



HAL
open science

Effets des conditions de stockage et de formulation des produits laitiers sur la physiologie des moisissures d'intérêt technologique ou d'altération

Marion Valle

► To cite this version:

Marion Valle. Effets des conditions de stockage et de formulation des produits laitiers sur la physiologie des moisissures d'intérêt technologique ou d'altération. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2022. Français. NNT : 2022BRES0099 . tel-04088666

HAL Id: tel-04088666

<https://theses.hal.science/tel-04088666>

Submitted on 4 May 2023

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.

Thèse de doctorat de

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Ecole Doctorale n° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences,
Agronomie et Alimentation
Spécialité : « Microbiologie, Virologie et
Parasitologie »

Par

Marion VALLE

**Effets des conditions de stockage et de formulation des produits laitiers sur
la physiologie des moisissures d'intérêt technologique ou d'altération**

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 07 Décembre 2022

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (UR 3882, UBO)

Rapporteurs avant soutenance :

Florence MATHIEU Professeur, Université de Toulouse
Nadia OULAHAL Docteur, HDR, Université de Lyon

Composition du Jury :

Présidente : Florence MATHIEU Professeur, Université de Toulouse
Examineurs : Nadia OULAHAL Docteur, HDR, Université de Lyon
Louis COROLLER Professeur, LUBEM, Université de Bretagne Occidentale (Directeur de thèse)
Jean-Luc JANY Docteur, LUBEM, Université de Bretagne Occidentale (Encadrant)

Invités :

Laurence ABRAHAM Docteur, Chef de Projets, Entremont-Sodiaal
Nicolas NGUYEN VAN LONG Docteur, Chef de Projets, ADRIA Développement (Encadrant)
Véronique HUCHET Docteur, Responsable du Pôle Qualité et Sécurité des Aliments, ADRIA Développement

*À mes parents,
à mon petit frère*

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Pr. Emmanuel Coton du Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), au Dr. Nadia Le Den et à Jean-Robert Geoffroy de l'ADRIA Développement pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet pendant presque quatre ans.

Je tiens à remercier les membres du jury : Pr. Florence Mathieu, Dr. Nadia Oulahal, Dr. Laurence Abraham, Dr. Véronique Huchet, Pr. Louis Coroller, Dr. Jean-Luc Jany et Dr. Nicolas Nguyen Van Long pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Je souhaite également remercier les financeurs de la thèse du projet PHYMIA 2 : l'association « *Bba Milk Valley* » et les régions Bretagne et Pays de la Loire. Je remercie Karine Le Roux et Stéphan Rouverand de Valorial pour avoir suivi et organisé régulièrement les comités de pilotage du projet.

Je remercie les personnes qui se sont impliquées pour la réussite de cette thèse. Je tiens à remercier mon directeur de thèse le Pr. Louis Coroller et mes encadrants le Dr. Nicolas Nguyen Van Long et le Dr. Jean-Luc Jany. Louis, merci d'avoir cru en moi et merci d'avoir été là du début à la fin. Nicolas, merci d'avoir partagé tes nombreuses connaissances sur la germination des spores. Merci à vous deux d'avoir toujours pris le temps de m'aider lorsque MATLAB était fâché... Jean-Luc, merci d'avoir rejoint l'aventure en cours de route et merci d'avoir partagé ton expertise sur les moisissures. Merci à vous trois pour vos conseils et votre soutien. Je remercie également le Dr. Véronique Huchet pour son accueil au sein de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments de l'ADRIA Développement et pour ses conseils lors des comités de pilotage du projet.

Je tiens à remercier le Dr. Olivier Couvert pour ses nombreux conseils sur les mélanges gazeux qui m'ont permis de développer un dispositif expérimental original, Stéphane pour sa disponibilité et ses très nombreux talents (surtout en électricité !!!), Corinne pour avoir géré la partie administrative (parfois en express surtout pour le congrès à Lausanne). Mention spéciale pour Loona, merci pour ton investissement et pour tout le travail formidable que tu as réalisé (ah, la germination !). J'ai adoré travailler en binôme avec toi 😊 !

Je souhaite remercier le Dr. Jeanne Ropars et le Pr. Henry Eric Spinnler pour avoir accepté d'examiner mon travail et pour m'avoir aiguillée dans mes recherches lors des Comités de Suivi Individuel.

Je remercie l'ensemble des membres de l'UMT ALTER'IX. Je remercie le Dr. Florence Postollec et le Dr. Anne-Gabrielle Mathot pour m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux lors des comités scientifiques.

Je tiens à remercier l'équipe de Plouzané pour l'accueil lors de ma première année de thèse et pour avoir répondu à mes questions en cas de besoin. Guillaume merci pour les bons moments partagés (au labo ou en soirée). Vincent, merci pour les conseils et le soutien (les moisissures nous auront rendu la vie dure !). Je remercie Marie-Hélène et Sylvie pour leur bonne humeur au quotidien et Marielle pour m'avoir aidé au niveau administratif.

En étant loin de mes proches, les membres du LUBEM sont devenus comme une « deuxième famille ». Junior, merci pour ta disponibilité, tes blagues et les brioches de chez Minguy. Fabien, merci pour tous tes précieux conseils, je serai toujours admirative de la patience dont tu fais preuve (et merci d'avoir payé jusqu'au bout lors de la descente de l'Odet !). Manon, merci d'avoir été là pour me remonter le moral surtout le jour où mon tuyau de gaz a cédé dans le laboratoire. J'ai une petite pensée pour la stagiaire Océane qui était dans « l'aquarium » à ce moment-là pour compter des petites billes de verre et qui s'est retrouvée avec des billes partout... Agathe, merci pour ta bonne humeur au quotidien. J'espère avoir été un Ange à la hauteur de tes espérances lors de ton premier « Ange et Démon ». J'ai également une pensée pour Emmanuelle. Malgré le peu de temps passé dans le même bureau, j'ai cru comprendre que l'on menait toutes les deux le même combat : devenir des geeks de MATLAB (enfin essayer...).

Je remercie Loïc pour m'avoir prêté son matériel (et bonne retraite, #démonenfolie#aurevoirpapy). Je remercie Matthew et Christina pour m'avoir fait travailler mon anglais (il y a du progrès !). Je remercie les autres membres de l'équipe et du bâtiment G : Clément, Noémie, Ivan, Sophie, Nicolas, Hiba, Barbara, Roua, Annick, Pierre, El Houssain et les membres du LBCM pour les échanges et les encouragements au café des spores ou dans les couloirs. Hélène et Leila, merci pour le soutien, les nombreuses discussions dans les couloirs et les moments partagés autour d'un verre. J'ai également une petite pensée pour Clément, Garance, Hélène et Claire, la descente de l'Odet avec nos petits canards restera un très bon souvenir.

Je tiens également à remercier Aurélie, Charly, Clément Toletti, Aurore, Noémie, Nicolas et Luc pour les moments partagés tous ensemble lors des soirées crêpes ou jeux avec le reste de l'équipe.

Et pour terminer, je tiens à remercier l'ensemble de mes proches pour leur présence et leur soutien tout au long de ce parcours. Line et Pascal, merci pour vos appels le dimanche et les petits mots envoyés par la poste qui font toujours chaud au cœur. Lucie, bientôt 20 ans d'amitié, des fous rires jusqu'à en pleurer et des souvenirs gravés. Merci d'avoir pris le temps de me changer les idées en

me faisant monter à cheval même si à chaque fois ce sont mes talents de cascadeuse qui reviennent au galop ! Mamie, Carine et Tata Paulette, merci d'avoir pris régulièrement de mes nouvelles. Alice, merci pour les moments partagés et les encouragements. J'ai une petite pensée pour mon petit Pan-pan (je vous l'accorde, l'adjectif « petit » est subjectif) qui m'accompagne partout depuis maintenant plus de six ans. Maman, Papa et Paul, merci pour TOUT ! J'ai vraiment de la chance d'avoir une famille aussi soudée, vous êtes et resterez mes piliers. Vous m'avez aidé à me relever après des périodes difficiles et votre soutien sans faille m'a permis d'aller au bout de cette rédaction. Cette expérience de presque quatre ans n'aura pas été simple à vivre mais je pense qu'elle restera une grande leçon de vie. Cette thèse, je vous la dédie.

Avant-Propos

La majorité des études de microbiologie prévisionnelle ont été réalisées sur des bactéries pathogènes ou d'altération et les informations concernant le développement de levures et moisissures sont très peu nombreuses malgré leur place importante dans l'agroalimentaire (fermentation ou altération de nombreux aliments).

Cette thèse s'inscrit dans le cadre du projet PHYMIA 2 (PHYSiologie des Moisissures d'Intérêt Alimentaire) qui est un projet de mycologie prévisionnelle visant à acquérir des données pour modéliser le développement de levures et moisissures d'origine alimentaire et plus particulièrement rencontrées dans l'environnement laitier.

Une première version du projet (PHYMIA 1, 2012-2013) a permis d'étudier l'impact de plusieurs facteurs abiotiques (température, pH, acides organiques (acide lactique et acide propionique) et a_w modulée par le glycérol) sur la croissance de moisissures et levures rencontrées dans l'environnement laitier. Le projet PHYMIA 2 consiste à compléter les données acquises précédemment en étudiant l'impact d'autres facteurs abiotiques (a_w modulée par le chlorure de sodium (NaCl), le dioxyde de carbone (CO₂) et le dioxygène (O₂) sur le développement de levures et moisissures.

Ce projet associe les compétences de plusieurs partenaires :

- Le LUBEM (Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne, UR 3882, USC INRAE 1504), laboratoire spécialisé dans la microbiologie (écologie, physiologie, métabolisme et maîtrise) en agroalimentaire et en environnement. Le LUBEM est impliqué dans des programmes de recherche nationaux et européens.

- L'ADRIA Développement est un Institut Technique Agro-Industriel associé au LUBEM au sein de l'UMT ACTIA ALTER'ix (2019-2023) afin de prévoir et modéliser l'altération des aliments due à la présence de bactéries sporulées et de moisissures. L'ADRIA Développement assure la gestion du logiciel Sym'Previs, outil de prévision des données microbiologiques reconnu par la communauté scientifique.

- L'association Bretagne Biotechnologies Alimentaires (« *Bba Milk Valley* ») regroupant plusieurs industries laitières de l'Ouest.

Le financement de cette thèse a été assuré par l'ADRIA Développement (employeur), l'association « *Bba Milk Valley* » et les régions Bretagne et Pays de la Loire. Ces travaux de thèse ont

été soutenus par l'Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), cette thèse s'inscrivant dans le dispositif Convention Industrielle pour la Formation par la REcherche (CIFRE N°2018/1395).

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction générale	21
I. Les moisissures dans l'industrie laitière	23
1. Les flores d'intérêt technologique	23
1.1. Diversité des espèces fongiques impliquées dans la fermentation des fromages	23
1.2. Domestication et ensemencement des moisissures d'intérêt technologique.....	24
1.3. Impact des flores d'intérêt technologique sur les propriétés organoleptiques des fromages.....	26
2. Les flores d'altération.....	27
2.1. Modes de contamination des fromages.....	27
2.2. Moisissures d'altération dans l'environnement fromager.....	27
2.3. Moisissures productrices de mycotoxines dans l'environnement fromager	29
2.4. Stratégies pour réduire les contaminations fongiques	31
2.5. Stratégies pour réduire les mycotoxines.....	34
II. Processus physiologiques impliqués dans développement des moisissures	34
1. Germination des spores asexuées.....	35
2. Prolifération mycélienne	37
3. Production de spores	40
III. Maîtrise du développement des moisissures par l'activité de l'eau et le dioxyde de carbone	44
1. Activité de l'eau	44
1.1. Impact de l'activité de l'eau sur le cycle de vie des moisissures.....	45
1.2. Impact de l'activité de l'eau sur la physiologie cellulaire des moisissures.....	46
A. Stress osmotique	47
a. Accumulation de solutés compatibles	47
b. Modification de la composition et de la structure de l'enveloppe cellulaire	49
c. Régulation de l'homéostasie ionique	52
B. Stress oxydatif	53
a. Mécanismes non enzymatiques de défense contre l'oxydation.....	54
b. Mécanismes enzymatiques de défense contre l'oxydation	54
2. Dioxyde de carbone.....	55
2.1. Impact du dioxyde de carbone sur le cycle de vie des moisissures	55
2.2. Impact du dioxyde de carbone sur la physiologie cellulaire des moisissures	56
A. Métabolisme cellulaire	56
B. Dimorphisme	58

C.	Facteurs de virulence chez les levures	59
D.	Mécanismes d'action du CO ₂	60
IV.	Mycologie prévisionnelle	61
1.	Modélisation de la germination des spores	65
1.1.	Modélisation primaire	65
1.2.	Modélisation secondaire	68
2.	Modélisation de la prolifération mycélienne	70
2.1.	Modélisation primaire	70
2.2.	Modélisation secondaire	72
3.	Influence des conditions expérimentales sur l'estimation des limites de croissance	74
3.1.	Température.....	74
3.2.	pH	74
3.3.	Milieu de culture	75
3.4.	Nature du soluté dépresseur de l' <i>a_w</i>	75
3.5.	Durée d'incubation.....	76
3.6.	Variabilité intra-spécifique	76
V.	Travaux de thèse	81
1.	Présentation des objectifs.....	81
2.	Présentation des modèles biologiques	83
A.	<i>Aspergillus flavus var. columnaris</i>	84
B.	<i>Bisifusarium domesticum</i>	85
C.	<i>Cladosporium herbarum</i>	86
D.	<i>Geotrichum candidum</i>	87
E.	<i>Mucor circinelloides</i>	88
F.	<i>Mucor lanceolatus</i>	89
G.	<i>Paecilomyces niveus</i>	90
H.	<i>Penicillium bialowiezense</i>	91
I.	<i>Penicillium camemberti</i>	92
J.	<i>Penicillium expansum</i>	94
K.	<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	95
L.	<i>Penicillium nalgiovense</i>	96
M.	<i>Penicillium roqueforti</i>	97
N.	<i>Penicillium solitum</i>	98
O.	<i>Scopulariosis asperula</i>	99
P.	<i>Sprendonema casei</i>	100

Chapitre 2 : Impact de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier..... 123

I.	Introduction.....	125
II.	Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment.....	127
	1. Introduction.....	129
	2. Material and methods.....	131
	3. Results.....	135
	4. Discussion.....	144
III.	Références.....	156

Chapitre 3 : Impact du dioxyde de carbone sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier..... 159

I.	Introduction.....	161
II.	Impact of carbon dioxide on the radial growth of fungi in a dairy environment.....	163
	1. Introduction.....	165
	2. Material and methods.....	167
	3. Results.....	174
	4. Discussion.....	184
III.	Mise au point du dispositif expérimental.....	195
	1. Critères du dispositif expérimental.....	195
	A. Développement d'une enceinte sous atmosphère modifiée adaptées aux expériences ...	195
	B. Développement du système de renouvellement du mélange gazeux dans l'enceinte sous atmosphère modifiée.....	196
	C. Préparation du mélange gazeux dans les bouteilles de plongée.....	197
	D. Lecture de la croissance radiale des moisissures.....	198
	2. Vérifications des conditions expérimentales sélectionnées.....	199
	A. Impact du pH.....	199
	B. Impact de l'O ₂	199
	3. Vérifications du bon fonctionnement du dispositif expérimental.....	200
	A. Vérification de la stabilité du mélange gazeux.....	200
	B. Vérification de la stabilité du pH au cours du temps.....	201
	C. Données de mélanges gazeux et de pH obtenues lors des expériences.....	202
IV.	Références.....	204

Chapitre 4 : Impact du chlorure de sodium et du dioxyde de carbone sur la germination des spores et la croissance radiale de *Penicillium camemberti* 207

I.	Introduction.....	209
II.	Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of <i>Penicillium camemberti</i>	211
	1. Introduction.....	213
	2. Material and methods.....	215
	3. Results.....	222
	4. Discussion.....	229
III.	Données supplémentaires.....	239
	1. Matériel et méthodes.....	239
	2. Résultats.....	240
	3. Discussion.....	241
IV.	Références.....	243

Chapitre 5 : Origine du « jaunissement / brunissement » des fromages à pâte molle et croûte fleurie 245

I.	Introduction.....	247
II.	Matériels et Méthodes.....	251
III.	Résultats.....	256
IV.	Discussion.....	261
V.	Références.....	262

Chapitre 6 : Conclusion..... 267

I.	Conclusion.....	269
II.	Perspectives.....	278
III.	Références.....	281

Chapitre 7 : Valorisations 285

I.	Publications.....	287
	1. Publication acceptée.....	287
	2. Publications en préparation.....	287
II.	Communication orale.....	288
III.	Communications affichées (poster).....	290

Liste des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique des champignons utilisés pour affiner les fromages.....	24
Figure 2. Photographies de fromages de chèvre contaminés.	29
Figure 3. Représentation schématique d'une conidie	36
Figure 4. Synthèse des processus biologiques lors des différentes étapes de la germination des conidies	37
Figure 5. Micrographie d'une population de spores de <i>Penicillium discolor</i>	38
Figure 6. Schéma représentant les différents composants cellulaires impliqués dans la croissance apicale des hyphes chez <i>Neurospora crassa</i>	40
Figure 7. Micrographies de la prolifération mycélienne de <i>Penicillium expansum</i>	40
Figure 8. Cycle de reproduction asexuée et sexuée	41
Figure 9. Schéma représentant les différents types de conidiogénèse	42
Figure 10. Suivi du développement d' <i>Aspergillus niger</i>	43
Figure 11. Micrographies de cellules de la levure <i>Hortaea werneckii</i>	50
Figure 12. Schéma récapitulatif des principaux mécanismes cellulaires d'adaptation chez les champignons en cas de stress osmotique.	53
Figure 13. Micrographes de la paroi cellulaire de <i>Mucor rouxii</i>	59
Figure 14. Schéma récapitulatif des processus cellulaires impactés par le CO ₂ chez les champignons.	61
Figure 15. Représentation des processus biologiques impliqués dans le développement des moisissures	62
Figure 16. Cinétiques de germination des spores de <i>Fusarium verticillioides</i>	67
Figure 17. Modélisations primaires de germination de <i>Mucor racemosus</i>	68
Figure 18. Influence de la température et de l'acide lactique sur l'inverse du temps de germination	70
Figure 19. Cinétiques de croissance de <i>Penicillium chrysogenum</i>	72
Figure 20. Impact de la température, du pH et de l' <i>a_w</i> modulée par du glycérol et du NaCl sur le taux de croissance de <i>Mucor lanceolatus</i>	73
Figure 21. <i>Aspergillus flavus</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	84
Figure 22. <i>Bisifusarium domesticum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	85
Figure 23. <i>Cladosporium herbarum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.....	86
Figure 24. <i>Geotrichum candidum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	87
Figure 25. <i>Mucor circinelloides</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.....	88
Figure 26. <i>Mucor lanceolatus</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	89
Figure 27. <i>Paecilomyces niveus</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	90
Figure 28. <i>Penicillium bialowiezense</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	91
Figure 29. <i>Penicillium camemberti</i> var. <i>camemberti</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.....	92
Figure 30. <i>Penicillium camemberti</i> var. <i>caseifulvum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	93
Figure 31. <i>Penicillium expansum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	94
Figure 32. <i>Penicillium fuscoglaucum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	95

Figure 33. <i>Penicillium nalgiovense</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	96
Figure 34. <i>Penicillium roqueforti</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	97
Figure 35. <i>Penicillium solitum</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.....	98
Figure 36. <i>Scopulariopsis asperula</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	99
Figure 37. <i>Sporendonema casei</i> sur PDA, boîte de pétri 90 mm.	100
Figure 38. Photographies du dispositif expérimental.	196
Figure 39. Photographie du système électronique.....	197
Figure 40. Photographies de la préparation d'un mélange gazeux.	198
Figure 41. Photographies de la boîte à gants transportable Captair Pyramid.	198
Figure 42. Histogrammes représentant le taux de croissance en fonction du pH.....	199
Figure 43. Histogrammes représentant le taux de croissance en fonction du pourcentage d'O ₂	199
Figure 44. Graphique représentant le suivi quotidien du pourcentage d'O ₂	200
Figure 45. Graphique représentant le suivi quotidien du pourcentage de CO ₂	201
Figure 46. Photographie représentant la couleur du milieu de culture	202
Figure 47. Influence de la pression partielle de l'O ₂ (%) sur le temps médian de germination et le pourcentage maximal de spores germées de <i>Penicillium camemberti</i>	240
Figure 48. Hypothèse émise concernant la production de pyomélanine par <i>Penicillium camemberti</i>	250
Figure 49. Photographies de fromages témoins et fromages « jaunes » ou « bruns »	251
Figure 50. Photographies d'un prélèvement d'une croûte de fromage.	251
Figure 51. Schémas représentant les différentes parties des fromages.....	252
Figure 52. Photographies d'isolats de <i>Geotrichum candidum</i> et de <i>Penicillium camemberti</i>	253
Figure 53. Analyse en Composantes Principales réalisée pour les fromages de type Brie.....	257
Figure 54. Classification Ascendante Hiérarchique réalisée pour les fromages de type Brie.....	257
Figure 55. Hypothèse concernant l'origine du « jaunissement » des fromages de type Brie.	259
Figure 56. Modélisation secondaire représentant l'impact de l' α_w sur la croissance radiale de la souche de <i>Geotrichum candidum</i> isolée sur fromages de type Brie.	260

Liste des Tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des principales caractéristiques des types de reproduction	41
Tableau 2. Récapitulatif des données de croissance d' <i>Aspergillus flavus</i>	84
Tableau 3. Récapitulatif des données de croissance de <i>Bisifusarium domesticum</i>	85
Tableau 4. Récapitulatif des données de croissance de <i>Cladosporium herbarum</i>	86
Tableau 5. Récapitulatif des données de croissance de <i>Geotrichum candidum</i>	87
Tableau 6. Récapitulatif des données de croissance de <i>Mucor circinelloides</i>	88
Tableau 7. Récapitulatif des données de croissance de <i>Mucor lanceolatus</i>	89
Tableau 8. Récapitulatif des données de croissance de <i>Paecilomyces niveus</i>	90
Tableau 9. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium bialowiezense</i>	91
Tableau 10. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium camemberti</i>	92
Tableau 11. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium expansum</i>	94
Tableau 12. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium fuscoglaucum</i>	95
Tableau 13. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium nalgiovense</i>	96
Tableau 14. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium roqueforti</i>	97
Tableau 15. Récapitulatif des données de croissance de <i>Penicillium solitum</i>	98
Tableau 16. Récapitulatif des données de croissance de <i>Scopulariopsis asperula</i>	99
Tableau 17. Récapitulatif des données de croissance de <i>Sporendonema casei</i>	100
Tableau 18. Récapitulatif des conditions expérimentales	202
Tableau 19. Récapitulatif des valeurs moyennes de pH	203
Tableau 20. Estimation du nombre de fromages nécessaires pour les analyses.....	252
Tableau 21. Moyennes et écart-types des paramètres significatifs pour l'étude du jaunissement des fromages de type Brie.	256
Tableau 22. Estimation des valeurs cardinales d' a_w de la souche de <i>Geotrichum candidum</i> isolée sur les Bries	260

