brevicompactum*). Les ferments lactiques (*Streptococcus thermophilus* & *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ont été inoculés (5.10^6 UFC/ml), en présence ou en absence d'une souche protectrice antifongique (5.10^6 UFC/ml), dans du lait pasteurisé demi-écrémé supplémenté en poudre de lait écrémée (4% p/v) dans des pots individuels. Ces derniers ont été placés 6 heures à 42 °C pour atteindre un pH de 4,6. Après fermentation, 100 spores ou cellules des contaminants fongiques (un contaminant par pot) ont été inoculées en surface des caillés qui ont ensuite été entreposés à 10°C. Les croissances fongiques et bactériennes ont été suivies pendant 6 semaines par observation du diamètre des thalles et étalement sur milieux gélosés (LAMVAB, MRS et M17 supplémenté par 0,5% de lactose) respectivement. L'estimation finale de la croissance fongique a été effectuée par dénombrement sur milieu yeast extract glucose chloramphénicol (YEGC) pour les levures et dosage de l'ergostérol pour *Penicillium brevicompactum*.

Sur les 10 souches testées, un fort effet protecteur de *Lactobacillus harbinensis* a été constaté avec une inhibition complète des 6 cibles fongiques par rapport au contrôle dépourvu de souche protectrice. Les souches du groupe *casei* se sont révélées beaucoup moins efficaces. *Lb. harbinensis* est un candidat potentiel pour la bioconservation du yaourt et fait actuellement l'objet d'études complémentaires.

RESUME

Les produits laitiers fermentés tels que les yaourts, les laits fermentés et les fromages frais, occupent une place importante dans l'économie française. La stabilité de ces produits et leurs chances d'exportation sont cependant limitées par de fréquentes altérations fongiques. De plus, l'augmentation des résistances de certains champignons aux conservateurs chimiques ainsi que la forte demande des consommateurs pour des produits dépourvus d'additifs poussent les industriels à en réduire l'ajout. Dans ce contexte, il est nécessaire de développer des alternatives innovantes, telle que la bio-conservation. Les bactéries lactiques, utilisées depuis des millénaires dans la fermentation de nombreux aliments, et généralement reconnues comme inoffensives pour la santé, sont potentiellement de bonnes candidates pour la bio-conservation. Dans le but d'obtenir une ou deux souches de bactéries lactiques antifongiques, capables d'être compétitives au sein de produits laitiers fermentés tels que le yaourt, une collection de bactéries lactiques antifongiques a d'abord été constituée. Pour cela, un criblage de colonies isolées de laits crus de vache, de chèvre et de brebis a été effectué sur une période d'une année. Ce criblage, ciblé contre 4 champignons communément retrouvés dans les produits laitiers contaminés, a abouti à l'isolement de 1235 colonies de bactéries lactiques antifongiques. Ceci a permis d'évaluer la biodiversité des bactéries lactiques antifongiques d'une part, et celle des champignons, d'autre part, dans ces échantillons de lait, afin d'observer une éventuelle corrélation entre la présence de champignons et l'expression des activités antifongiques. L'influence de l'origine du lait, de la période d'échantillonnage, du milieu d'isolement et du champignon ciblé, sur le pourcentage de colonies actives isolées a été mise en évidence. Parmi les champignons ciblés, *Penicillium expansum* était le plus facilement inhibé, et la majorité des colonies ont été isolées durant la troisième période d'échantillonnage, majoritairement sur les milieux à base de MRS. Les laits de vache et de chèvre se sont révélés être des réservoirs de bactéries lactiques antifongiques, contrairement aux laits de brebis. La majorité des bactéries lactiques antifongiques isolées et identifiées appartenait au genre *Lactobacillus*, majoritairement du groupe *Lb. casei*. Onze isolats, dont 10 appartenant au groupe *Lb. casei*, ont été sélectionnés selon l'intensité de leur activité antifongique et leur spectre d'action sur milieu MRS. Certaines de leurs propriétés technologiques ont été caractérisées, en vue de leur utilisation comme cultures protectrices dans des produits laitiers fermentés. Leur activité antifongique a également été testée dans le lait et dans le yaourt, contre 6 contaminants fongiques communément responsables d'altérations dans les yaourts. Une souche, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, a révélé de fortes activités antifongiques dans le yaourt contre 6 cibles fongiques. Les études complémentaires effectuées ont permis de montrer que la variation de certains paramètres technologiques (présence ou absence de saccharose, temps de fermentation) n'avait pas d'influence sur l'activité antifongique de cette souche. La découverte du potentiel antifongique de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np est innovante. Cette espèce, isolée pour la première fois en 2005 d'un produit fermenté végétal, n'avait encore jamais été décrite comme présentant des activités antimicrobiennes. Sa forte activité antifongique dans le yaourt fait de *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np un bon candidat pour la bio-conservation de produit(s) laitier(s) fermenté(s).

Mots clés : Bio-conservation, bactéries lactiques antifongiques, produits laitiers fermentés, *Lactobacillus harbinensis*

ABSTRACT

Fermented dairy products such as yogurt, fermented milks and fresh cheeses are of great importance in the French economy. The stability of these products and export opportunities are however limited by frequent fungal spoilages. In addition, the increase of fungal resistances to chemical preservatives and the strong consumer demand for products deprived of chemical additives are pushing manufacturers to reduce the quantities of added chemical preservatives in these products. In this context, it is necessary to develop alternatives to classical food preservation methods, such as biopreservation. Lactic acid bacteria (LAB), used for millennia for diverse food fermentations, and generally recognized as safe for human health, can potentially be used for biopreservation. In order to select 1 or 2 LAB strains with antifungal activity capable to compete in fermented dairy products such as yogurt, a collection of antifungal LAB was first created. This was done by screening colonies isolated from cow, goat and ewe raw milk samples over a one-year period. This screening step, targeted against 4 fungi found in contaminated dairy products, resulted in the isolation of 1235 antifungal colonies. The biodiversity of the isolated antifungal LAB was then determined along with that of the fungi found in the different raw milks, in order to observe a possible correlation between the presence of fungi and the expression of antifungal activities. The influence of milk origin, sampling period, isolation medium and targeted fungus on the percentage of isolated active colonies was highlighted and clearly showed that both cow and goat milks were reservoirs of antifungal LAB. Among the targeted fungi, *P. expansum* was more easily inhibited, and the majority of colonies were isolated during the third sampling period, mainly on MRS-based media. The majority of identified antifungal LAB belonged to the genus *Lactobacillus*, mainly to the *Lb. casei* group. Eleven isolates, including 10 belonging to the *Lb. casei* group, were selected from these lactobacilli, according to their activity level and action spectrum in MRS medium. Some of their technological properties were characterized for their potential use as protective cultures in fermented dairy products and their antifungal activity was tested in milk and yogurt. To do this, 6 fungal contaminants commonly encountered in yogurt spoilage were used. A particular strain, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np, showed a strong antifungal activity in yogurt. Additional experiments showed that the variation of technological parameters (presence or absence of sugar, fermentation time) had no influence on the antifungal activity of this strain. This is the first time that an antifungal potential has been observed for *Lb. harbinensis*, a species isolated for the first time in 2005 from a fermented vegetable product. Because of its effectiveness in yogurt, *Lb. harbinensis* K.V9.3.1Np is a promising strain for biopreservation of fermented dairy product(s).

Key words: Biopreservation, antifungal lactic acid bacteria, fermented dairy products, *Lactobacillus harbinensis*