Liste des Equations

Équation 1. Équation générale de la modélisation primaire	63
Équation 2. Équation générale de la modélisation secondaire	63
Équation 3. Premier principe du γ -concept	64
Équation 4. Second Principe du γ -concept.	64
Équation 5. Modèle primaire permettant de décrire la germination des spores.....	66
Équation 6. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la germination des spores	69
Équation 7. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de composés antifongiques sur la germination des spores.....	69
Équation 8. Modèle primaire permettant de décrire la croissance radiale.....	71
Équation 9. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la croissance radiale	73
Équation 10. Modèle secondaire permettant de décrire le temps médian de germination en fonction de la pression partielle de l' O_2	239
Équation 11. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la croissance radiale	255

Liste des abréviations

ACP : analyse en composantes principales

AFM1 : aflatoxine M1

AFB1 : aflatoxine B1

ATP : adénosine tri-phosphate

a_w : activité de l'eau

CAH : classification ascendante hiérarchique

cAMP : adénosine monophosphate cyclique

CO₂ : dioxyde de carbone

EPS : exopolysaccharides

HACCP : « *Hazard Analysis Critical Control Point* »

HOG : « *High Osmolarity Glycerol* »

HPLC : « *High Performance Liquid Chromatography* »

H⁺ : proton

H₂CO₃ : acide carbonique

HCO₃⁻ : ion bicarbonate

H₂O : eau

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

O₂ : dioxygène

MAP : « *Modified Atmosphere Packaging* »

MAA : « *Mycosporine like Amino-Acid* »

NaCl : chlorure de sodium

PDA : Potato Dextrose Agar

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

ROS : *Reactive Oxygen Species*

UBO : Université de Bretagne Occidentale

UBOCC : Collection de Culture de l'UBO

UHT : Ultra Haute Température

UV : ultraviolet

(RT)qPCR : « *(Reverse Transcription) Quantitative Polymerase Chain Reaction* »

Chapitre 1 : Introduction générale

I. Les moisissures dans l'industrie laitière

1. Les flores d'intérêt technologique

Dans le domaine de l'agroalimentaire, les champignons qu'ils soient sous forme filamenteuse (moisissures) ou unicellulaire (levures) peuvent être impliqués dans la fermentation de boissons (exemples : bière, vin, kombucha) et d'aliments (exemples : viande, pain, cacao) et notamment les produits laitiers (exemples : fromage, kefir, koumiss) (Dupont *et al.*, 2017; Parapouli *et al.*, 2020; Ropars *et al.*, 2020a). L'activité métabolique de ces microorganismes va entraîner une transformation du produit notamment par la production de métabolites qui vont participer au développement de certaines caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles du produit. La fermentation peut également avoir un impact sur la durée de conservation et la sécurité des aliments, certains métabolites peuvent inhiber la croissance de microorganismes d'altération ou pathogènes (Bourdichon *et al.*, 2012; Marcellino and Benson, 2013; Ropars *et al.*, 2020a). Dans l'environnement laitier, de nombreux microorganismes participent à l'affinage des fromages. Leurs activités métaboliques ont un rôle essentiel dans les propriétés organoleptiques (exemples : texture, aspect, couleur, saveur) de ces produits (Ropars *et al.*, 2020a).

1.1. Diversité des espèces fongiques impliquées dans la fermentation des fromages

Les souches fongiques impliquées dans l'affinage des fromages appartiennent à des espèces très diverses tant du point de vue morphologique que génétique (Figure 1) (Ropars *et al.*, 2020a, 2012). *Penicillium camemberti* est utilisé pour affiner les fromages à pâte molle et croûte fleurie (exemples : Camembert, Brie) et *Penicillium roqueforti* est utilisé pour affiner les fromages à pâte persillée (exemples : Roquefort, Gorgonzola). Il est également possible de trouver *Geotrichum candidum* sur les fromages à pâte molle et croûte fleurie et les fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Saint-Nectaire, Reblochon). D'autres espèces sont retrouvées sur différents fromages à pâte pressée non cuite comme par exemple *Bisifusarium domesticum* sur le Saint-Nectaire, le Reblochon et la Raclette, *Mucor lanceolatus* et *Mucor fuscus* sur la Tomme de Savoie et le Saint-Nectaire, *Sporendonema casei* sur le Cantal et le Salers et *Scopulariopsis asperula* sur la Tomme des Pyrénées et le Ossau-Iraty (Dupont *et al.*, 2017; Hymery *et al.*, 2014; Ropars *et al.*, 2020a). Parmi ces espèces, certaines sont spécifiques à l'environnement fromager alors que d'autres sont ubiquitaires (Dupont *et al.*, 2017).

Ces moisissures se développent généralement à la surface des fromages sauf *Penicillium roqueforti* qui est une espèce microaérophile (Fairclough *et al.*, 2011) capable de se développer à l'intérieur des fromages à pâte persillée et qui est responsable du persillage de l'ensemble du fromage (cœur et croûte). Certaines espèces se développent plus rapidement que d'autres. *Geotrichum candidum* se développe dès les premiers jours d'affinage alors qu'environ 6 à 7 jours sont nécessaires

avant l'apparition de *Penicillium camemberti* à la surface des fromages à pâte molle et croûte fleurie (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004; Montel *et al.*, 2014; Spinnler, 2004). Pour le Saint-Nectaire, les espèces appartenant au genre *Mucor* commencent à se développer après 4 jours d'affinage alors que 20 jours sont nécessaires pour *Bisifusarium domesticum* (Montel *et al.*, 2014).

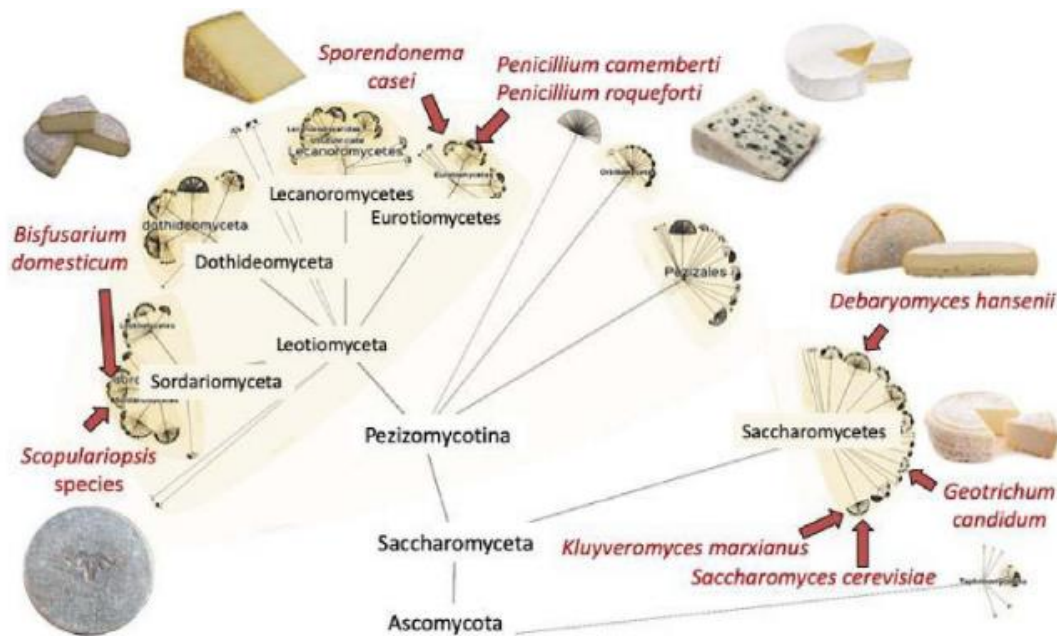


Figure 1. Arbre phylogénétique des champignons utilisés pour affiner les fromages (Ropars *et al.*, 2020a).

1.2. Domestication et ensemencement des moisissures d'intérêt technologique

La majorité des fromages sont produits à partir de lait pasteurisé dans lequel des ferments sont ajoutés : bactéries (exemples : *Lactobacillus* et *Lactococcus* (bactéries lactiques), *Propionibacterium* (bactéries propioniques)), levures (exemples : *Debaromyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*) et moisissures (exemples : *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*), les souches sélectionnées présentent des caractéristiques intéressantes pour la fermentation des fromages (Carr *et al.*, 2002; Fung, 2014; Garnier *et al.*, 2017b; Ropars *et al.*, 2020a; Thierry *et al.*, 2005). Les fromages sont des écosystèmes microbiens complexes où les bactéries, levures et moisissures interagissent en permanence (Mayo *et al.*, 2021).

Concernant les moisissures, le nombre de souches commercialisées est très limité. Les souches sélectionnées appartiennent majoritairement à des espèces domestiquées par l'Homme qui sont généralement inoculées volontairement à des fortes concentrations afin d'assurer une fabrication standardisée de fromages et qui présentent les propriétés organoleptiques recherchées (exemples : couleur, texture, saveur) et constantes au cours des différentes productions (Montel *et al.*, 2014).

La domestication est un cas particulier de divergence adaptative (différenciation d'une population associée à l'adaptation à une nouvelle niche écologique) sous la pression de l'Homme et dans un temps réduit. Elle implique notamment une sélection par l'Homme de caractères importants conférés par certains allèles qui conduisent à la différenciation de la population, associée à l'environnement de production laitière dans notre cas. Ce phénomène a été mis en évidence chez *Penicillium roqueforti*, chez qui deux évènements distincts de domestication ont été mis en évidence et ont conduit à la différenciation de deux populations « fromagères » utilisées d'une part pour la production de fromages à pâte persillée de type Roquefort et d'autre part pour l'ensemble des autres fromages (Dumas *et al.*, 2020). Ces deux populations fromagères ont acquis des caractères avantageux (exemples : couleur, production de spores, tolérance au sel, taux de croissance, activités métaboliques comme la lipolyse et la protéolyse, production de composés volatils) par le biais de différents processus génomiques impliqués dans l'adaptation aux environnements anthropiques (dont l'environnement fromager) par rapport aux populations non fromagères. La domestication impliquerait d'une part une sélection positive dirigée sur les gènes correspondant aux allèles d'intérêt et d'autre part, un relâchement global de la sélection négative sur les gènes non importants dans la production fromagère (Gibbons and Rinker, 2015). Ainsi, la reproduction sexuée semble avoir dégénéré chez ces deux populations fromagères. Les souches de la lignée non Roquefort se développent plus rapidement que les autres souches en milieu fromager. Ce phénomène est probablement lié, entre autres, à l'acquisition par transfert horizontal de deux régions génomiques appelées *CheesyTer* et *Wallaby* pour les souches de la lignée non Roquefort (Ropars *et al.*, 2015). Les régions confèrent des avantages pour se développer sur les fromages car elles contiennent des gènes impliqués dans le métabolisme du lactose / lactate et la compétition avec d'autres microorganismes.

Penicillium camemberti est également une espèce domestiquée, ses ancêtres sont *Penicillium bifforme* et *Penicillium fuscoglaucum* (Ropars *et al.*, 2020c, 2020a). Deux variétés distinctes ont été identifiées au sein de cette espèce. La variété *camemberti* est présente sur le Camembert et le Brie, ces souches sont de couleur blanche et elles sont capables de produire de l'acide cyclopiazonique. La variété *caseifulvum* est présente sur d'autres fromages comme le Saint Marcellin et la Rigotte de Condrieu, ces souches sont de couleur grise / verte et elles ne sont pas capables de produire de l'acide cyclopiazonique. La variété *camemberti* se développe plus rapidement que la variété *caseifulvum*. Cette variété contient les mêmes régions génomiques (*CheesyTer* et *Wallaby*) que celles identifiées chez la lignée non Roquefort de *Penicillium roqueforti*, à l'exception de trois souches isolées avant 1905 qui contiennent uniquement la région *Wallaby*. La variété *caseifulvum* contient uniquement la région génomique *CheesyTer*. Ces constats suggèrent que les gènes issus de transfert horizontaux entre

plusieurs espèces de *Penicillium* semblent favorables à l'adaptation et au développement des souches sur les fromages.

Une minorité de fromages sont produits à partir de lait cru et aucun ferment n'est ajouté volontairement. Les fromages sont placés dans des caves d'affinage où certaines moisissures appartenant notamment aux genres *Penicillium*, *Geotrichum* ou *Mucor* sont naturellement présentes et participent à leur affinage. Par exemple, le fromage de Bethlehem (fromage de type Saint-Nectaire) est fabriqué à partir de lait non pasteurisé et aucun ferment n'est ajouté lors de sa production ou de son affinage. *Geotrichum candidum*, *Trichothecium roseum* ainsi que des *Mucor* sont naturellement présents dans les caves d'affinage et participent à l'affinage du fromage de Bethlehem en se développant à sa surface (Marcellino and Benson, 2013).

1.3. Impact des flores d'intérêt technologique sur les propriétés organoleptiques des fromages

Les espèces appartenant aux genres *Penicillium*, *Geotrichum* et *Mucor* produisent des lipases, protéases et peptidases qui sont des enzymes impliquées dans le catabolisme des lipides, protéines et peptides. Ces activités lipolytique et protéolytique entraînent des changements d'aspect, de saveur, de goût et de texture (Coton *et al.*, 2020; Hermet *et al.*, 2012; McSweeney, 2004; Molimard and Spinnler, 1996; Montel *et al.*, 2014; Morin-Sardin *et al.*, 2016; Spinnler, 2004). De nombreux composés volatils (exemple : arômes) sont issus de ces activités métaboliques comme les cétones, les alcools, les aldéhydes, les amines, les phénols, les terpènes et bien d'autres molécules.

Bisfusarium domesticum (également appelé « Anticollanti ») est utilisé pour éviter l'aspect collant de la surface de certains fromages (Bachmann and Fuerst, 2003; Bachmann *et al.*, 2005; Savary *et al.*, 2021). Il a également été rapporté que l'activité protéolytique d'une souche de *Mucor* isolée de Mao-Tofu (aliment à base de soja fermenté) contribuait à l'obtention de la texture désirée des fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Raclette, Vacherin) (Zhang and Zhao, 2010).

Penicillium camemberti et *Geotrichum candidum* participent également à la protection des fromages à pâte molle et croûte fleurie contre le développement d'autres microorganismes d'altération (Decker and Nielsen, 2005; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Il a été montré que *Geotrichum candidum* est capable de réduire ou d'inhiber la croissance de plusieurs moisissures indésirables retrouvées sur des fromages. Sur des milieux gélosés (Czapek Yeast Agar et Cheese Agar), la croissance d'une souche de *Penicillium solitum* et d'une souche de *Penicillium discolor* est réduite (réduction entre 12 et 31% en fonction des conditions expérimentales) en présence de *Geotrichum candidum*. Sur des fromages de type Camembert, *Geotrichum candidum* est capable d'inhiber totalement la croissance des deux souches citées ci-dessus. Les facteurs intrinsèques à la matrice alimentaire (exemples : pH, sel) semblent plus favorables au développement de *Geotrichum candidum* que les milieux gélosés et

ils contribuent en partie à l'activité inhibitrice plus importante de *Geotrichum candidum* (Nielsen *et al.*, 1998). Il a été suggéré que la croissance rapide de *Geotrichum candidum* lui confère un avantage compétitif, il peut coloniser rapidement la surface des fromages, utiliser les nutriments disponibles et ainsi empêcher le développement de moisissures indésirables appartenant aux genres *Penicillium* et *Mucor* (Boutrou and Gue, 2005). Il a également été rapporté que *Geotrichum candidum* est capable de produire et d'excréter des composés qui possèdent une activité antimicrobienne. Parmi les composés identifiés, l'acide phényllactique possède une activité inhibitrice contre des bactéries (exemple : *Listeria monocytogenes*) et des moisissures (exemples : *Penicillium citrinum*, *Penicillium roqueforti*), le mécanisme d'action de cette molécule n'a pas encore été élucidé (Dieuleveux *et al.*, 1998; Naz *et al.*, 2013).

2. Les flores d'altération

2.1. Modes de contamination des fromages

De nombreux produits laitiers (exemples : beurre, fromages, yaourts) peuvent subir des altérations dues au développement des moisissures (Delavenne *et al.*, 2011; Garnier *et al.*, 2017b). Il peut s'agir d'altérations visibles (exemples : changement de couleur, texture, aspect, apparition du mycélium) ou invisibles (exemples : changement de goût, de saveur). Les contaminations des produits laitiers et notamment des fromages peuvent apparaître à plusieurs étapes : à la ferme, dans l'usine de production lors de la fabrication, de l'affinage et du stockage ou chez le consommateur. Les étables, les salles de traite et les pies des vaches sont des sources de contamination du lait. L'étape de pasteurisation permet d'éliminer la majorité des levures et des moisissures présentes dans le lait. Toutefois, ce dernier peut être recontaminé après cette étape. En effet, l'environnement de production est la principale source de contamination fongique. Les spores de moisissures peuvent être véhiculées par l'air ou l'eau (Bernardi *et al.*, 2019; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999) puis se déposer sur les matières premières (exemple : lait) et ingrédients (exemples : herbes, épices, fruits), surfaces de travail, équipements (exemples : étagères, claies à fromages). La saumure utilisée pour l'étape de salage des fromages est une source importante de contaminations fongiques (Garnier *et al.*, 2017a; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Le personnel peut également contribuer à la dispersion des spores (Bernardi *et al.*, 2019; Garnier *et al.*, 2017a; Kure and Skaar, 2019; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

2.2. Moisissures d'altération dans l'environnement fromager

Le fromage est une matrice alimentaire favorable au développement des moisissures, y compris celles responsables d'altérations (Sengun *et al.*, 2008). Les espèces contaminantes des fromages appartiennent majoritairement aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Mucor*. Les moisissures sont capables de se développer sur tous les fromages mais certains comme les fromages à pâte molle et

croûte fleurie sont particulièrement favorables à leur développement car l'activité de l'eau de ces produits est élevée, c'est pourquoi de nombreuses altérations fongiques de ces fromages ont été rapportées (Kure and Skaar, 2019). *Cladosporium herbarum*, *Scopulariopsis asperula* et de nombreuses espèces appartenant au genre *Penicillium* (exemples : *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium brevicompactum*) peuvent être responsables de l'apparition de tâches de diverses couleurs à la surface des fromages à pâte molle et croûte fleurie (Jacquet and Desfleurs, 1966a, 1966b, 1966c; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Les espèces appartenant au genre *Mucor* ont été identifiées comme responsables de l'altération dite du « poil de chat » à la surface de ces fromages, ce défaut entraîne l'apparition d'un aspect « poilu », d'une odeur de moisi et une altération du goût (Kure and Skaar, 2019; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Les fromages à pâte pressée peuvent également être altérés par des espèces appartenant aux genres *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Penicillium* et *Scopulariopsis* (Garnier *et al.*, 2017b; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

Les espèces d'intérêt technologique peuvent également être considérées comme des espèces d'altération lorsqu'elles ne sont pas inoculées volontairement et qu'elles provoquent l'altération de l'aliment. *Geotrichum candidum* peut être responsable d'un défaut de goût « levuré » lorsqu'il se développe dans du fromage frais (Boutrou and Gue, 2005; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Concernant *Penicillium roqueforti*, il est considéré comme une flore d'intérêt technologique lorsqu'il est présent sur des fromages à pâte persillée. En revanche, il est considéré comme une flore d'altération lorsqu'il est isolé sur d'autres types de fromages comme les fromages à pâte molle et croûte fleurie ou le fromage frais (Hymery *et al.*, 2014; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

Il a également été rapporté que certains défauts peuvent apparaître si le développement des flores d'intérêt technologique n'est pas maîtrisé (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). *Geotrichum candidum* peut être responsable des phénomènes dits de « peau de crapaud » et « couche graisseuse » si son développement est trop important à la surface des fromages à pâte molle et croûte fleurie. Le premier défaut est caractérisé par l'apparition d'une croûte épaisse et ridée et le second défaut est caractérisé par l'apparition d'une couche gluante à la surface des fromages. Les espèces appartenant au genre *Penicillium* sont responsables de plusieurs défauts de saveurs. Par exemple, un goût de rance peut apparaître si l'activité lipolytique de *Penicillium camemberti* ou *Penicillium roqueforti* est trop importante. Une activité protéolytique trop importante de *Penicillium camemberti* peut aussi être à l'origine de l'amertume des fromages. La production de styrènes entraîne un goût de celluloides et la production de 1-octen-3-ol entraîne un goût de champignon chez certaines souches de *Penicillium camemberti*. De même, la production de 1-3-pentadiène par *Penicillium roqueforti* peut être à l'origine d'un goût de kérosène (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Par conséquent, il est essentiel de sélectionner et

de maîtriser le développement des souches utilisées pour affiner les fromages afin d'empêcher l'apparition de caractéristiques organoleptiques non désirées.

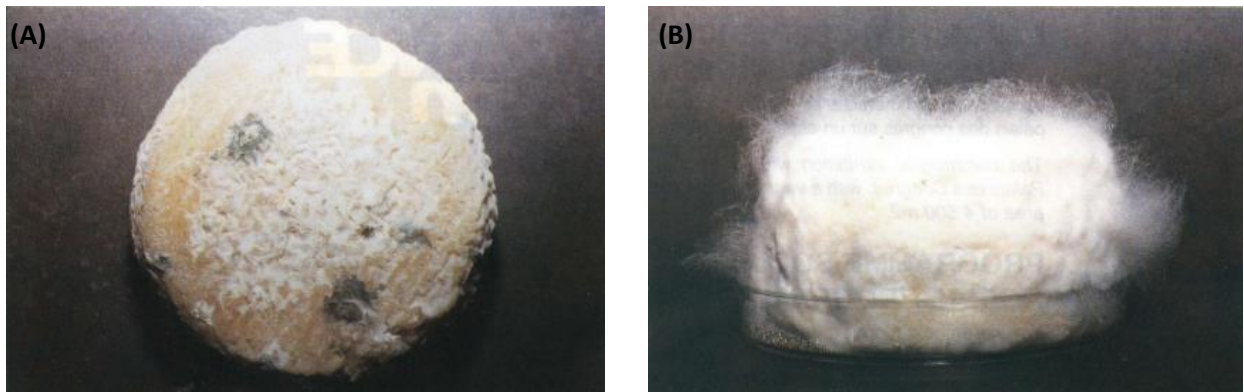


Figure 2. Photographies de fromages de chèvre contaminés par (A) *Penicillium roqueforti* (tâches vertes et bleues) et *Cladosporium herbarum* (petites taches noirâtres) et par (B) un *Mucor* (défaut « poil de chat ») (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

2.3. Moisissures productrices de mycotoxines dans l'environnement fromager

De nombreuses moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* sont capables de produire des métabolites secondaires indésirables de faibles poids moléculaires appelés mycotoxines (Hymery *et al.*, 2014). Lorsque ces molécules sont consommées, elles peuvent provoquer des maladies aiguës ou chroniques appelées mycotoxicoses, la mycotoxine et la dose ingérées déterminent le niveau de toxicité (Sengun *et al.*, 2008). Il a notamment été rapporté que les mycotoxines peuvent migrer et diffuser dans l'ensemble d'un produit alimentaire (Coton and Dantigny, 2019; Filtenborg *et al.*, 1996).

La production de mycotoxines est dépendante de facteurs biotiques (exemples : état physiologique de la moisissure, capacité à produire des mycotoxines, interactions avec d'autres microorganismes) et de facteurs abiotiques (exemples : température, pH, activité de l'eau, humidité relative, sel et présence de conservateurs) (Benkerroum, 2016; Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008). La production de mycotoxines n'est pas essentielle à la croissance des moisissures mais entre autres, elle confère un avantage sélectif aux moisissures qui les produisent lorsqu'elles sont dans un écosystème complexe en inhibant la croissance d'organismes compétiteurs. Il semblerait que les mycotoxines participent à la détoxification des cellules, cette production permettrait en effet d'éliminer les déchets issus d'un stress oxydatif aillant entraîner l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (appelées ROS) (Hymery *et al.*, 2014).

Bien que les fromages constituent une matrice favorable au développement des moisissures, ce substrat est peu propice à la production de mycotoxines (Fontaine *et al.*, 2015; Hymery *et al.*, 2014).

Par conséquent, même si de nombreuses mycotoxines ont été identifiées au sein des fromages, les quantités détectées sont généralement trop faibles pour induire des effets néfastes sur la santé humaine. Les contaminations des fromages par les mycotoxines peuvent être directes lorsqu'il s'agit du développement d'une moisissure à la surface du fromage ou indirectes lorsqu'elles sont liées à la contamination du lait utilisé pour la fabrication des produits (Hymery *et al.*, 2014).

Les mycotoxines peuvent être synthétisées par des moisissures d'altération mais aussi par des moisissures d'intérêt technologique. Toutefois, les souches sélectionnées pour l'affinage des fromages présentent généralement un faible potentiel de production de mycotoxines (Sengun *et al.*, 2008). Parmi les moisissures d'intérêt technologique capable de produire des mycotoxines, *Penicillium camemberti* peut produire de l'acide cyclopiazonique et *Penicillium roqueforti* peut produire de la roquefortine C, de l'acide mycophénolique, la toxine PR ainsi que d'autres mycotoxines (Finoli *et al.*, 2001; Hymery *et al.*, 2014; Kure and Skaar, 2019).

Toutes les mycotoxines ne présentent pas la même stabilité, certaines peuvent résister aux processus de fabrication et être stables (exemples : aflatoxines, ochratoxine A, citrinine, acide cyclopiazonique, roquefortine C, stérigmatocystéine). Il a été rapporté que la quantité de stérigmatocystéine détectée dans des fromages était constante à environ 3 µg/g de fromage après 14 jours et 90 jours de stockage à 4°C (Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008; Van Egmond, 1983). Des résultats similaires ont été observés pour l'aflatoxine M1 et la citrinine (Sengun *et al.*, 2008). Au contraire, d'autres mycotoxines ne persistent pas au sein des fromages (exemples : patuline, toxine PR, acide pénicillique) (Benkerroum, 2016; Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008). Il a été rapporté que la toxine PR n'est pas stable dans l'environnement fromager car elle peut réagir avec plusieurs types de molécules comme l'ammoniac, les sels d'ammoniac, les acides aminés, les amines, la caséine ou d'autres composés et ainsi former des imines PR qui sont moins toxiques que la toxine PR (Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008).

L'aflatoxine M1 (AFM₁) et l'ochratoxine A sont les mycotoxines les plus dangereuses identifiées dans les fromages (Hymery *et al.*, 2014). L'AFM₁ est un dérivé monohydroxylé de l'aflatoxine B₁ (AFB₁), cette conversion est généralement réalisée par le biais d'enzymes présente dans le foie des animaux avant de passer dans l'urine et le lait (Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008). L'AFM₁ fait partie des mycotoxines qui font l'objet de contrôles dans les produits alimentaires, la quantité mesurée est comparée aux valeurs limites définies par la réglementation qui peut varier d'un pays à l'autre (Benkerroum, 2016; Sengun *et al.*, 2008). Concernant l'ochratoxine, des études réalisées in vivo chez des porcs et des souris ont montré que cette mycotoxine peut agir de façon synergique avec l'acide pénicillique ou la citrinine (Hymery *et al.*, 2014).

L'augmentation de la sensibilité des méthodes utilisées pour détecter et quantifier les mycotoxines et le développement de nouvelles techniques d'analyses ont permis d'identifier de nouvelles mycotoxines « émergentes » (exemples : enniatine, beauvéricine, fusaproliférine) et des mycotoxines « masquées » lorsqu'elles sont liées à une autre substance (exemple : glucose), ces dernières ne pouvaient pas être détectées avec les méthodes classiques d'analyses (Benkerroum, 2016).

2.4. Stratégies pour réduire les contaminations fongiques

Dans l'industrie laitière, des méthodes de prévention et de contrôle peuvent être associées afin d'éliminer ou de retarder les altérations fongiques (Garnier *et al.*, 2017a). Les méthodes préventives (exemples : analyse des dangers et maîtrise des points critiques, contrôle des contaminations de l'air et des surfaces, désinfection) ont pour but d'empêcher la contamination ou la recontamination des produits lors du processus de fabrication. Les méthodes de contrôle (exemples : méthodes physiques, chimiques, biologiques) permettent d'inactiver les microorganismes, ralentir ou inhiber leur croissance dans les produits alimentaires.

Concernant les méthodes préventives, l'analyse des dangers et la maîtrise des points critiques (« *Hazard Analysis Critical Control Point* » (méthode HACCP)) peut être utilisée pour identifier, évaluer et contrôler les dangers grâce à de bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène avec la mise en place de procédures pour nettoyer, désinfecter et décontaminer régulièrement l'environnement de production et les équipements (Benkerroum, 2016; Garnier *et al.*, 2017a; Kure and Skaar, 2019; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999; Sengun *et al.*, 2008). Des contrôles d'hygiène de l'environnement comme des suivis réguliers des niveaux de contamination de l'air et des surfaces sont mis en place.

L'air est l'une des principales sources de contaminations fongiques (Kure and Skaar, 2019). Une étude réalisée dans des fermes laitières indiennes localisées à Bathi et Davangere a montré que pour la ferme située à Bathi, les moyennes des dénombrements pour les moisissures étaient supérieures à 10 unités formant colonie par mètre cube d'air par semaine alors que les moyennes des dénombrements pour les bactéries étaient inférieures à 10 unités formant colonie par mètre cube d'air par semaine. Ces résultats ont été obtenus pour toutes les zones analysées : extérieur de l'industrie, zones de réception, de pasteurisation et d'emballage du lait. Dans cette ferme, la quantité de moisissures dans l'air est donc plus importante que la quantité de bactéries. Pour la ferme située à Davangere, les moyennes des dénombrements pour les bactéries et les moisissures étaient proches pour toutes les zones analysées (Thirumala *et al.*, 2014). La filtration ou le renouvellement régulier de l'air sont des systèmes qui permettent de réduire les contaminations (Dagnas and Membré, 2013; Garnier *et al.*, 2017a, 2017b). Un système de pressurisation de l'air peut également être mis en place afin d'éviter des flux d'air des zones sales vers les zones propres.

Plusieurs types de désinfectants (exemples : ammonium quaternaire, acide péracétique, biguanide, éthanol, hypochlorite de sodium) sont autorisés dans les industries agroalimentaires, leur utilisation est soumise à une réglementation (Bernardi *et al.*, 2019; Visconti *et al.*, 2021a, 2021b). La sélection des désinfectants à utiliser par les industries agroalimentaires repose sur plusieurs critères : efficacité, coût, sécurité et compatibilité avec les matériaux à désinfecter. Il a été rapporté que l'efficacité du désinfectant dépend de la molécule, de la température, de la concentration et du temps de contact (Visconti *et al.*, 2022, 2021b). La désinfection peut être améliorée en combinant plusieurs désinfectants. En effet, il a été rapporté que la combinaison de l'acide formique et le peroxyde d'hydrogène pouvait avoir un effet synergique contre *Scopulariosis brevicaulis* et *Geotrichum candidum* (Garnier *et al.*, 2017a).

L'état physiologique de la moisissure, l'espèce mais aussi la souche peuvent également avoir un impact sur la désinfection (Visconti *et al.*, 2021b, 2020). En effet, il existe des variabilités inter- et intra-spécifiques de sensibilité aux désinfectants, ce phénomène pourrait être lié à une pression de sélection suite à une exposition répétée à ces composés antifongiques (Visconti *et al.*, 2021a, 2020). Certaines espèces et souches se sont adaptées et sont devenues résistantes à certaines molécules fongicides. Par conséquent, l'identification et la connaissance de la sensibilité des souches de moisissures isolées sont nécessaires afin de sélectionner le désinfectant le plus adapté à chaque situation. Il a également été rapporté que des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium* sont capables de former des biofilms en conditions de laboratoire. Ce phénomène doit être pris en compte car la matrice extracellulaire peut protéger les cellules et affecter l'action des désinfectants utilisés (Bernardi *et al.*, 2019).

Concernant les méthodes de contrôle, elles peuvent être intrinsèques (dépendantes de la matrice alimentaire) ou extrinsèques (lors de la production, du conditionnement, du stockage ou de la distribution) à la matrice alimentaire.

Parmi les méthodes physiques, certaines comme les traitements thermiques (exemples : pasteurisation, thermisation, stérilisation UHT) permettent l'inactivation (= la destruction) partielle ou totale des microorganismes. D'autres méthodes physiques comme les faibles températures (exemple : réfrigération) et les atmosphères modifiées permettent uniquement de ralentir ou d'inhiber la croissance des microorganismes (Garnier *et al.*, 2017a).

Il existe aussi des méthodes physico-chimiques qui peuvent ralentir ou inhiber le développement microbien. Il est possible de réduire l'activité de l'eau suite à une étape de séchage ou de salage, le potentiel redox suite à une diminution de l'O₂ et le pH suite à l'ajout d'acides organiques

(exemples : acides lactique, acétique). D'autres conservateurs comme les nitrites, sulfites et sorbates peuvent également être ajoutés (Garnier *et al.*, 2017a; Gonçalves and Kechinski, 2011; Padhan, 2018).

Concernant les méthodes biotiques, l'utilisation de flores compétitrices (exemples : *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti*) ou de cultures de bioprotection (exemples : bactéries lactiques, propioniques) impliquées dans la fermentation des produits laitiers peuvent produire de nombreux composés ayant une activité antifongique comme des antibiotiques, des bactériocines, des acides organiques et des acides gras (Garnier *et al.*, 2017a; Gonçalves and Kechinski, 2011; Padhan, 2018). Déjà évoqué précédemment, *Geotrichum candidum* est une espèce fongique compétitrice car elle est capable de se développer rapidement à la surface des fromages et elle produit des composés antimicrobiens (Naz *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 1998).

Ces dernières années, de nouvelles méthodes thermiques (exemples : chauffage ohmique, chauffage par microondes ou radiofréquences) et non thermiques (exemples : ultrasonication, ozonation, champ électrique pulsé, plasma froid) qui permettent de conserver les produits ont émergées afin de répondre aux demandes des consommateurs (Bernardi *et al.*, 2019; Garnier *et al.*, 2017a; Gonçalves and Kechinski, 2011; Khan *et al.*, 2017; Padhan, 2018). Les méthodes traditionnelles comme l'utilisation de conservateurs chimiques sont donc progressivement remplacées par de nouvelles méthodes qui assurent la qualité et la sécurité des produits sans ajouter de conservateurs.

Plusieurs techniques de conservation peuvent être combinées afin d'assurer la qualité, la stabilité chimique et microbiologique et la sécurité des produits laitiers. La combinaison des méthodes de conservation et leur intensité dépend du type de produit car certaines méthodes ne peuvent pas être appliquées à tous les produits alimentaires (Padhan, 2018). En effet, le produit alimentaire initial peut se trouver dénaturé si une seule barrière technologique est utilisée. Par exemple, l'ajout d'acide lactique en quantité élevée pour inhiber la croissance de microorganismes indésirables peut entraîner une diminution du pH du produit. Par conséquent, il est préférable de combiner plusieurs méthodes de conservation de faibles intensités (les propriétés organoleptiques et nutritionnelles du produit sont moins impactées) plutôt que d'utiliser une seule méthode de conservation de forte intensité.

L'utilisation de lait pasteurisé, un salage dans de la saumure, l'ajout de conservateurs (exemple : natamycine), d'acides organiques (exemples : acides sorbique, acide propionique), d'extraits de plantes (exemple : huiles essentielles) et une conservation à faible température dans des emballages sous atmosphères modifiées avec une faible quantité de dioxygène et une forte quantité de dioxyde de carbone constituent une combinaison de techniques de conservation visant à limiter l'altération fongique et ainsi augmenter la durée de vie des fromages (Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008).

2.5. Stratégies pour réduire les mycotoxines

La maîtrise des facteurs abiotiques permet de limiter le développement des moisissures et la production de mycotoxines. Les mycotoxines sont reconnues comme étant des composés stables et résistants à certains procédés comme le traitement thermique. Toutefois, de nombreuses approches physiques et chimiques sont utilisées pour essayer d'éliminer les mycotoxines présentes dans les aliments. Par exemple, l'application de lumière UV ou d'un traitement thermique sont des méthodes physiques qui permettent de réduire la quantité d'AFM₁ dans le lait (Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008). L'acidification, l'alcalinisation ou l'exposition à l'ozone sont des méthodes chimiques qui permettent de réduire la quantité de mycotoxines dans les produits alimentaires. Déjà évoquées précédemment, certaines méthodes ne peuvent pas être appliquées à tous les aliments (Benkerroum, 2016).

Il existe également des méthodes biologiques pour essayer de détruire les mycotoxines présentes dans les aliments. Certains microorganismes sont capables d'inactiver les mycotoxines ou de réduire leur toxicité par dégradation enzymatique partielle ou totale (Benkerroum, 2016; Juodeikiene *et al.*, 2012; Sengun *et al.*, 2008). Il a été montré que *Saccharomyces cerevisiae* est capable de réduire la quantité de plusieurs mycotoxines lors de la fermentation du moût. Cette espèce qui peut contribuer à l'affinage des fromages pourrait être inoculée dans le but de réduire la quantité de mycotoxines dans ce type de matrice si son efficacité est démontrée. Une autre alternative serait d'ajouter un cocktail d'enzymes issues de microorganismes qui dégradent les mycotoxines (Benkerroum, 2016).

II. Processus physiologiques impliqués dans développement des moisissures

La production de spores est la principale stratégie de dissémination des moisissures. Les spores peuvent être définies comme des capsules déshydratées en dormance renfermant un génome fongique, ce sont des structures microscopiques qui peuvent être véhiculées par l'air, l'eau ou des organismes vivants comme les animaux (Dijksterhuis, 2017; Osharov and May, 2001; Ropars *et al.*, 2020a). Ces cellules stabilisées sont caractérisées par une faible activité métabolique, l'absence d'extension cellulaire et une résistance plus importante que les cellules végétatives aux stress grâce à des constituants cellulaires et des biomolécules qui assurent leur protection. Les spores peuvent rester viables pendant une plus longue période que les cellules végétatives même si elles sont exposées à des conditions environnementales défavorables comme les radiations UV ou la sécheresse (Baltussen *et al.*, 2020; Krijgsheld *et al.*, 2013).

Ces cellules peuvent quitter leur état de stabilisation (appelé dormance), germer puis retrouver une croissance entraînant la formation d'un mycélium lorsque les conditions

environnementales deviennent favorables (Abdelghany, 2018; Dijksterhuis, 2017; Osherov and May, 2001; Roncal and Ugalde, 2003; Wyatt *et al.*, 2013). Ce mécanisme se décompose en plusieurs étapes caractérisées par des changements de structure et de métabolisme qui seront détaillés dans les paragraphes suivants. La description s'appuiera essentiellement sur des travaux réalisés sur des spores asexuées (appelées conidies chez les ascomycètes et basidiomycètes) appartenant à des espèces du genre *Aspergillus* et *Neurospora* (Baltussen *et al.*, 2020; Steinberg *et al.*, 2017). Au cours de ce travail doctoral, des spores asexuées ont été utilisées pour l'acquisition des données, c'est pourquoi les paragraphes suivants seront principalement axés sur ce type de spores.

1. Germination des spores asexuées

Les conidies sont composées d'une membrane plasmique, d'une paroi cellulaire contenant principalement des polysaccharides (exemples : chitine, glucanes) et des glycoprotéines, d'une couche de pigments (appelées mélanines) et d'une couche hydrophobe (qualifiée de « *rodlet layer* » qui contient des protéines de surface (appelées hydrophobines)). Les couches de mélanines et d'hydrophobines confèrent une protection aux conidies contre les stress extérieurs et sont essentielles dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire (Figures 3 et 4).

Le cytoplasme des spores est un milieu aqueux complexe qui contient les mêmes organites que les cellules fongiques végétatives : noyau, mitochondries, ribosomes, vacuoles, réticulum endoplasmique et corps lipidiques (Bhadauria *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 1976; Saharan *et al.*, 2015; Zaki *et al.*, 1973). Il contient également les éléments du cytosquelette comme les filaments d'actine et les microtubules ainsi que des molécules de différentes natures (exemples : solutés, macromolécules).

Les spores dormantes synthétisent et accumulent des sucres et sucres-alcools comme le tréhalose et le mannitol (également appelés solutés compatibles), ce sont des molécules organiques de faible poids moléculaire qui protègent les cellules en cas de stress sans interférer avec le métabolisme cellulaire. Des protéines de choc thermique et des déhydrines sont également produites. Toutes ces molécules confèrent une résistance à la spore lorsque les conditions environnementales sont défavorables (Figures 3 et 4). L'accumulation de solutés compatibles et l'absence d'eau libre dans les spores entraîne une augmentation de la viscosité du cytoplasme (également appelée microviscosité), un ralentissement de l'activité enzymatique et métabolique ainsi qu'une augmentation de la résistance aux stress environnementaux (Dijksterhuis, 2017; Wyatt *et al.*, 2013).

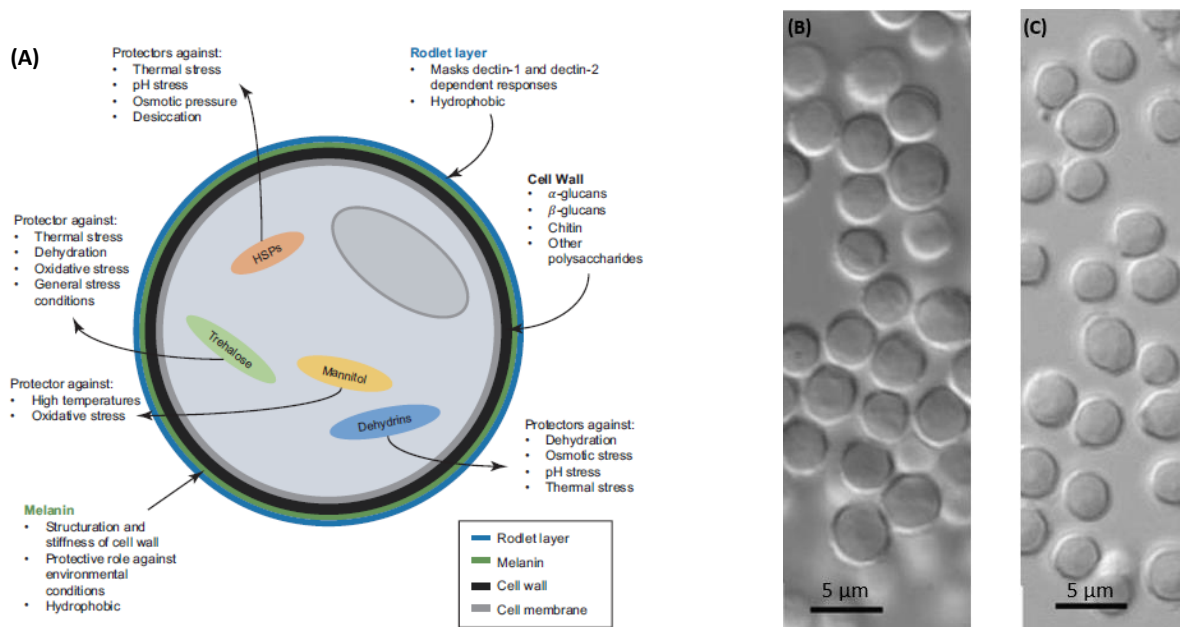


Figure 3. Représentation schématique d'une conidie (A) (Baltussen *et al.*, 2020). Micrographies de conidies d'*Aspergillus flavus* (B) et *Penicillium expansum* (C) (Pitt and Hocking, 2009).

La première étape est la sortie de la dormance de la spore qui correspond à l'activation de la spore. Elle est initiée par la détection d'oxygène, d'eau et de nutriments (exemples : sucres, sels inorganiques, acides aminés) par le biais de plusieurs voies de signalisation. Par exemple, la source de carbone peut être détectée par des protéines G membranaires qui vont activer la voie cAMP-PKA ou par la voie de signalisation Ras (Baltussen *et al.*, 2020). Certains processus biologiques (dont la respiration) sont initiés lors de la sortie de la dormance de la spore (Figure 4).

L'étape suivante correspond à la croissance isotropique durant laquelle le tréhalose et le mannitol sont dégradés. Les molécules de glucose libérées entrent dans la glycolyse pour former du glycérol. La pression osmotique interne augmente suite à l'accumulation de glycérol, la spore va absorber de l'eau et son diamètre va augmenter (D'Enfert, 1997). Le gonflement de la spore entraîne une augmentation du volume cellulaire et une diminution de la microviscosité (Dijksterhuis, 2017; Wyatt *et al.*, 2013). Ce phénomène va faciliter la diffusion des métabolites et favoriser les réactions enzymatiques. Lors de cette étape, plusieurs processus biologiques sont activés (Figure 4). La paroi de la spore subit également des modifications, la couche hydrophobe « rodlet layer » est dégradée ce qui facilite l'entrée de l'eau dans les spores tandis que la couche de mélanine peut être conservée dans certains cas. L'augmentation du diamètre de la spore nécessite une extension de la paroi cellulaire (Figure 4), de nouveaux polysaccharides sont donc synthétisés (Baltussen *et al.*, 2020).

La dernière étape correspond à la croissance polarisée (également appelée croissance anisotropique). La présence d'un axe de polarité spécifiquement établi permet de diriger la croissance

dans un sens ce qui entraîne la formation d'un tube germinatif. Lors de cette étape, de très nombreux processus biologiques supplémentaires sont activés (Figure 4).

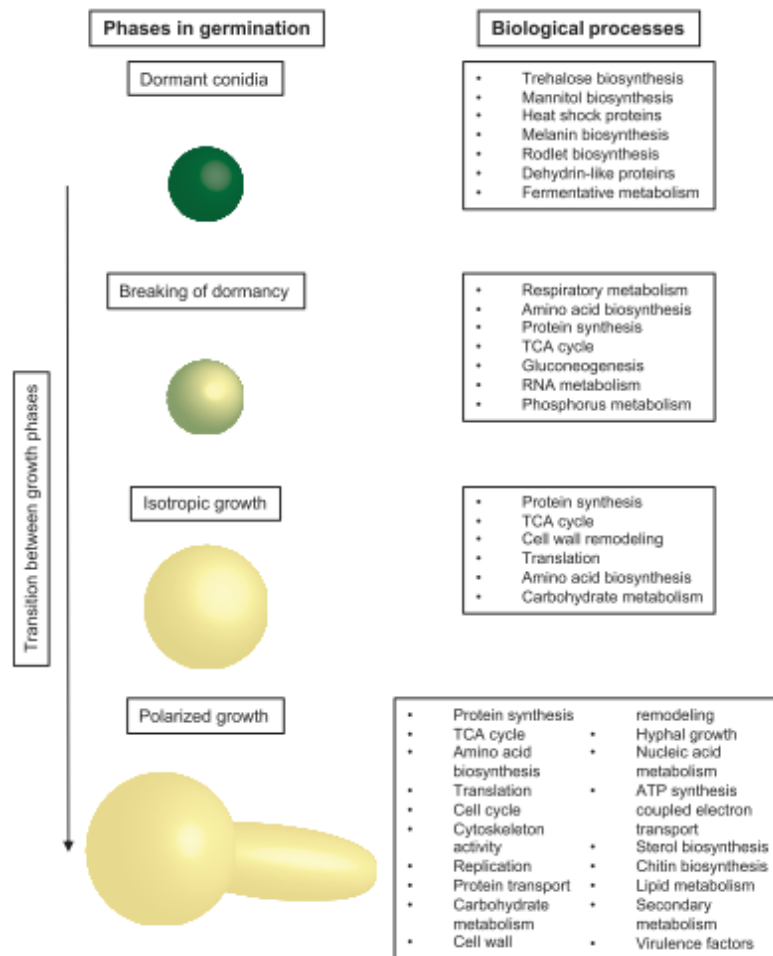


Figure 4. Synthèse des processus biologiques activés lors des différentes étapes de la germination des conidies (Baltussen *et al.*, 2020).

La germination des spores est une étape clé dans le développement des moisissures car si elle est inhibée, il n'y a pas de prolifération mycélienne. Certaines espèces appartenant au genre *Penicillium* produisent des molécules (1-octen-3-ol et 1-octanol) impliquées dans l'auto-inhibition de la germination des spores notamment chez *Penicillium paneum* (à 10^9 spores/mL) et *Penicillium camemberti* (à 10^8 spores/mL) lorsque les résultats de germination sont comparés à la condition témoin (à 10^6 spores/mL) (Chitarra *et al.*, 2004; Gillot *et al.*, 2016). Les mécanismes dans lesquels sont impliquées les molécules citées ci-dessous ne sont pas totalement élucidés.

2. Prolifération mycélienne

Le site de polarisation correspond à l'endroit où le tube germinatif va émerger et croître pour donner un hyphe (Figure 5). Lorsqu'une cellule est polarisée, le transport de matériel devient asymétrique, ce dernier va être favorisé vers le site de polarisation stabilisé grâce à la présence de

microdomaines riches en stérols (appelés « radeaux lipidiques » ou « *lipid rafts* ») et de nombreuses protéines apicales (Brand and Gow, 2009; Riquelme, 2013).

Une étude a mis en évidence l'augmentation de la quantité d'ergostérol au niveau du site de polarisation de la spore et à l'apex du tube germinatif (Leeuwen *et al.*, 2008). Ces observations ont été effectuées avec de la filipine qui est un marqueur fluorescent permettant de suivre la quantité d'ergostérol dans les membranes des cellules fongiques (Figure 5). Des dosages ont confirmé les observations microscopiques, la quantité d'ergostérol augmente au niveau de la zone apicale. Cette même étude a également montré que d'autres composés comme les filaments d'actine du cytosquelette jouent un rôle important dans la stabilisation des domaines riches en ergostérol.

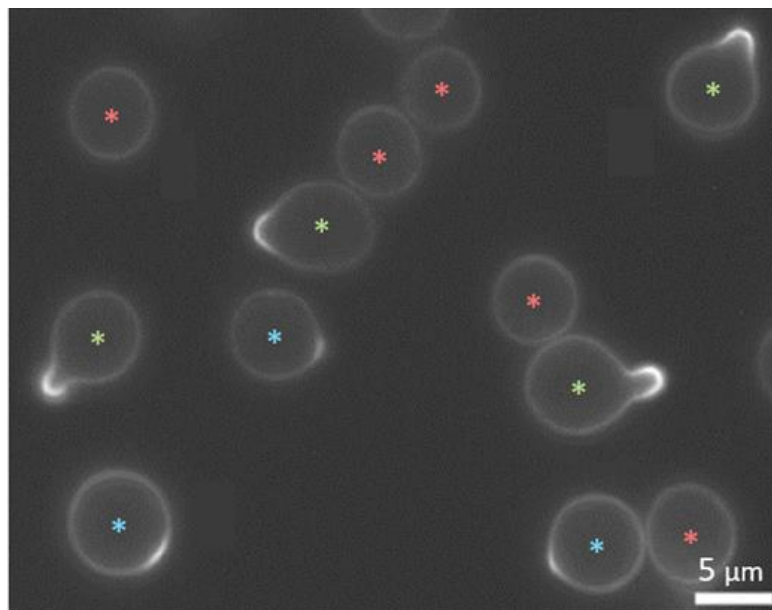


Figure 5. Micrographie d'une population de spores de *Penicillium discolor* prise au microscope à fluorescence après 8 heures d'incubation. Différents stades de la polarisation de l'ergostérol dans la membrane plasmique sont observés : fluorescence de faible intensité uniforme sur toute la membrane (*), fluorescence intense au niveau du site présumé de la formation du tube germinatif (*) et fluorescence intense et polarisée à l'apex du tube germinatif (*) (Leeuwen *et al.*, 2008).

La croissance apicale est également dépendante de la plasticité de la paroi cellulaire à l'apex, plusieurs mécanismes sont impliqués dans ce phénomène (Cairns *et al.*, 2019; Gow *et al.*, 2017; Riquelme, 2013; Sietsma *et al.*, 1995; Verdín *et al.*, 2019; Wessels, 1993). Dans les zones subapicales, des enzymes participent à la réticulation des polysaccharides, ces derniers sont reliés par des liaisons chimiques et forment un réseau tridimensionnel dense qui va entraîner une rigidification rapide de la paroi cellulaire. En revanche, la paroi cellulaire est plus souple dans la zone apicale car les polysaccharides sont faiblement réticulés et des glycohydrolases (exemples : chitinases, glucanases)

favorisent son relâchement. Le cytoplasme va également exercer une force mécanique sur la paroi cellulaire suite à l'augmentation de la pression de turgescence.

En parallèle, des vésicules de sécrétion contenant tous les composants nécessaires à la formation d'une nouvelle paroi cellulaire dont des enzymes de synthèse (exemples : chitine synthases, glucane synthases) sont transportées jusqu'à l'apex de l'hyphe (Figure 6) (Steinberg *et al.*, 2017). Le transport de ces vésicules se décompose en deux étapes et fait intervenir le centre Spitzenkörper (également appelé « corps apical ») qui est un centre d'approvisionnement relais où les vésicules de sécrétion sont concentrées. Il est constitué de vésicules, de ribosomes, de microtubules et de filaments d'actine (Figure 6) (Riquelme, 2013; Steinberg *et al.*, 2017; Verdín *et al.*, 2019). Pour commencer, les vésicules de sécrétion sont transportées le long des microtubules grâce aux kinésines jusqu'à atteindre le Spitzenkörper puis les vésicules vont être transportées jusqu'à la membrane plasmique grâce à l'action de la myosine V le long des filaments d'actine. Ensuite, le complexe exocyste localisé au niveau de la membrane plasmique va permettre l'ancrage et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique. Les petites vésicules contiennent des enzymes impliquées dans la synthèse de la chitine (chitine synthases) et les grandes vésicules contiennent des enzymes impliquées dans la synthèse des glucanes (glucane synthases). Ces enzymes sont actives lorsqu'elles sont insérées dans la membrane plasmique. Après exocytose, la nouvelle paroi cellulaire peut être synthétisée à l'apex conduisant à une extension des hyphes.

L'extension apicale des hyphes et leurs ramifications entraînent une augmentation de la surface d'échange ce qui permet de maximiser l'absorption des nutriments et la colonisation du substrat sur lequel se trouve la moisissure malgré son incapacité à se déplacer activement. Un mycélium est composé d'un réseau dense d'hyphes ramifiés (Figure 7) qui peuvent fusionner entre eux (phénomène appelé anastomose) et qui conduisent à l'apparition d'un mycélium visible à l'œil nu (Gougouli and Koutsoumanis, 2013). Le développement des moisissures peut avoir lieu en trois dimensions en milieu solide et liquide.

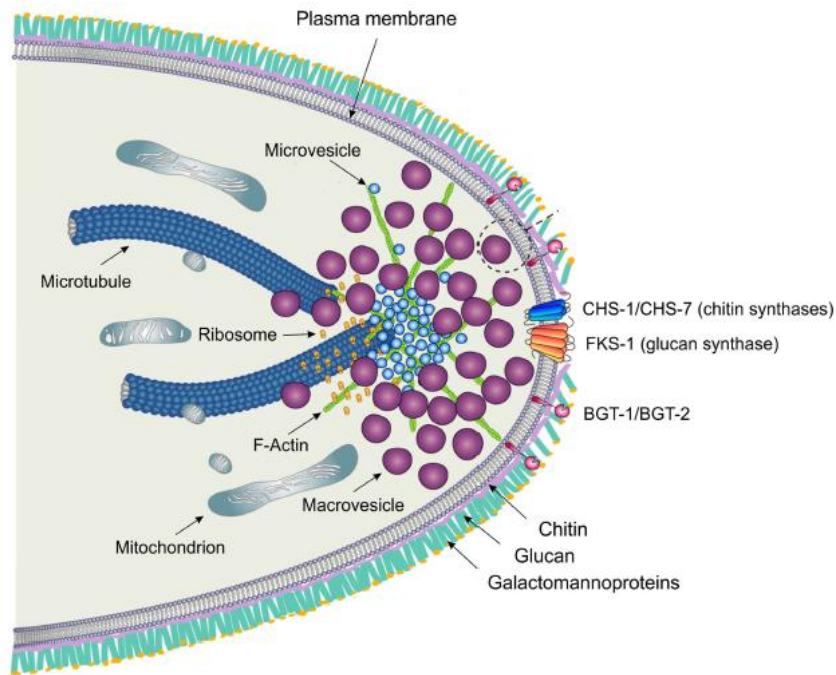


Figure 6. Schéma représentant les différents composants cellulaires impliqués dans la croissance apicale des hyphes chez *Neurospora crassa* (Steinberg *et al.*, 2017).

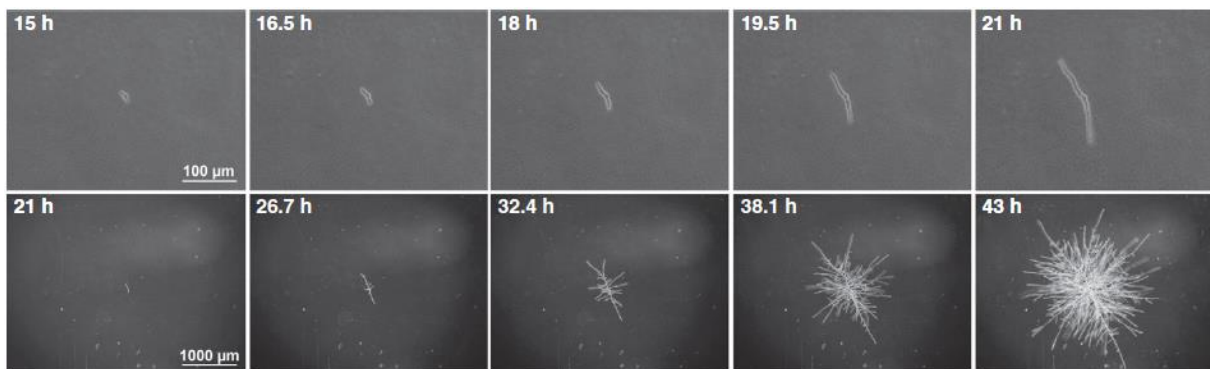


Figure 7. Micrographies de la prolifération mycélienne de *Penicillium expansum* sur un milieu de culture solide à l'extrait de malt à 25°C au microscope à contraste de phase. Sur la première ligne, le grossissement est x400 et sur la deuxième ligne le grossissement est x40. Le temps d'incubation (en heures) est indiqué en haut à gauche de chaque micrographie (Gougouli and Koutsoumanis, 2013).

3. Production de spores

La reproduction des moisissures entraîne la formation de spores asexuées ou sexuées. De nombreuses espèces possèdent une forme asexuée (appelée anamorphe) et une forme sexuée (appelée téléomorphe). Par exemple, *Byssochlamys nivea* et *Davidiella tassiana* correspondent respectivement à la forme sexuée de *Paecilomyces niveus* et *Cladosporium herbarum*. Depuis 2011, la nomenclature des champignons évolue afin d'harmoniser les noms qui désignent les espèces fongiques et ainsi simplifier la taxonomie. L'objectif final est de ne conserver qu'un seul et unique nom

pour désigner chaque espèce, cette nomenclature serait commune pour les deux types de reproduction (Taylor, 2011).

La reproduction sexuée nécessite la fusion de deux cellules (appelées gamétanges) qui peuvent être issues de deux individus différents (hétérothallisme) ou du même individu (homothallisme) (Abdelghany, 2018). La fusion des gamétanges se décompose en deux étapes : la fusion des cytoplasmes (appelée plasmogamie) puis la fusion des noyaux (appelée caryogamie) qui est suivie par un phénomène de méiose et possiblement de mitoses postméiotiques (Figure 8 et Tableau 1). Concernant la reproduction asexuée (appelée conidiogénèse chez les ascomycètes et basidiomycètes), c'est le phénomène de mitose qui est à l'origine de la formation des spores, la fusion de deux cellules n'est pas nécessaire (Figure 8 et Tableau 1) (Fischer and Kües, 2006; Wyatt *et al.*, 2013).

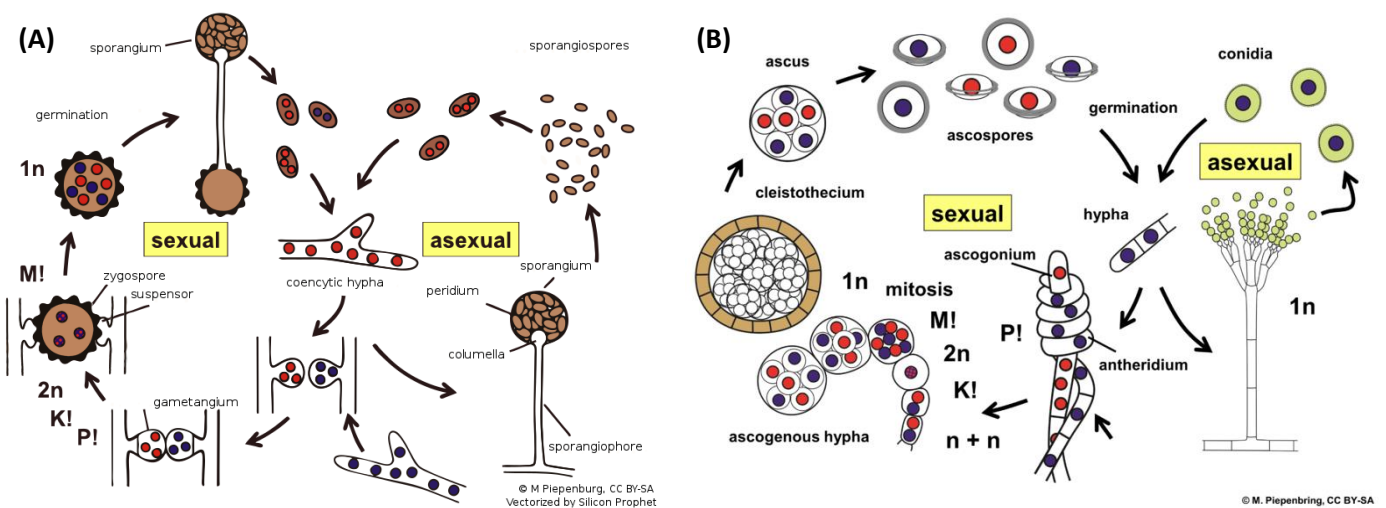


Figure 8. Cycle de reproduction asexuée et sexuée chez les espèces appartenant aux genres *Mucor* (zygomycètes, A) et *Penicillium* (ascomycètes, B). Légende : M : méiosis, K : karyogamy et P : plasmogamy. Source : Wikipédia.

Tableau 1. Récapitulatif des principales caractéristiques des types de reproduction pour les divisions *Mucoromycota*, *Ascomycota* et *Basidiomycota*.

Division	Reproduction	Mécanisme	Nom des spores	Formation des spores
<i>Mucoromycota</i>	sexuée	plasmogamie et caryogamie simultanées puis méiose	zygospores	Pas de structures sporogènes
<i>Ascomycota</i>		plasmogamie et caryogamie séparées dans le temps puis méiose	ascospores	Spores formées à l'intérieur des structures sporogènes (= asques) puis libération
<i>Basidiomycota</i>			basidiospores	Spores formées à l'extérieur des structures sporogènes (= basides)
<i>Mucoromycota</i>	asexuée	mitose	sporocystospores ou sporangiospores	Spores formées à l'intérieur des sporocystes (ou sporanges) après un clivage cytoplasmique du sporocyste puis libération
<i>Ascomycota</i>			conidies	Spores formées à l'extérieur des structures sporogènes
<i>Basidiomycota</i>				

Il existe deux types de conidiogénèse : la conidiogénèse thallique et la conidiogénèse blastique (Figure 9) (Fischer and Kües, 2006; Wyatt *et al.*, 2013). Lors de la conidiogénèse thallique, les spores sont formées suite à une différenciation de la cellule conidiogène préexistante (cellule apicale de l'hyphe). La conidiogénèse est qualifiée d'holothallic lorsqu'une spore unique est formée à partir de la cellule conidiogène et elle est qualifiée de thallique arthrique lorsque plusieurs spores sont formées à partir de la cellule conidiogène qui est fragmentée (exemple : espèces appartenant au genre *Geotrichum*).

Lors de la conidiogénèse blastique, des chaînes de spores (appelées blastospores) sont formées suite à une extension de la cellule conidiogène par bourgeonnement. La conidiogénèse est qualifiée d'holoblastique lorsque l'intégrité de la paroi de la cellule conidiogène est conservée. Chaque spore devient à son tour une cellule conidiogène. La formation de spores est majoritairement basipétale (les spores les plus anciennes sont à l'extrémité de la chaîne) à l'exception de quelques genres comme *Cladosporium* ou *Alternaria* pour lesquelles la formation de spores est acropétale (les spores les plus anciennes sont à la base de la chaîne). La conidiogénèse est qualifiée d'entéroblastique lorsque la paroi de la cellule conidiogène (appelée phialide) est rompue et une nouvelle paroi est synthétisée au niveau de l'ouverture à l'apex de cellule conidiogène. Les chaînes de spores sont formées par des mitoses successives, la formation de spores est basipétale (exemple : espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*).

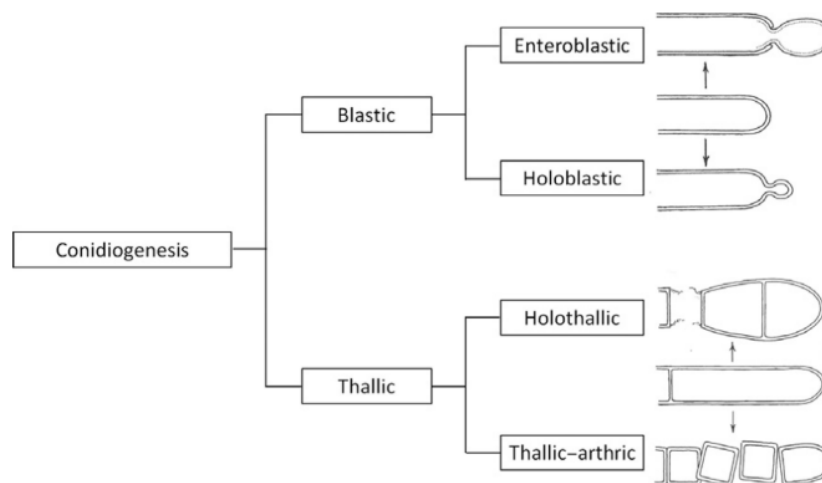


Figure 9. Schéma représentant les différents types de conidiogénèse (Wyatt *et al.*, 2013).

Les différentes étapes de la conidiogénèse ont notamment été décrites chez les espèces appartenant au genre *Penicillium*. La croissance apicale de l'hyphe s'arrête lors de l'induction (étape 1) puis la cellule apicale est délimitée par un septum et gonfle (étape 2). Après quelques heures, la cellule apicale se différencie en phialide (étape 3) qui va ensuite bourgeonner à l'extrémité (étape 4) pour donner une première conidie (Roncal and Ugalde, 2003). Chez les *Penicillium*, les phialides sont

organisées en bouquets et elles sont portées par des filaments intermédiaires (appelés métules et ramules) à l'extrémité d'un filament aérien (appelé conidiophore), la structure formée est dite « en pinceau ». Chez les *Aspergillus*, les phialides sont portées par des filaments intermédiaires (métules) disposés autour d'une cellule apicale (appelée vésicule) à l'extrémité du conidiophore, la structure formée est appelée « tête aspergillaire » (Figure 10) (Krijgsheld *et al.*, 2013).

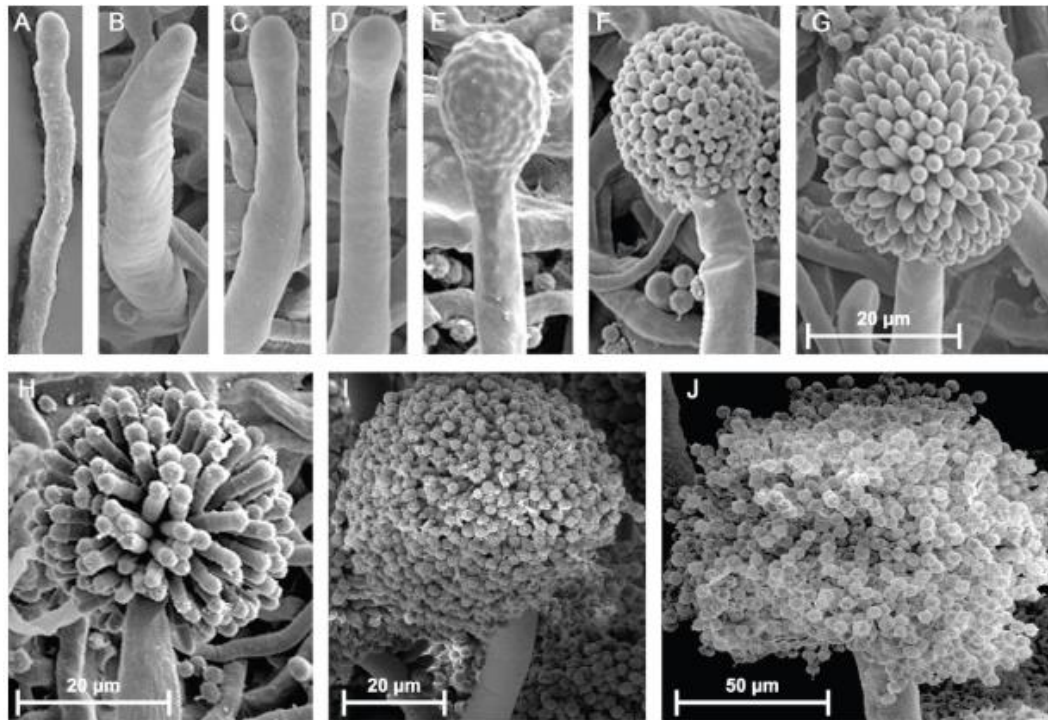


Figure 10. Suivi du développement d'*Aspergillus niger* au microscope électronique à balayage. Pour les micrographies A à F, l'échelle est la même que sur la micrographie G. L'hyphe végétatif (A) va s'épaissir (B) puis l'extrémité va gonfler et former une vésicule (C et D). Des bourgeons sont formés à la surface de la vésicule (E) et vont se développer en métules (F et G). Des phialides se forment à l'extrémité des métules (H) qui vont donner naissance à des chaînes de conidies (I et G) (Krijgsheld *et al.*, 2013).

En conditions de laboratoire, il est possible d'obtenir des spores asexuées après le développement de la moisissure en conditions favorables (milieu de culture et température adaptés). En revanche, la reproduction sexuée nécessite des conditions environnementales particulières, c'est pourquoi elle n'est pas toujours observée. Concernant la production de spores asexuées, elle peut être induite par des stimuli environnementaux exogènes et / ou des inducteurs endogènes (Roncal and Ugalde, 2003). Il a notamment été rapporté que plusieurs espèces appartenant au genre *Penicillium* sont capables de produire et d'excréter une molécule signalée auto-régulatrice (appelée conidiogénone) qui induit la sporulation lorsqu'elle est accumulée en excès à partir d'un certain seuil (Roncal and Ugalde, 2003). Le mécanisme d'action de cette molécule auto-inductrice n'a pas été totalement élucidé.

La littérature propose davantage de données sur les spores asexuées que sur les spores sexuées. Ceci est probablement dû au fait que les spores sexuées sont plus difficiles à produire en laboratoire. Pourtant, ces dernières peuvent être plus problématiques pour les industriels. Il a été rapporté que les ascospores sont plus résistantes aux conditions environnementales défavorables que les conidies et les cellules végétatives (Dijksterhuis, 2017; Dijksterhuis *et al.*, 2007). Des études réalisées dans de la purée de fraises ont montré que les conidies sont moins résistantes aux traitements thermiques que les ascospores. La durée de réduction décimale (D) est la valeur correspondant au temps en minutes nécessaire pour inactiver 90% des microorganismes à une température donnée. Dans de la purée de fraises, la valeur de D moyenne est de 1,7 minutes pour les conidies de *Botrytis cinerea* à 48°C alors que la valeur de D est supérieure à 449 minutes pour les ascospores de *Talaromyces flavus* à 80°C (Muria *et al.*, 2020; Villa-rojas *et al.*, 2012).

III. Maîtrise du développement des moisissures par l'activité de l'eau et le dioxyde de carbone

Plusieurs facteurs abiotiques tels que la température, le pH, l'activité de l'eau (a_w), le dioxygène (O_2), le dioxyde de carbone (CO_2), le potentiel redox et les acides organiques permettent de contrôler le développement des moisissures. Il a été rapporté que l' a_w et la température sont les deux facteurs abiotiques qui impactent le plus fortement le développement des moisissures (Dagnas and Membré, 2013). Au cours de cette thèse, l' a_w et le CO_2 ont été étudiés. Par conséquent, les paragraphes suivants seront axés uniquement sur ces facteurs abiotiques.

1. Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est définie comme le ratio entre la pression de vapeur de l'eau dans l'aliment et la pression de l'eau pure dans les mêmes conditions, ce ratio est compris entre 0 et 1. Plus l' a_w de l'aliment est élevée (valeur d' a_w proche de 1) et plus l'eau est disponible (appelée eau libre) pour les transferts de molécules, les réactions chimiques (exemple : réactions d'hydrolyse), l'activité enzymatique (exemples : brunissement enzymatique, oxydation des lipides) et la croissance des microorganismes. Au contraire, pour les basses a_w , l'eau forme des liaisons avec les molécules de la matrice (appelée eau liée), elle est donc moins disponible pour participer aux phénomènes cités précédemment. Certaines molécules sont ajoutées aux aliments (exemples : sucres, sels) car elles contribuent à la réduction de l' a_w en favorisant la formation de liaisons avec l'eau ce qui va entraîner une augmentation de la quantité d'eau liée et une diminution de la quantité d'eau libre (Chawla, 2018; Sandulachi, 2012).

1.1. Impact de l'activité de l'eau sur le cycle de vie des moisissures

L'impact de l' a_w sur la germination des spores, la prolifération mycélienne, la sporulation et la production de mycotoxines a fait l'objet de nombreuses études. L'effet de l' a_w sur chaque étape citée précédemment sera décrit dans les paragraphes suivants.

Concernant la germination des spores, plusieurs études ont montré que le temps nécessaire à la germination augmente lorsque l' a_w est réduite (Abellana *et al.*, 1999; Dagnas *et al.*, 2017; Gock *et al.*, 2003; Hocking and Pitt, 1979; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a; Plaza *et al.*, 2003). En effet, si la quantité d'eau libre pouvant être absorbée par les spores est moins importante lorsque l' a_w est faible, l'hydratation et le gonflement des spores sont plus lents, ce qui peut entraîner un retard de germination (Gottlieb, 1950; Kalai *et al.*, 2017). Des études ont également montré que le nombre de spores capables de germer peut diminuer lorsque l' a_w diminue. Pour une a_w de 0,800 a_w (valeur d' a_w proche de la valeur limite pour laquelle aucune germination n'est observée) modulée avec du chlorure de sodium (NaCl), le pourcentage de spores germées est de 60% maximum après 30 jours d'incubation pour *Penicillium roqueforti* et *Penicillium expansum* (Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Le même phénomène a été observé pour une souche d'*Eurotium chevalieri* et une souche d'*Eurotium herbariorum*, seulement 80% des spores étaient capables de germer pour une a_w de 0,775 a_w après environ 14 jours d'incubation à 25°C (Abellana *et al.*, 1999). Il a également été rapporté que la germination peut se produire à une a_w plus faible que celle nécessaire à la prolifération mycélienne. Lorsque l' a_w testée est proche de la valeur minimale nécessaire à la germination, la germination des spores peut avoir lieu mais elle n'est pas toujours suivie par la formation d'un mycélium visible (Hocking and Miscamble, 1995; Magan and Lacey, 1984a; Pardo *et al.*, 2006).

Plusieurs travaux ont montré que le temps avant l'apparition d'un mycélium visible augmente et que le taux de croissance diminue lorsque l' a_w est réduite (Abellana *et al.*, 1999; Gock *et al.*, 2003; Hocking and Pitt, 1979; Morin-Sardin *et al.*, 2016; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a; Peromingo *et al.*, 2016; Plaza *et al.*, 2003). Chez *Stachybotrys chartarum*, l'extension des tubes germinatifs est plus lente lorsque l' a_w diminue (Schale *et al.*, 2011), ce phénomène pourrait être à l'origine du ralentissement de la prolifération mycélienne.

L'impact de la réduction de l' a_w sur la sporulation et la production de mycotoxines varie en fonction de la souche étudiée et des conditions expérimentales. Il a été rapporté que la prolifération mycélienne peut se produire à une plus faible a_w que la sporulation ou la production de mycotoxines (Bernáldez *et al.*, 2017; Beuchat, 1983; Leggieri *et al.*, 2016; Magan and Lacey, 1984a). Lorsque l' a_w testée est proche de la valeur minimale nécessaire à la prolifération mycélienne, la sporulation et / ou la production de mycotoxines n'ont pas toujours lieu. Par exemple, il a été rapporté qu'*Aspergillus*

versicolor est capable de se développer à 0,78 a_w alors que la sporulation n'est observée qu'à partir de 0,80 a_w et la stérigmatocystine n'a pas été détectée lorsque l' a_w était inférieure à 0,93 a_w (Leggieri *et al.*, 2016; Magan and Lacey, 1984a).

La nature du soluté utilisé pour réduire l' a_w du milieu de culture peut induire des réponses différentes de prolifération mycélienne, sporulation et production de mycotoxines. Il a été rapporté que plusieurs *Mucor* sont plus sensibles à un stress ionique qu'à un stress non ionique (Marín *et al.*, 2014; Morin-Sardin *et al.*, 2016). Chez *Aspergillus ochraceus*, la sporulation augmente lorsque l' a_w est réduite de 0,93 à 0,85 a_w suite à un ajout de glycérol. En revanche, lorsque le NaCl est utilisé comme dépresseur pour les mêmes niveaux d' a_w , la sporulation diminue (Abdel-Hadi, 2017). La nature du soluté utilisé pour réduire l' a_w semble avoir une importance dans la production de mycotoxines chez *Aspergillus flavus* (Giorni *et al.*, 2011). Lorsque l' a_w est réduite avec du NaCl, la production de l'aflatoxine B₁ (AFB₁) diminue entre 0,95 et à 0,90 a_w . En revanche, la production augmente lorsque l' a_w est réduite à 0,90 a_w avec du glycérol. D'autres études montrent des résultats contradictoires, la production de la mycotoxine AFB₁ est plus importante lorsque la quantité de glycérol est faible (a_w élevée) chez cette espèce (Chuaysrinule *et al.*, 2020; Lasram *et al.*, 2016).

1.2. Impact de l'activité de l'eau sur la physiologie cellulaire des moisissures

La majorité des études disponibles ont été réalisées sur les levures modèles *Debaryomyces hansenii* et *Hortaea werneckii* (halotolérantes) ainsi que *Saccharomyces cerevisiae* (sensible au sel) (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009). L'ajout de sel ou de sucre dans le milieu de culture induit un stress osmotique. Un choc hyperosmotique déclenche une efflux d'eau hors de la cellule, ce dernier va entraîner une réduction de la pression de turgescence et une déshydratation du cytoplasme (Gunde-cimerman and Zalar, 2014). En cas de stress ionique, comme par exemple lorsque du sel est ajouté (exemple : NaCl), les protéines cellulaires et les systèmes membranaires sont endommagés par les ions Na⁺ (Gunde-cimerman and Zalar, 2014; Plemenitaš *et al.*, 2016). Il a également été rapporté qu'une forte concentration en sel induit un stress oxydatif en plus d'un stress osmotique.

Certains composés extracellulaires participent à la protection des microorganismes en cas de choc hyperosmotique. En effet, la production et la sécrétion de polymères de sucres (appelés exopolysaccharides, EPS) dans le milieu constitue à la fois une couche protectrice contre la dessiccation mais aussi une réserve d'eau nécessaire à la survie des cellules (Kanekar *et al.*, 2012). En effet, les exopolysaccharides peuvent former des liaisons avec l'eau pour la retenir et ainsi la rendre disponible pour les cellules (Costa *et al.*, 2018; Dave, 2016; Musa *et al.*, 2018).

Les hydrophobines sont de petites protéines actives de surface (extracellulaires) accumulées chez certaines moisissures qui peuvent également former une couche hydrophobe protectrice contre

la dessiccation (Linder, 2009; Linder *et al.*, 2005; Pérez-Llano *et al.*, 2020). Il a également été rapporté que les hydrophobines pourraient renforcer la paroi cellulaire en modifiant sa perméabilité, ce phénomène est important en présence d'ions toxiques qui peuvent pénétrer dans les cellules (Skizewska *et al.*, 2022). D'autres composés intracellulaires participent à la protection des microorganismes en cas de choc hyperosmotique, ils seront détaillés dans les paragraphes suivants.

A. Stress osmotique

Le principal mécanisme qui permet de percevoir des stimuli externes variés en lien avec un stress osmotique est la voie de signalisation HOG (« *High Osmolarity Glycerol* ») (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009). Ce mécanisme de signalisation permet une adaptation des cellules à l'environnement extérieur par un ajustement de la machinerie cellulaire (Hohmann, 2015).

a. Accumulation de solutés compatibles

Pour survivre à un choc osmotique, les cellules doivent limiter la perte de volume cellulaire en maintenant une pression de turgescence positive. Pour cela, la pression osmotique du cytoplasme doit être supérieure à celle du milieu extérieur (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2007, 2006b, 2005; Luxo *et al.*, 1993; Plemenitaš *et al.*, 2008). La stratégie principale utilisée pour contrer un changement de pression osmotique externe lié à l'ajout d'un dépresseur est la production et l'accumulation cytoplasmique de solutés compatibles qui vont entraîner une augmentation du potentiel osmotique intracellulaire (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Déjà évoqués précédemment, ces composés (aussi appelés osmolytes) sont des molécules organiques généralement non chargées et de faible poids moléculaire qui protègent les cellules contre un stress osmotique en participant à l'osmorégulation sans interférer avec le métabolisme cellulaire et l'activité enzymatique (Adler *et al.*, 1982; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010; Skizewska *et al.*, 2022). De nombreux sucres (exemples : polyhydroxy alcools (=polyols), trehalose, sucrose, glucose) sont considérés comme des solutés compatibles qui peuvent être accumulés lorsque l' a_w diminue (Davis *et al.*, 2000; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Kogej *et al.*, 2005; Luard, 1982a, 1982b; Musa *et al.*, 2018; Welsh, 2000).

Chez de nombreux champignons, le principal soluté compatible accumulé est le glycérol (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Hocking, 1986; Luxo *et al.*, 1993; Zidan and Abdel-Mallek, 1987), sa production est la moins coûteuse énergétiquement car c'est le soluté compatible le plus simple qui présente un faible poids moléculaire (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2007). Chez *Aspergillus montevicensis* et *Aspergillus sydowii*, il a rapporté que l'expression des gènes est en faveur de l'accumulation de glycérol au sein des cellules en présence de sel (Liu *et al.*, 2017; Pérez-Llano *et al.*, 2020).

D'autres polyols (aussi appelés alditols) peuvent être accumulés en mélange tels que l'érythritol, l'arabitol (aussi appelé arabinitol ou lyxitol), le mannitol, l'inositol, le xylitol, le ribitol, le sorbitol et le galacticol (Adler *et al.*, 1982; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Kogej *et al.*, 2007, 2006b; Luard, 1982a, 1982b; Luxo *et al.*, 1993). Par exemple, plusieurs souches appartenant au genre *Aspergillus* sont capables d'accumuler de l'arabitol et du mannitol en plus du glycérol après 15 jours d'incubation à 28°C sur un milieu contenant 15% de NaCl (El-Kady *et al.*, 1995). L'accumulation d'un cocktail de polyols permet de réduire la toxicité qui pourrait être associée à l'accumulation d'un seul osmolyte en très forte quantité (Kogej *et al.*, 2007). Le coût énergétique pour la synthèse de ces composés est plus élevé mais ils sont mieux retenus que le glycérol au sein des cellules (Kogej *et al.*, 2007; Luxo *et al.*, 1993).

En effet, le glycérol présente un fort coefficient de perméabilité membranaire, il peut donc traverser plus facilement la bicouche lipidique des membranes de façon passive par rapport à d'autres composés, ce qui peut limiter sa rétention (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018; Kogej *et al.*, 2007). De plus, il semblerait que d'autres espèces comme *Geotrichum candidum* et *Penicillium digitatum* ne possèdent pas de système permettant d'accumuler et de retenir efficacement le glycérol à l'intérieur des cellules (Hocking, 1986; Luxo *et al.*, 1993).

Généralement, plus la quantité de sel augmente et plus la quantité de polyols accumulée est importante (Adler *et al.*, 1982; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Hocking, 1986; Kogej *et al.*, 2007; Plemenitaš *et al.*, 2008) comme chez *Aspergillus monotetrasporus* où la quantité totale de solutés compatibles est deux fois plus importante en présence de sel (Liu *et al.*, 2017). Il a également été rapporté que la nature du soluté utilisé pour réduire l' a_w peut avoir un impact sur le polyol accumulé. *Zygosaccharomyces rouxii* accumule du glycérol en cas de stress salin avec du NaCl et de l'arabitol en cas de stress sucré avec du glucose (Adler *et al.*, 1982).

Les polyols accumulés varient aussi en fonction de l'âge de la culture, la synthèse de petits polyols est favorisée en phase exponentielle de croissance afin de limiter l'inhibition enzymatique. En effet, lorsque la taille des polyols diminue, l'inhibition de l'activité enzymatique diminue (Adler *et al.*, 1982). En revanche, l'accumulation de polyols avec un poids moléculaire élevé en phase stationnaire génère une pression osmotique intracellulaire plus élevée que des polyols avec un poids moléculaire faible à la même concentration (Kogej *et al.*, 2007). Par exemple, *Hortaea werneckii*, *Debaryomyces hansenii* et *Aspergillus niger* accumulent du glycérol en phase exponentielle, ce dernier diminue en phase stationnaire car il est remplacé par d'autres polyols (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Kogej *et al.*, 2007; Pérez-Llano *et al.*, 2020; Witteveen and Visser, 1995) ou métabolisé pour être converti en molécules de stockage (Hocking, 1986; Kogej *et al.*, 2007).

En plus des sucres décrits précédemment, des acides aminés et d'autres molécules dérivées (exemple : mycosporines) peuvent être accumulées et agir comme des solutés compatibles (Kogej *et al.*, 2007, 2006b; Oren and Gunde-Cimerman, 2007; Skizewska *et al.*, 2022). Par exemple, *Debaryomyces hansenii* peut parfois accumuler de l'acide glutamique et de l'alanine en plus du glycérol (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009). Il a également été rapporté que la proline et la glycine bêtaïne (dérivé de la glycine) sont accumulées chez certaines levures et moisissures (Box, 1982; Davis *et al.*, 2000; Lambou *et al.*, 2013).

Concernant les mycosporines, ce sont des molécules de faible poids moléculaire solubles dans l'eau et lorsqu'elles contiennent un résidu d'acide aminé elles sont appelées « *mycosporines-like amino acids* » (MAAs). Elles sont accumulées par de nombreux microorganismes et elles assurent une protection contre les radiations UV, la dessiccation, les stress thermiques et potentiellement contre les stress oxydatif ou hydrique. Une étude a montré que ces molécules sont impliquées dans l'osmorégulation chez les cyanobactéries car lorsque la salinité du milieu de culture est diminuée par dilution, elles sont relarguées de façon proportionnelle à la dilution (Oren and Gunde-Cimerman, 2007). Chez *Hortaea werneckii*, la mycosporine-glutaminol-glucoside pourrait agir comme un soluté compatible supplémentaire lorsqu'elle est accumulée à 5 et 10% de NaCl (Kogej *et al.*, 2007, 2006b; Plemenitaš *et al.*, 2008).

b. Modification de la composition et de la structure de l'enveloppe cellulaire

Une autre stratégie pour survivre à un stress osmotique consiste à modifier la composition et la structure de la membrane plasmique ou de la paroi cellulaire (Gostincar *et al.*, 2011; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Skizewska *et al.*, 2022). Déjà évoquées précédemment, les mélanines sont des molécules complexes (pigments) de poids moléculaires élevés, chargées négativement, hydrophobes, insolubles dans des solvants aqueux et organiques. Ces molécules confèrent une protection contre les radiations, la lyse enzymatique, les températures extrêmes ainsi que les agents oxydants (Kejžar *et al.*, 2013). La 1-8 dihydroxynaphtalene mélanine est constitutive chez *Hortaea werneckii* (Kejžar *et al.*, 2013; Musa *et al.*, 2018), elle diminue la perméabilité de la paroi cellulaire aux solutés compatibles en réduisant la taille des pores ce qui limite la perte de glycérol (Figure 11). Par conséquent, la rétention et l'accumulation de solutés compatibles (notamment le glycérol) et la rétention d'eau sont favorisées au sein des cellules (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2007, 2006a; Musa *et al.*, 2018). Le glycérol étant retenu de façon efficace grâce aux pigments de mélanine, les coûts énergétiques liés à la synthèse de solutés compatibles sont faibles car ils n'ont pas besoin d'être produits en grandes quantités, ce qui peut lui conférer un avantage par rapport à d'autres espèces en cas de stress salin (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2007; Skizewska *et al.*, 2022).

En conditions optimales de croissance (5% de NaCl), les granules de mélanine forment une couche de protection dense et coalescente sur la partie externe et à l'intérieur de la paroi cellulaire (barrière mécanique). Lorsque la salinité augmente (10 et 20% de NaCl), les granules de mélanine sont plus rares et ils ne forment plus une couche continue de protection. Les expériences réalisées avec un inhibiteur spécifique d'une enzyme impliquée dans la mélanisation en conditions optimales de croissance ont montré que les cellules non mélanisées retiennent moins le glycérol que les cellules mélanisées, la perte de glycérol est compensée par l'accumulation d'érythritol et d'arabitol qui ont des masses moléculaires plus élevées (Kogej *et al.*, 2007). La quantité de mycosporine-glutaminol-glucoside diminue également dans les cellules non mélanisées. Lorsque la synthèse de mélanine est inhibée chez *Hortaea werneckii*, l'intégrité de la paroi cellulaire est perturbée ce qui entraîne une augmentation de la porosité et donc une perte de solutés compatibles (sucres et mycosporine-glutaminol-glucoside) (Kejžar *et al.*, 2013; Kogej *et al.*, 2007).

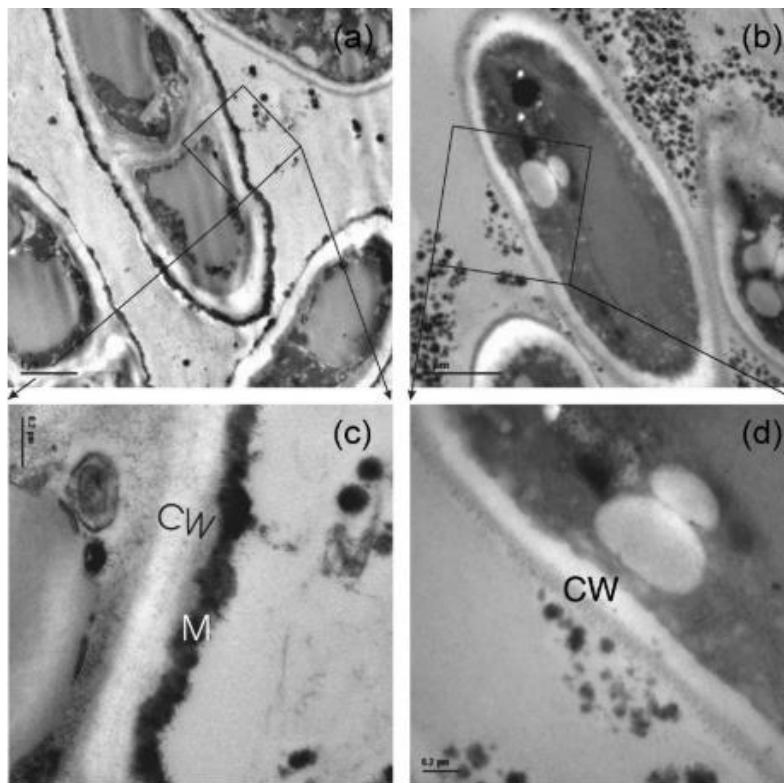


Figure 11. Micrographies de cellules de la levure *Hortaea werneckii* mélanisées (a et c) et non mélanisées (b et d) obtenus au microscope électronique à transmission. Légende : CW : cell wall, M : melanin (Kogej *et al.*, 2007).

D'autres modifications de la paroi cellulaire ont été identifiées à forte salinité. En effet, il a été rapporté que la transcription des gènes associés au remodelage de la structure de la paroi cellulaire est modifiée chez *Aspergillus sydowii* (Pérez-Llano *et al.*, 2020). Les quantités de chitine et chitosan diminuent suite à des hydrolyses enzymatiques tandis que la synthèse et la modification des β -glucanes augmentent, ces derniers sont réarrangés de façon à augmenter l'épaisseur mais aussi à réduire l'élasticité de la paroi cellulaire.

La membrane plasmique des cellules est une barrière active qui peut également subir des modifications en présence de sel. La composition des membranes peut avoir un impact sur les propriétés membranaires et notamment sur la fluidité (Turk *et al.*, 2004). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une diminution de la taille des acides gras des phospholipides a été observée en présence de sel, la quantité d'acide oléique diminue alors que la quantité d'acide palmitoléique augmente, ce qui contribue probablement à la diminution de la fluidité membranaire (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Turk *et al.*, 2004). En revanche, l'expression de gènes codant des enzymes de type élongases et désaturases impliquées dans la modification des acides gras est plus élevée à forte salinité chez *Hortaea werneckii* (Gostinčar *et al.*, 2009; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Musa *et al.*, 2018; Pérez-Llano *et al.*, 2020). Une augmentation de la longueur et de l'insaturation des acides gras des phospholipides a bien été observée chez *Hortaea werneckii*, l'acide palmitique diminue et l'acide linoléique augmente lorsque la salinité augmente, ces phénomènes contribuent à augmenter la fluidité membranaire (Turk *et al.*, 2004).

Chez *Zygosaccharomyces rouxii*, il a été rapporté que l'augmentation de la saturation des acides gras et l'augmentation de la quantité d'ergostérol sont responsables de la faible fluidité membranaire (Turk *et al.*, 2004). Un phénomène similaire est observé est *Saccharomyces cerevisiae*, la quantité de stérols augmente significativement en présence de sel et la quantité de phosphatidylethanolamine est deux fois plus élevée à 10% qu'à 0% de NaCl alors que ces quantités ne varient pas significativement chez *Hortaea werneckii* (Turk *et al.*, 2004). *Hortaea werneckii* est capable de maintenir un ratio stérols sur phospholipides plus faible que *Saccharomyces cerevisiae*, ce faible ratio pourrait également contribuer à l'augmentation significative de la fluidité membranaire chez *Hortaea werneckii* par rapport à *Saccharomyces cerevisiae* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Kogej *et al.*, 2007; Turk *et al.*, 2004).

Hortaea werneckii possède également une proportion de domaines fluides plus élevée que *Saccharomyces cerevisiae*. En conditions optimales de croissance, la fluidité de la membrane plasmique est plus élevée chez *Hortaea werneckii*. La membrane plasmique contient une grande

proportion de domaines fluides et les domaines fluides et intermédiaires sont faiblement ordonnés ce qui permet des mouvements moléculaires élevés (Turk *et al.*, 2007, 2004).

c. Régulation de l'homéostasie ionique

Les cellules utilisent de nombreux systèmes de transports membranaires pour réguler les flux ioniques. Il a été rapporté que certains microorganismes sont capables d'accumuler des fortes concentrations d'ions inorganiques (exemple : K^+) alors que d'autres ions toxiques sont éliminés des cellules (exemple : Na^+) (Gostinčar *et al.*, 2011; Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Gunde-cimerman and Zalar, 2014; Kanekar *et al.*, 2012; Skizewska *et al.*, 2022). *Hortaea werneckii* maintient des faibles concentrations intracellulaires de cations alcalins sodium (Na^+) et potassium (K^+) même à une forte concentration en sel (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018, 2009; Kogej *et al.*, 2007, 2005; Plemenitaš *et al.*, 2008). Cette espèce possède des mécanismes de transport efficaces impliqués dans la régulation des flux ioniques comme par exemple l'exclusion des ions Na^+ afin de maintenir une concentration sous le seuil de toxicité (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018; Kogej *et al.*, 2005). Le ratio K^+/Na^+ diminue chez *Hortaea werneckii* lorsque la salinité augmente car la quantité d'ions K^+ dans les cellules diminue alors que la quantité d'ions Na^+ augmente malgré l'existence de mécanismes permettant leur exclusion (Kogej *et al.*, 2005). Chez *Chrysosporium fastidium*, le ratio K^+/Na^+ augmente de façon linéaire quand l' a_w diminue car cette espèce est capable d'accumuler des ions K^+ et d'exclure des ions Na^+ (Luard, 1982a). Concernant *Wallemia ichthyophaga*, il semblerait que cette espèce possède très peu de transporteurs permettant l'exclusion des ions Na^+ , le maintien d'une faible concentration intracellulaire d'ions Na^+ serait liée à une paroi cellulaire très épaisse qui empêche l'entrée des ions à l'intérieur des cellules (Gunde-cimerman and Zalar, 2014).

En revanche, *Debaryomyces hansenii* est capable d'accumuler une forte concentration d'ions Na^+ sans toxicité (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009; Musa *et al.*, 2018). Chez cette espèce, plusieurs transporteurs de cations alcalins ont été identifiés. Par exemple, le symporteur glycérol/ Na^+ est un système de transport actif permettant une accumulation simultanée d'ions Na^+ et de glycérol au sein des cellules (Lucas *et al.*, 1990). Chez *Debaryomyces hansenii*, il semblerait que les ions Na^+ confèrent une protection aux cellules contre un stress additionnel comme par exemple un stress oxydatif externe (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018; Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

L'ensemble des éléments décrits ci-dessus ont été regroupés sous forme de schéma bilan (Figure 12).

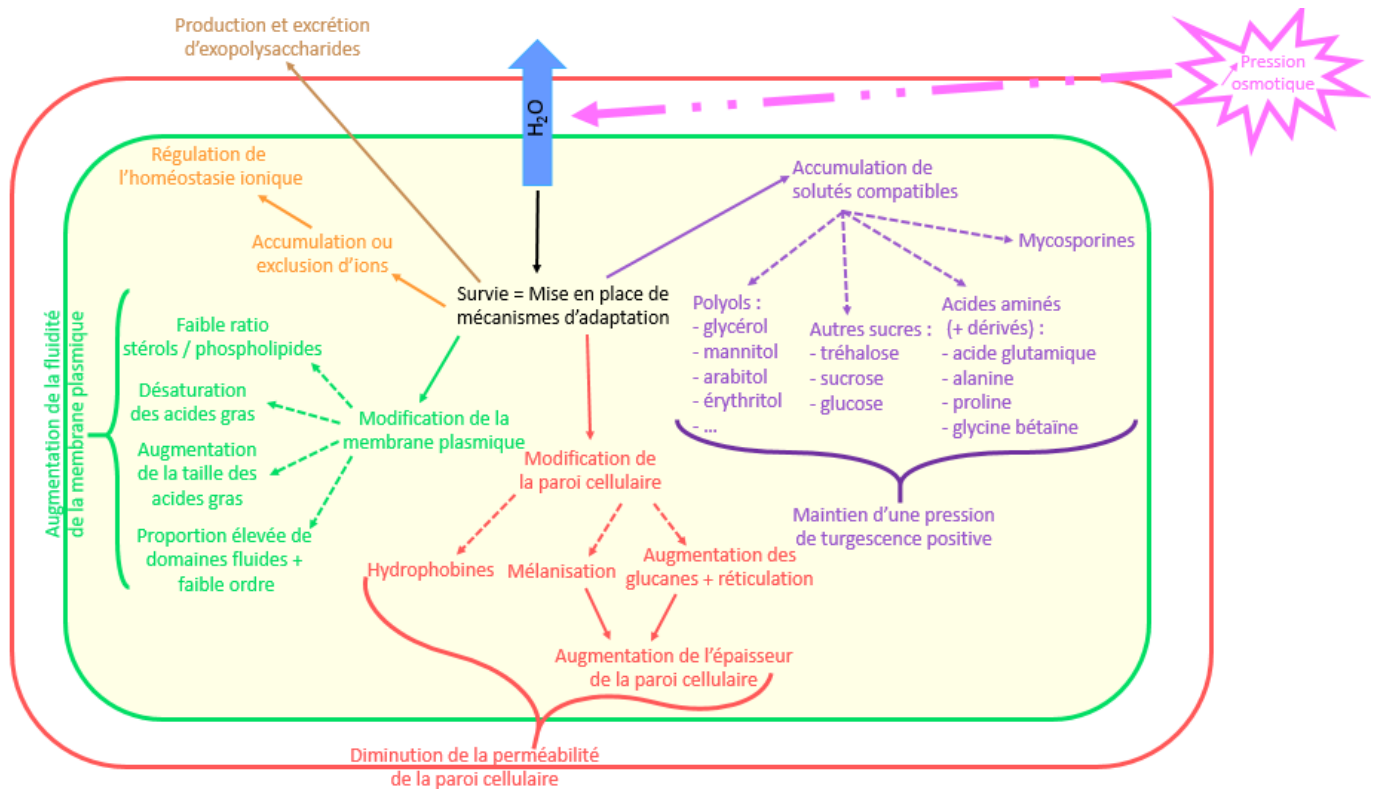


Figure 12. Schéma récapitulatif des principaux mécanismes cellulaires d'adaptation chez les champignons en cas de stress osmotique.

B. Stress oxydatif

En plus du stress osmotique, une forte concentration en sel induit un stress oxydatif. Un stress oxydatif se traduit par une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (appelées « *Reactive Oxygen Species* », ROS). Les trois ROS rencontrées majoritairement dans les cellules sont l'anion superoxyde (O_2^-) qui est lié à la réduction du dioxygène (O_2), cet anion est ensuite converti en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par l'enzyme superoxyde dismutase. L' H_2O_2 peut ensuite être totalement réduit en eau (H_2O) par des enzymes (appelées catalases ou glutathione peroxydases) ou partiellement réduit en radical hydroxyl ($HO\cdot$) par la réaction de Feton. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent endommager tous les groupes de biomolécules (exemples : lipides, protéines) (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018; Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Il a été rapporté que la synthèse d'adénosine-triphosphate (ATP) et la peroxydation des lipides diminuent en présence de soluté non ionique alors que la production d'énergie et les mécanismes impliqués dans la protection des cellules contre les dommages liés à l'oxydation augmentent en présence d'un soluté ionique chez *Hortaea werneckii* (Gunde-Cimerman *et al.*, 2018). La sensibilité des cellules à l' H_2O_2 augmente de façon marquée à 25% de NaCl, les mécanismes de défenses d'*Hortaea werneckii* contre les espèces réactives de l'oxygène sont probablement saturés dans cette condition de salinité (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018). Une étude réalisée sur *Aspergillus sydowii* a mis en évidence l'existence de plusieurs mécanismes de défense contre un stress oxydatif lié à une

augmentation de la salinité avec notamment la production de métabolites non enzymatiques et enzymatiques (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

a. Mécanismes non enzymatiques de défense contre l'oxydation

Il existe des mécanismes de défense non enzymatiques contre le phénomène d'oxydation. Le glutathion est généralement le composé antioxydant majoritaire présent au sein des cellules, la quantité de glutathion réduit diminue et la quantité de glutathion oxydé augmente en cas de stress oxydatif (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020). A forte salinité, les lipides d'*Aspergillus sydowii* sont endommagés car les quantités des produits liés de la peroxydation des lipides (un aldéhyde et un alcène) sont plus élevées à 5,13 M qu'à 1,0 M de NaCl (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Les protéines peuvent également être altérées à forte salinité car les acides aminés cystéine sont particulièrement sensibles à l' H_2O_2 qui peut provoquer des oxydations réversibles ou irréversibles. Toutefois, dans l'étude citée précédemment, les quantités des produits issus de l'oxydation des protéines sont similaires à 1,0 et 5,13 M de NaCl ce qui suggère que l'oxydation des protéines ne change pas de façon significative à forte salinité chez *Aspergillus sydowii* (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Il a également été mentionné que les polyols, les mélanines et les mycosporines pourraient constituer des mécanismes de défense non enzymatiques contre l'oxydation en captant les espèces réactives de l'oxygène (Kogej *et al.*, 2007; Oren and Gunde-Cimerman, 2007; Schmalzer-Ripcke *et al.*, 2009; Skizewska *et al.*, 2022; Toledo *et al.*, 2017; Wyatt *et al.*, 2013).

b. Mécanismes enzymatiques de défense contre l'oxydation

Il existe également des mécanismes de défense enzymatiques contre le phénomène d'oxydation. Chez de nombreux champignons, le nombre de gènes codant pour des enzymes antioxydantes est corrélé avec la salinité maximale tolérée (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018). Il a également été rapporté que l'expression de gènes impliqués dans la protection des cellules contre les dommages liés à l'oxydation augmente et que l'activité de plusieurs enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase augmente à forte salinité chez *Aspergillus sydowii* (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

Les enzymes antioxydantes agissent ensemble et constituent un mécanisme de défense enzymatique primaire contre l'oxydation en limitant les dommages causés par les molécules oxydantes et en contribuant au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire. Les gènes codant d'autres enzymes antioxydantes comme celles impliquées dans le système thioredoxine (exemples : peroxyredoxines, thioredoxines reductases) ou celles impliquées dans la conversion de l'homocystéine (molécule qui favorise la formation d'espèces réactives de l'oxygène) en autres molécules

(cystathionine puis cystéine) sont également régulés positivement à forte salinité (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020).

2. Dioxyde de carbone

De nombreux aliments (exemples : fromages, viandes, poissons, fruits, légumes) sont stockés dans des emballages sous atmosphères modifiées contenant une faible quantité de dioxygène (O₂), une forte quantité de dioxyde de carbone (CO₂) et du diazote (N₂). Par exemple, les emballages des fromages peuvent contenir entre 0 et 70% de CO₂ et entre 0 et 30 % de N₂. Pour les fruits et légumes, les emballages peuvent contenir entre 2 et 5% d'O₂, 3 et 8% de CO₂ et entre 87 et 95% de N₂. Cette méthode permet de limiter l'altération et ainsi augmenter la durée de vie des aliments (Khoshgozaran *et al.*, 2012; Kirtil *et al.*, 2016; Nguyen Van Long and Dantigny, 2016; Phillips, 1996).

Les études concernant l'impact du dioxyde de carbone (CO₂) sur les moisissures sont beaucoup moins nombreuses que celles concernant l'*a_w* car les conditions expérimentales sont plus contraignantes que pour d'autres facteurs abiotiques (exemples : température, pH, *a_w*) (Abellana *et al.*, 2000). Les contraintes expérimentales liées à l'étude des mélanges gazeux seront développées ultérieurement dans le chapitre 3 « Impact du dioxyde de carbone sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier ».

2.1. Impact du dioxyde de carbone sur le cycle de vie des moisissures

Seulement quelques travaux sur l'impact du CO₂ sur la germination des spores, la prolifération mycélienne, la sporulation et la production de mycotoxines sont disponibles. Comme pour l'*a_w*, l'effet du CO₂ sur chaque étape citée précédemment sera décrit dans les paragraphes suivants.

Concernant la germination des spores, une étude a montré que le temps nécessaire à la germination des spores augmente lorsque la pression partielle du CO₂ de l'atmosphère augmente (Nguyen Van Long *et al.*, 2017b). Dans cette même étude, la totalité des spores de *Mucor lanceolatus*, *Paecilomyces niveus*, *Penicillium expansum* sont capables de germer jusqu'à 70% de CO₂. En revanche, le nombre de spores capables de germer pour *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium roqueforti* n'atteint pas 100% à 70% de CO₂ après une semaine d'incubation.

La prolifération mycélienne est ralentie et le temps avant l'apparition d'un mycélium visible augmente lorsque le CO₂ augmente (Abellana *et al.*, 2000; Guynot *et al.*, 2003; Taniwaki *et al.*, 2010, 2009, 2001). Une diminution de la longueur des hyphes a été observée en présence de CO₂, ce phénomène pourrait être à l'origine du ralentissement de la prolifération mycélienne (Taniwaki *et al.*, 2010, 2009). Une perte de couleur du mycélium correspondant à une diminution de la pigmentation a également été observée en présence de CO₂ (Yang and Lucas, 1970). Le CO₂ ne permet pas toujours de

réduire ou d'inhiber totalement la prolifération mycélienne. Chez *Penicillium roqueforti*, *Epicoccum nigrum* et *Fusarium roseum*, il a été rapporté qu'un faible pourcentage de CO₂ (5 ou 10% de CO₂) stimule la prolifération mycélienne (Magan and Lacey, 1984b; Wells and Uota, 1969). D'autres études ont montré qu'une souche de *Byssoschlamys nivea* (Yates *et al.*, 1967), deux souches d'*Aspergillus flavus* (Mahbobinejad *et al.*, 2019) ainsi que plusieurs souches appartenant au genre *Mucor* (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962b) sont capables de se développer à 100% de CO₂.

L'impact du CO₂ sur la sporulation et la production de mycotoxines varie en fonction de la souche étudiée et des conditions expérimentales (notamment de la pression partielle en O₂) (Taniwaki *et al.*, 2010, 2009). Il a été rapporté que *Penicillium roqueforti*, *Fusarium oxysporum* et *Byssoschlamys fulva* sporulent de façon abondante lorsque l'atmosphère contient 80% de CO₂ et 20% d'O₂ alors qu'*Aspergillus flavus* n'a pas sporulé (Taniwaki *et al.*, 2010). Comme pour la prolifération mycélienne, le CO₂ ne permet pas toujours d'inhiber totalement la production de mycotoxines. Une atmosphère contenant 100% de CO₂ entraîne seulement une diminution de la production de mycotoxines chez deux souches d'*Aspergillus flavus* (Mahbobinejad *et al.*, 2019). D'autres études ont montré qu'une atmosphère contenant 20, 40 ou 80% de CO₂ (avec minimum 1% d'O₂) permet de réduire mais pas d'inhiber totalement la production de roquefortine C et d'acide cyclopiazonique produites respectivement par *Penicillium roqueforti* et *Penicillium commune* (Taniwaki *et al.*, 2010, 2001).

2.2. Impact du dioxyde de carbone sur la physiologie cellulaire des moisissures

La majorité des études disponibles et citées ci-dessous sont très anciennes et sont datées d'avant 1990. Les mécanismes impliquant le CO₂ dans la physiologie cellulaire des moisissures n'ont pas fait l'objet d'études récentes.

A. Métabolisme cellulaire

Le CO₂ est décrit comme étant une molécule signal, il diffuse de façon passive au travers des membranes cellulaires car il présente des caractéristiques apolaires (Bahn *et al.*, 2007; Cummins *et al.*, 2014). Il a également été rapporté que certains transporteurs membranaires comme les aquaporines ou les protéines Rhésus pourraient transporter le CO₂. Une fois dans le cytoplasme, le CO₂ peut subir une hydratation spontanée qui va entraîner la formation d'acide carbonique (H₂CO₃) (Couvert *et al.*, 2017; Daniels *et al.*, 1985; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Jones and Greenfield, 1982; Martin *et al.*, 2017; Yu and Chen, 2019). L'acide carbonique peut ensuite se dissocier et libérer des ions bicarbonates (HCO₃⁻) et des protons (H⁺). Des métalloenzymes appelées anhydrases carboniques peuvent aussi participer à l'hydratation du CO₂ et à la libération d'ions bicarbonates et de protons (Aguilera *et al.*, 2005; Amoroso *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2017; Mitchell, 2005; Supuran and Capasso, 2021; Tobal and Balieiro, 2013). Actuellement, seules les classes α et β ont été identifiées chez les moisissures (Bahn

and Mühlischlegel, 2006; Elleuche and Pöggeler, 2010). Ces enzymes ont un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire et un rôle dans la fixation du carbone (Amoroso *et al.*, 2005; Supuran and Capasso, 2021).

Le CO₂ et son dérivé l'ion bicarbonate sont impliqués dans le métabolisme cellulaire, notamment dans les réactions de carboxylation qui permettent de fixer du carbone (Aguilera *et al.*, 2005; Bahn *et al.*, 2007, 2005; Bahn and Mühlischlegel, 2006; Braun *et al.*, 2021; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Jones and Greenfield, 1982; Tobal and Balieiro, 2013). Plusieurs études réalisées avec du CO₂ contenant un isotope radioactif (¹³C ou ¹⁴C) ont mis en évidence la fixation et l'incorporation du carbone issu du CO₂. Chez *Penicillium isariiforme*, une augmentation du CO₂ dans l'atmosphère entraîne une augmentation de la quantité d'acide citrique dans le mycélium et le milieu de culture et le carbone marqué se retrouve au niveau de l'acide citrique (Graafmans, 1973). Concernant *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium digitatum*, après une exposition au ¹⁴CO₂, l'acide aspartique et l'acide glutamique contiennent du ¹⁴C (Gitterman and Knight, 1952; Noble *et al.*, 1958). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il semblerait que l'oxaloacétate (intermédiaire du cycle de l'acide citrique, également appelé cycle de Krebs ou cycle de l'acide tricarboxylique) soit le premier produit issu de la fixation du carbone sur le pyruvate par la pyruvate carboxylase (Divjak and Mor, 1973; Stoppani *et al.*, 1958, 1957; Tao *et al.*, 2017). Comme chez les *Penicillium* cités précédemment, l'acide aspartique et l'acide glutamique sont les premiers acides aminés marqués suite à la fixation du carbone chez *Saccharomyces cerevisiae* car l'oxaloacétate et l' α -ketoglutarate sont leurs précurseurs respectifs directement issus du cycle de l'acide citrique (Braun *et al.*, 2021; Schinner *et al.*, 1982; Wendell Davis *et al.*, 1956). Une autre étude réalisée chez *Saccharomyces cerevisiae* a montré que la présence de CO₂ entraîne une augmentation de la quantité totale de lipides et d'acides gras ainsi qu'une augmentation de l'insaturation des acides gras (Castelli *et al.*, 1969).

Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de CO₂ favorise des réactions associées au cycle de l'acide citrique suite à une incorporation du carbone, cette fixation permet la synthèse de métabolites intermédiaires afin de les remplacer de façon continue lorsqu'ils sont utilisés comme précurseurs pour la synthèse de biomolécules (réactions anaplérotiques) telles que les acides aminés, les acides nucléiques et les acides gras (Aguilera *et al.*, 2005; Bahn *et al.*, 2007, 2005; Bahn and Mühlischlegel, 2006; Bonardi *et al.*, 2019; Braun *et al.*, 2021; Castelli *et al.*, 1969; Elleuche and Pöggeler, 2010; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Gitterman and Knight, 1952; Graafmans, 1973; Jones and Greenfield, 1982; Mitchell, 2005; Schinner *et al.*, 1982; Stoppani *et al.*, 1958, 1957).

Il a été rapporté que l'ion bicarbonate joue un rôle central dans la régulation du métabolisme cellulaire (Bahn *et al.*, 2005; Bonardi *et al.*, 2019; Jones and Greenfield, 1982; Martin *et al.*, 2017). Plus

récemment, il a été suggéré que la fixation du carbone est liée à la présence d'ions bicarbonates qui sont utilisés comme substrats par l'enzyme appelée pyruvate carboxylase. L'oxaloacétate est formé suite à la fixation de l'ion bicarbonate sur le pyruvate par la pyruvate carboxylase. Concernant les autres réactions de carboxylation impliquant le CO₂ et les ions bicarbonates, les mécanismes restent inconnus à ce jour.

B. Dimorphisme

Le CO₂ peut également influencer la morphologie et la différenciation des cellules fongiques (Stretton and Goodman, 1998). Le CO₂ est impliqué dans le dimorphisme de *Mucor rouxii* en induisant un développement sous forme levurienne plutôt que sous forme filamenteuse. Lorsque *Mucor rouxii* est exposé à l'air ambiant (condition aérobie), au diazote (N₂ en condition d'anaérobie), une croissance filamenteuse est observée. Lorsque l'atmosphère (condition aérobie) contient au moins 90% de CO₂, une croissance levurienne est observée (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962b).

La paroi des cellules de *Mucor* est composée de chitine, chitosan, β-glucanes, mucoran et d'acide mucorique, cette composition peut varier en fonction de la morphologie (filamenteuse ou levurienne) des cellules (Homa *et al.*, 2022). Il a été suggéré que l'épaisseur, la structure et la composition de la paroi cellulaire est régulée par le cycle cellulaire et les variations des conditions environnementales. Comme décrit précédemment, le CO₂ est assimilé dans des métabolites cellulaires comme l'acide glutamique ou l'acide aspartique. Ces derniers sont ensuite incorporés dans des composés macromoléculaires tels que les protéines, ce phénomène pourrait jouer un rôle dans le développement sous forme levurienne. En effet, il a été rapporté que le complexe mannan protéines de la paroi cellulaire de certaines levures est riche en acide aspartique et que la paroi cellulaire de *Mucor rouxii* contient des quantités élevées de mannan et de protéines lorsqu'il se développe sous forme levurienne (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962a).

Une étude a été réalisée afin de comparer la paroi cellulaire de *Mucor rouxii* sous forme filamenteuse et sous forme levurienne (induite après incubation à 100% de CO₂). La paroi des cellules sous forme levurienne contient des quantités de protéines et de mannose plus importantes que la paroi des cellules sous forme filamenteuse (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962c). Comme évoqué ci-dessus, le mannose et les protéines sont les précurseurs du complexe mannan-protéines qui constituent la paroi cellulaire des levures. Cette étude a également montré que la paroi cellulaire est composée d'une seule couche sous la forme filamenteuse et deux couches distinctes sous la forme levurienne, la couche externe est fine et elle contient une structure fibrillaire tandis que la couche interne est épaisse mais ne contient pas de structure fibrillaire (Figure 13). La paroi des cellules sous forme filamenteuse représente entre 5 et 10% du volume cellulaire alors que la paroi des cellules sous

forme levurienne est moins compacte et elle représente entre 30 et 40% du volume cellulaire (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962c).

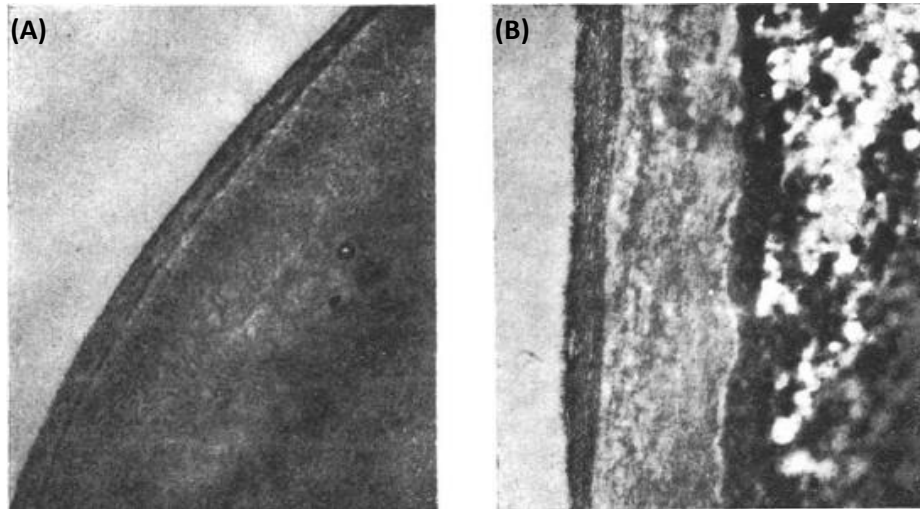


Figure 13. Micrographes de la paroi cellulaire de (A) *Mucor rouxii* sous forme filamenteuse (grossissement x32000) et (B) sous forme levurienne (grossissement x30600) (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962c).

Récemment, il a été suggéré que la protéine kinase A dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et la calcineurine étaient impliquées dans la régulation du dimorphisme. La molécule cAMP semble être impliquée dans le développement sous la forme levurienne. Les ions bicarbonates entraînent une modification de la transcription de certains gènes codant pour des enzymes chez *Mucor circinelloides* en présence de CO₂, ce phénomène va entraîner une augmentation de la quantité de cAMP. Le cAMP va ensuite activer la protéine kinase A cAMP dépendante qui inhibe la croissance sous forme filamenteuse (Homa *et al.*, 2022).

C. Facteurs de virulence chez les levures

Chez les levures *Cryptococcus neoformans* et *Candida albicans*, un changement de morphologie et de virulence a été observé en présence de CO₂ (5% de CO₂). Chez *Candida albicans*, une accumulation intracellulaire de CO₂ induit la formation de tubes germinatifs et une croissance mycélienne avec la production de filaments et d'hyphes plutôt qu'une croissance levurienne avec des cellules bourgeonnantes (Sims, 1986). La forme filamenteuse est associée à la virulence car elle favorise l'adhésion et la sécrétion d'hydrolases (Mitchell, 2005). Concernant *Cryptococcus neoformans*, la synthèse d'une capsule composée de polysaccharides est stimulée par une exposition au CO₂. Lorsque les cellules sont encapsulées, elles sont plus résistantes à la phagocytose (Granger *et al.*, 1985).

En présence de CO₂, l'activité des β -anhydrases carboniques va entraîner une augmentation des ions bicarbonates qui vont directement stimuler l'adénylyl-cyclase qui va produire la molécule

cAMP par cyclisation de l'ATP (Bahn *et al.*, 2005; Elleuche and Pöggeler, 2010). Le second messenger cAMP va ensuite activer des cibles en aval (Bahn *et al.*, 2007; Bahn and Mühlischlegel, 2006). Par conséquent, les ions bicarbonates régulent directement l'activité de l'adénynyl-cyclase qui a un rôle essentiel dans la virulence des espèces citées ci-dessus (Bahn and Mühlischlegel, 2006; Hall *et al.*, 2010; Klengel *et al.*, 2005).

D. Mécanismes d'action du CO₂

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les effets inhibiteurs du CO₂. Le CO₂ peut altérer les propriétés des membranes biologiques. Lors de sa diffusion passive au travers de la membrane, le CO₂ peut interférer avec les lipides ou être accumulé au niveau de la bicouche lipidique ce qui entraîne un désordre membranaire et une altération des fonctions des protéines membranaires (Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Stretton and Goodman, 1998). En cas de perte d'intégrité de la membrane cellulaire, l'absorption et le transport de certaines molécules (exemples : ions, substrats, acides aminés), la perméabilité et la fluidité membranaire sont perturbés (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Yu and Chen, 2019). Une réaction du CO₂ avec des groupes amines (RNH₃⁺) présents dans les protéines membranaires pourrait changer la charge positive en charge négative (RNHCOO⁻), la charge de surface est donc modifiée ce qui peut favoriser le transport d'ions positifs et inhiber celui d'ions négatifs au travers de la membrane plasmique (Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007).

Le CO₂ semble également influencer la synthèse, la structure et la solubilité des enzymes, ces modifications impactent l'activité enzymatique (Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Stretton and Goodman, 1998; Yu and Chen, 2019). Déjà évoqué précédemment, le CO₂ dissous peut s'hydrater pour former l'acide carbonique (H₂CO₃) qui peut ensuite se dissocier et libérer des ions bicarbonates (HCO₃⁻) et des protons (H⁺). Les protons vont entraîner une acidification du pH intracellulaire, cette diminution du pH stimule ou inhibe des réactions enzymatiques (exemples : carboxylation, décarboxylation), ce phénomène va impacter le métabolisme cellulaire.

D'autres processus cellulaires semblent être impactés par le CO₂. Il a été montré que le CO₂ peut pénétrer plus rapidement dans les cellules que l'O₂ (Daniels *et al.*, 1985; Hocking, 1990; Yu & Chen, 2019). Le CO₂ pourrait remplacer partiellement ou totalement l'O₂ disponible pour le métabolisme microbien et ainsi provoquer une diminution de la respiration qui pourrait aller jusqu'à l'asphyxie comme cela a été supposé chez les bactéries (Teira *et al.*, 2012; Yu and Chen, 2019). Il est également possible qu'une augmentation du CO₂ inhibe les réactions qui produisent du CO₂ (exemples : respiration, décarboxylation) pour éviter d'atteindre un déséquilibre chimique lié à une quantité trop élevée de CO₂ (Daniels *et al.*, 1985; Jones & Greenfield, 1982). Il a également été suggéré

que le CO₂ pourrait inhiber la division cellulaire mais le mécanisme cellulaire n'a pas encore été décrit (Dixon and Kell, 1989; Stretton and Goodman, 1998).

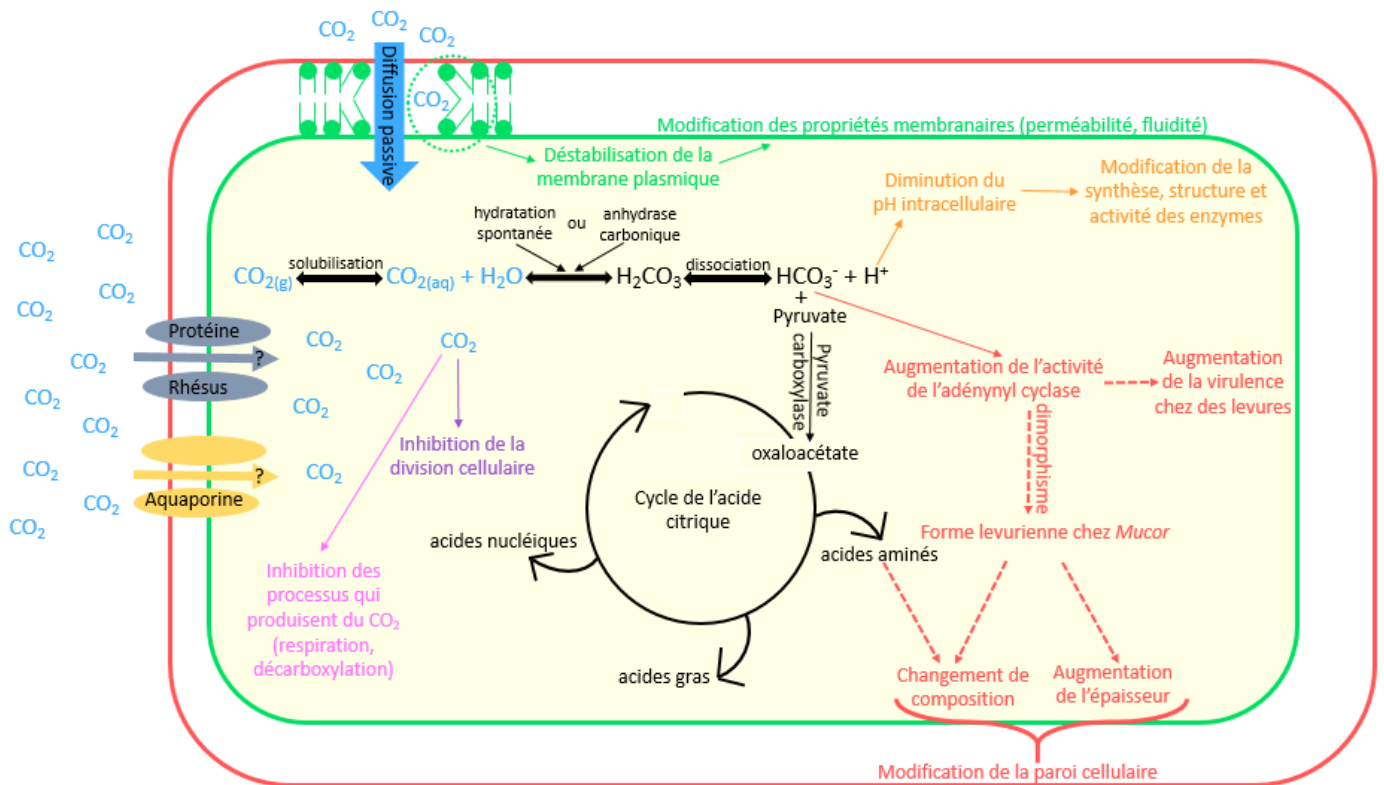


Figure 14. Schéma récapitulatif des principaux processus cellulaires impactés par le CO₂ chez les champignons. Légende : CO_{2(g)} : CO₂ gazeux, CO_{2(aq)} : CO₂ aqueux.

IV. Mycologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle est une discipline scientifique au croisement de la microbiologie et des mathématiques qui consiste à modéliser la dynamique des populations microbiennes au sein d'écosystèmes alimentaires (Fakruddin *et al.*, 2011; Membré and Lambert, 2008). Cet outil permet de prévoir la croissance, la survie ou l'inactivation de microorganismes en développant conjointement des bases de données, des équations mathématiques et des logiciels. Elle se décompose en trois niveaux : la modélisation primaire, la modélisation secondaire et la modélisation tertiaire. Cet outil de gestion de la qualité et de la sécurité des aliments est utilisé par de nombreuses industries agroalimentaires car ce dernier est recommandé par les autorités de régulation pour valider et justifier les durées de vie microbiologique des aliments.

La microbiologie prévisionnelle permet d'étudier l'impact des facteurs intrinsèques (exemples : pH, a_w , acides organiques, sels, conservateurs) ou extrinsèques (exemples : température, composition gazeuse) d'une matrice alimentaire mais également l'impact d'un procédé de fabrication ou de stockage sur le comportement de microorganismes d'intérêt, d'altération ou pathogène en

limitant le recours aux techniques culturales traditionnellement utilisées en microbiologie grâce aux tests *in silico* (Fakruddin *et al.*, 2011; Membré and Lambert, 2008). Elle peut également être utilisée en soutien à l'HACCP pour analyser les dangers, identifier des points critiques et mettre en place des actions correctives. Elle est aussi utilisée en appréciation quantitative des risques où elle permet d'estimer l'évolution du nombre de microorganismes au cours d'une production ou d'un stockage, l'impact d'une modification de formulation ou de procédé de fabrication sur la sécurité, le risque d'altération et la durée de vie d'un aliment ou encore l'exposition du consommateur à un microorganisme pathogène voire à une toxine d'origine microbienne.

La majorité des études de microbiologie prévisionnelle ont été réalisées sur les bactéries pathogènes et d'altération. Aujourd'hui, il y a un manque d'informations sur le développement des moisissures malgré leur importance dans l'agroalimentaire. Le terme de mycologie prévisionnelle est apparu ces dernières années avec l'application des outils de microbiologie prévisionnelle aux moisissures (Dantigny *et al.*, 2003). Il s'agit de modéliser leurs réponses physiologiques en utilisant des paramètres mesurables aux différents processus biologiques comme par exemple les étapes conduisant à l'apparition d'un mycélium visible : la germination des spores, l'élongation des hyphes et la prolifération mycélienne (Figure 15).

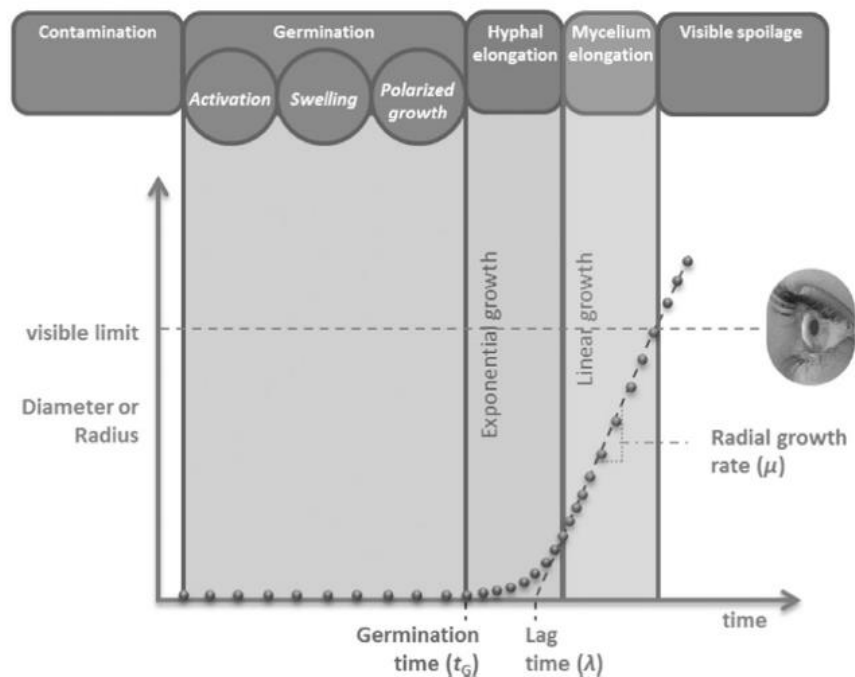


Figure 15. Représentation schématique des processus biologiques impliqués dans le développement des moisissures associés aux paramètres de cinétiques (Dagnas *et al.*, 2015).

La modélisation de la physiologie des moisissures est réalisée en deux étapes, dites modélisation primaire et modélisation secondaire. La modélisation primaire consiste à décrire une réponse biologique (exemples : pourcentage de spores germées, rayon ou diamètre du mycélium) en fonction du temps dans des conditions environnementales données (exemples : température, pH, a_w , acides organiques, composition gazeuse) (Dantigny and Panagou, 2013). De manière générale, elle peut s'écrire sous la forme (Equation 1) :

$$x(t_i) = f(t_i, \beta) + \varepsilon_i \quad (1)$$

Équation 1. Équation générale de la modélisation primaire où $x(t_i)$ est la réponse biologique mesurée à l'instant t , f est la fonction de régression, β est le vecteur des j paramètres primaires, estimés dans des conditions données et ε_i est l'erreur résiduelle associée à la réponse biologique observée.

La modélisation secondaire consiste à décrire l'impact des facteurs environnementaux sur le ou les paramètres étudiés (Dantigny *et al.*, 2003). Autrement dit, la modélisation décrit la relation entre la réponse biologique mesurée et le facteur environnemental étudié (Dantigny and Panagou, 2013). De manière générale, elle peut s'écrire sous la forme (Equation 2) :

$$\beta_j = g(\sigma_{ii}, \delta_k) + \varepsilon_{ii} \quad (2)$$

Équation 2. Équation générale de la modélisation secondaire où β_j est la valeur d'un paramètre primaire pour la condition étudiée, g est la fonction de régression, σ_{ii} est le vecteur des paramètres environnementaux pour la condition étudiée, δ_k est le vecteur de paramètres secondaires apparaissant dans la fonction de régression et ε_{ii} est l'erreur résiduelle associée aux β_{ii} observés.

L'utilisation de modèles empiriques, comme les modèles polynomiaux, permet de décrire l'effet des conditions dans lesquelles les expériences ont été réalisées sur le développement des moisissures (Dantigny *et al.*, 2003; Dantigny and Panagou, 2013). Dans les modèles empiriques, les interactions entre les facteurs sont pris en compte et présentent généralement une bonne qualité d'ajustement mais il est difficile d'extrapoler les résultats et de trouver une signification biologique aux paramètres estimés.

L'utilisation de modèles plus mécanistes permettent de décrire l'effet des conditions dans lesquelles les expériences ont été réalisées sur le développement des moisissures et d'y associer des phénomènes connus à l'effet observé (exemples : mécanismes biologiques, chimiques, physiques) par le biais d'hypothèses et de théories, les paramètres estimés sont donc interprétables avec une signification biologique (Dantigny, 2021; Delhalle *et al.*, 2012).

L'approche progressive est couramment utilisée avec notamment l'application du gamma-concept (γ -concept) et des modèles cardinaux pour estimer des valeurs de germination ou de croissance (Dantigny, 2021). Le γ -concept a été développé de façon à pouvoir décrire l'effet combiné de plusieurs facteurs environnementaux sur le taux de croissance des microorganismes (Dantigny, 2021; Dantigny and Panagou, 2013; Delhalle *et al.*, 2012). En effet, si le poids des interactions entre les facteurs environnementaux est important, il peut être pris en compte comme un facteur environnemental à part entière.

Le γ -concept repose sur deux principes. Le premier principe est que le taux de croissance (μ) est fonction du potentiel de croissance de la souche, exprimé par le taux de croissance maximal obtenu en conditions optimales, et par l'effet de chaque facteur environnemental, représentée par la fraction γ_{X_i} (Equation 3) :

$$\mu(X_{ij}) = \mu_{opt} \cdot \prod_i \gamma_{X_i}(X_{ij}) \quad \text{avec } 0 \leq \gamma_{X_i}(X_{ij}) \leq 1 \quad (3)$$

Équation 3. Premier principe du γ -concept. Si γ est égal à 0 alors l'inhibition est totale et si γ est égal à 1 l'inhibition est nulle. En absence d'inhibition, le taux de croissance est optimal (μ_{opt}).

Le second principe est que l'effet de chaque facteur environnemental agit de façon multiplicative et indépendante sur le taux de croissance. S'il existe des interactions synergiques ou antagonistes entre les facteurs, elles sont prises en compte par un nouveau terme (ξ) qui a les mêmes propriétés que les γ . L'effet de chaque facteur est donc représenté par un terme discret, l'ensemble des termes représentant les facteurs sont ensuite multipliés entre eux (Equation 4) :

$$\mu(X_{ij}) = \mu_{opt} \cdot \gamma(T_i) \cdot \gamma(pH_i) \cdot \gamma(aw_i) \cdot \xi(T_i, pH_i, aw_i) \quad (4)$$

Équation 4. Second principe du γ -concept.

Lorsque le γ -concept est utilisé, l'influence des facteurs environnementaux est considérée comme indépendante de la nature du produit (exemples : produit laitier, viennoiserie) (Dantigny and Panagou, 2013). Le paramètre μ_{opt} caractérise alors la croissance maximale ou optimale du couple microorganisme / aliment étudié. Ce concept permet d'extrapoler l'application des modèles en matrice alimentaire, à partir d'une cinétique de croissance, pour peu que l'utilisateur connaisse les paramètres secondaires caractérisant la physiologie de la souche vis-à-vis des facteurs environnementaux, comme les paramètres T_{min} , T_{opt} , T_{max} pour la température (Pinon *et al.*, 2004). L'utilisation du γ -concept et des modèles cardinaux peut permettre d'évaluer l'impact d'un ou plusieurs facteurs sur la réponse biologique d'une moisissure dans d'autres conditions que celles

testées par interpolation ou extrapolation (Dantigny *et al.*, 2003). Les modèles cardinaux permettent de déterminer au minimum trois valeurs caractérisant le domaine de croissance d'un microorganisme en fonction du facteur étudié : la valeur minimale en deçà de laquelle il n'y a pas de développement (X_{min}), la valeur maximale au delà de laquelle il n'y a aucun développement (X_{max}), et la valeur pour laquelle le développement est optimal (X_{opt} ; le taux de croissance est maximal).

A ce jour, des modèles cardinaux ont été utilisés pour modéliser l'impact de la température, du pH, des acides organiques, de l' a_w , de l' O_2 et du CO_2 sur la germination des spores et / ou la croissance radiale de plusieurs moisissures (Kalai *et al.*, 2017; Morin-Sardin *et al.*, 2016; Nguyen Van Long *et al.*, 2021, 2017a, 2017b).

La modélisation tertiaire permet de mettre à disposition des utilisateurs des prévisions en utilisant les modèles primaires et secondaires préalablement ajustés. De nombreux logiciels sont disponibles. Ils peuvent être associés à des bases de données permettant à l'utilisateur de disposer de simulations et de données de la littérature pour répondre à sa problématique. Parmi les logiciels disponibles, nous pouvons citer : i) Sym'Previews développé par un consortium alliant industriels, centres techniques et instituts académiques et ii) *Dairy Products Safety Predictor* développé par ACTALIA et le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (Tenenhaus-Aziza and Ellouze, 2015). Ces outils informatiques permettent l'application de plusieurs types de modèles sur une diversité de produits alimentaires (exemples : produits laitiers, viandes), facteurs environnementaux (exemples : température, pH, a_w , acides organiques, gaz) et microorganismes (levures, moisissures, bactéries). Ces outils informatiques sont principalement destinés aux industries agroalimentaires mais aussi aux gouvernements, aux chercheurs, aux enseignants et aux étudiants, l'utilisation de ces logiciels peut être gratuite comme payante (Tenenhaus-Aziza and Ellouze, 2015).

1. Modélisation de la germination des spores

1.1. Modélisation primaire

La germination des spores est une étape clé dans le développement des moisissures car elle précède l'apparition d'un mycélium visible (Dantigny *et al.*, 2006, 2003). Dans le cas où l'espèce est considérée comme une flore d'intérêt technologique, la maîtrise de cette étape pourrait permettre d'améliorer son développement et ainsi favoriser un recouvrement rapide de la surface des fromages. Au contraire, lorsque l'espèce est considérée comme une flore d'altération, la maîtrise de cette étape pourrait permettre d'inhiber son développement et ainsi empêcher l'altération des produits laitiers.

Cette étape est moins étudiée que la prolifération mycélienne car elle nécessite des observations microscopiques fastidieuses pour évaluer la longueur du tube germinatif, de nouvelles méthodes basées sur l'analyse d'images ont été développées afin de faciliter l'acquisition des données

(Dantigny *et al.*, 2006). Il est possible de suivre la germination des spores en milieu liquide en faisant des prélèvements du milieu de culture à différents temps et en comptant le nombre de spores germées à chaque prélèvement grâce à des observations microscopiques (Gillot *et al.*, 2016). Il est également possible de suivre la germination des spores adhérentes à la surface d'un milieu gélosé (Dantigny *et al.*, 2006; Dantigny and Panagou, 2013; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Contrairement au milieu liquide, il est possible de suivre la germination de la même population de spores, voire du même individu tout au long de l'expérience.

Dans le cas de la germination des spores, la modélisation primaire consiste à représenter la proportion de spores germées (P en %) en fonction du temps (t généralement en heures). Plusieurs modèles primaires peuvent être utilisés. La distribution de la germination des spores peut suivre une loi normale. La courbe de germination est alors symétrique. Dans ce cas, d'autres modèles que la distribution cumulative gaussienne peuvent être utilisés pour ajuster les données, comme le modèle logistique. Par le passé, ce modèle a été très utilisé. Toutefois, la distribution de la germination des spores peut ne pas suivre une loi normale, entraînant une asymétrie de la courbe de germination. Cette observation arrive souvent en conditions suboptimales (exemple : a_w proche de l' a_w minimale nécessaire à la germination des spores). Un modèle asymétrique de type Gompertz peut alors être utilisé pour ajuster les données (Dantigny *et al.*, 2007). Ce modèle est asymétrique au niveau du point d'inflexion. Comme la forme des courbes peut dépendre des conditions environnementales, un nouveau modèle capable de décrire une courbe symétrique ou asymétrique a été proposé (Dantigny, 2021; Dantigny *et al.*, 2011). Il permet l'utilisation d'un seul modèle primaire sur un jeu de données qui comporterait différentes formes de courbe (Equation 5) :

$$P_{(t)} = P_{max} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^d} \right) + \varepsilon_i \quad (5)$$

Équation 5. Modèle primaire permettant de décrire la germination des spores (Dantigny *et al.*, 2011) de moisissures où $P_{(t)}$ est la proportion de spores germées (en %) au temps d'incubation t (en heures), P_{max} (en %) correspond à P quand t tend vers l'infini, soit la proportion maximale de spores germées, τ est le temps médian de germination ($P = P_{max}/2$, en heures), d est un paramètre de forme qui reflète la dispersion de la germination et ε_i est l'erreur résiduelle.

Ce modèle permet de décrire la forme asymétrique des courbes en conditions suboptimales (Figure 16 à 0,88 a_w). En conditions optimales, le paramètre de forme (d) augmente et la courbe se rapproche d'une forme symétrique. Ce modèle permet également de décrire correctement la forme des courbes en conditions optimales (Figure 16 à 0,98 et 0,96 a_w).

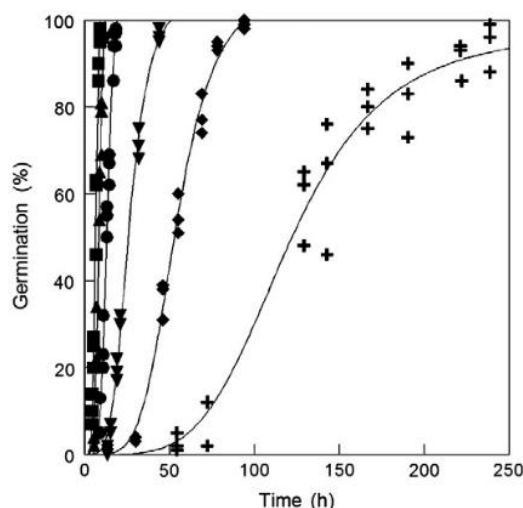


Figure 16. Cinétiques de germination des spores de *Fusarium verticillioides* avec le nouveau modèle permettant de décrire une forme symétrique ou asymétrique des courbes, germination des spores à 0,98 a_w (■), 0,96 a_w (▲), 0,94 a_w (●), 0,92 a_w (▼), 0,90 a_w (◆) et 0,88 a_w (+) (Dantigny *et al.*, 2011).

Deux paramètres sont plus particulièrement étudiés grâce à la modélisation primaire : P_{max} et τ . Le premier paramètre est P_{max} (en %), il correspond au pourcentage maximal de spores germées (spores viables) (Dantigny, 2021). Généralement, toutes les spores sont viables et capables de former un tube germinatif en condition optimales ($P_{max} = 100\%$). En revanche, certaines spores ne sont pas capables de produire un tube germinatif en conditions suboptimales (exemple : a_w proche de l' a_w minimale nécessaire à la germination des spores). Les spores non germées sont considérées comme non viables ($P_{max} < 100\%$) (Dantigny *et al.*, 2011).

Le second paramètre est τ (généralement exprimé en heures), il correspond au temps de germination pour lequel une certaine proportion de spores viables est germée. Auparavant, le temps de germination a été défini comme le temps auquel 10% des spores étaient germées pour les espèces d'altération et comme le temps auquel 90% des spores étaient germées pour les espèces d'intérêt technologique (Dantigny *et al.*, 2006). Il est certain que le quantile d'intérêt est fonction de la nature de la souche étudiée. Bien que n'importe quel quantile puisse être utilisé, s'il s'agit d'une souche d'intérêt technologique, on aura tendance à étudier les quantiles les plus élevés pour connaître le temps auquel le fromage commencera à être recouvert. S'il s'agit d'une souche d'altération, on s'intéressera aux quantiles les plus faibles pour connaître le temps correspondant à une apparition potentielle de la moisissure. Afin d'harmoniser la définition du temps de germination, il a été proposé plus récemment que le temps de germination soit fixé au temps pour lequel 50% des spores viables sont germées (appelé le temps médian de germination des spores) (Dantigny *et al.*, 2006).

Il existe plusieurs définitions pour décrire une spore germée. Certains chercheurs considèrent qu'une spore est germée lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au rayon de la spore gonflée et d'autres considèrent que la spore est germée lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au double du diamètre de la spore gonflée. La définition de la spore utilisée pour réaliser l'acquisition des données peut avoir un impact sur les cinétiques de germination. Sur la Figure 17, on constate qu'il y a décalage des courbes vers la droite quand on considère qu'une spore est germée lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au double du diamètre de la spore gonflée (Dantigny *et al.*, 2003). Afin d'harmoniser la définition d'une spore germée, une définition a été proposée : une spore est considérée comme germée lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au diamètre de la spore gonflée (Dantigny *et al.*, 2006).

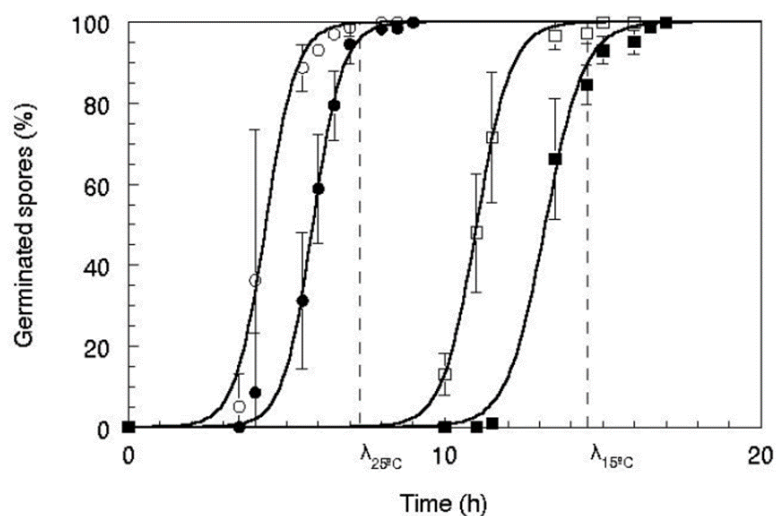


Figure 17. Modélisations primaires de germination de *Mucor racemosus* sur milieu Potato Dextrose Agar à 25°C (●, ○) et 15°C (■, □). Les spores sont considérées germées lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au rayon de la spore gonflée (symboles blancs) et lorsque la longueur du tube germinatif est supérieure ou égale au double du diamètre de la spore gonflée (symboles noirs). Les barres d'erreur représentent l'écart-type (Dantigny *et al.*, 2003).

1.2. Modélisation secondaire

Il existe peu d'études sur la modélisation secondaire de la germination des spores (Dagnas and Membré, 2013). Généralement, l'inverse du temps de germination est modélisé en fonction du facteur étudié (Gougouli and Koutsoumanis, 2013; Kalai *et al.*, 2017; Nguyen Van Long *et al.*, 2017b, 2017a). Toutefois, il est également possible de modéliser le pourcentage de spores germées en fonction du facteur étudié lorsque ce pourcentage diminue en conditions suboptimales (exemples : diminution de l' a_w ou de l' O_2).

Le concept γ associé au modèle de Rosso sont fréquemment utilisés pour décrire l'impact des facteurs environnementaux sur la croissance des microorganismes. Dans un premier temps, ce modèle était utilisé pour décrire l'impact de la température sur la croissance bactérienne (Rosso *et al.*, 1995, 1993). Ce modèle a ensuite été adapté afin de décrire l'impact des facteurs environnementaux (principalement la température et l' a_w) (Figure 18 A) sur la germination des spores de moisissures (Gougouli and Koutsoumanis, 2013; Kalai *et al.*, 2017; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a; Rosso and Robinson, 2001; Sautour *et al.*, 2001) (Equation 6) :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{opt}} \cdot CMR_n(a_w) + \varepsilon_{ii} \quad (6)$$

$$CMR_n(a_w) = \begin{cases} \frac{(a_w - a_{wmin})^0 \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{wmin})^{n-1} \cdot \{(a_w - a_{wmin}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot [(n-1) \cdot a_{wopt} + a_{wmin} - n \cdot a_w]\}} & \begin{matrix} a_w \leq a_{wmin} \\ a_{wmin} < a_w < a_{wmax} \\ a_w > a_{wmax} \end{matrix} \end{cases}$$

Équation 6. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la germination des spores (Rosso and Robinson, 2001) de moisissures où a_{wmin} , a_{wopt} et a_{wmax} correspondent respectivement aux valeurs cardinales d' a_w de germination minimale, optimale et maximale. Généralement, le paramètre a_{wmax} est fixé à 1,000. Le temps de germination (τ) est estimé avec la modélisation primaire, τ_{opt} correspond à la valeur de τ quand l' a_w est optimale, n est le paramètre de forme et ε_{ii} est à l'erreur résiduelle. On représente l'inverse du temps de germination ($1/\tau$) afin de stabiliser la variance résiduelle.

D'autres modèles peuvent être utilisés pour décrire l'impact de composés antifongiques sur la germination des spores (Dantigny and Panagou, 2013). Par exemple, un modèle basé sur une équation de type Monod peut être utilisé pour modéliser l'impact des acides organiques sur la germination des spores (Figure 18 B) (Kalai *et al.*, 2017) (Equation 7) :

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_{opt}} \cdot \left(\frac{K \cdot (MIC - Ac)}{K \cdot MIC - 2K \cdot Ac + Ac \cdot MIC} \right) + \varepsilon_{ii} \quad (7)$$

Équation 7. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de composés antifongiques sur la germination des spores (Kalai *et al.*, 2017) de moisissures où le temps de germination (τ) est estimé avec la modélisation primaire, K (en mol/L) est la concentration en acide carbonique pour laquelle τ_{opt} est doublé, MIC (en mol/L) est la concentration minimale inhibitrice ($1/\tau = 0 \text{ h}^{-1}$, pas de germination) et ε_{ii} correspond à l'erreur résiduelle. On utilise l'inverse du temps de germination ($1/\tau$) afin de stabiliser la variance résiduelle.

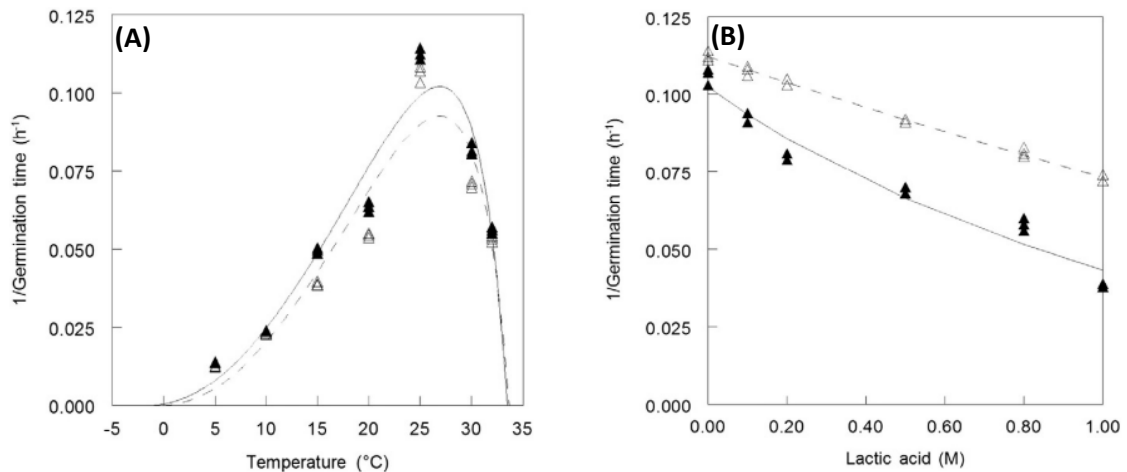


Figure 18. Influence de la température (A) et de l'acide lactique (B) sur l'inverse du temps de germination pour *P. camemberti* (▲) et *P. roqueforti* (△) sur milieu Potato Dextrose Agar à pH 5,6 et 25°C. Les données pour la température sont ajustées avec le modèle de Rosso et les données pour l'acide lactique sont ajustées avec le modèle basé sur une équation de type Monod (Kalai *et al.*, 2017).

Afin d'étudier de manière plus approfondie la germination des spores, il est nécessaire d'améliorer les outils de mycologie prévisionnelle (méthodes utilisées pour l'acquisition des données, modèles utilisés pour ajuster les données). Une méthode basée sur l'analyse d'images pourrait remplacer les observations microscopiques et le développement d'une méthode automatisée pourrait permettre d'acquérir un plus grand nombre de données rapidement. Les modèles utilisés jusqu'à présent ne sont pas toujours adaptés pour décrire la réponse observée comme par exemple dans une étude réalisée précédemment sur la germination des spores de plusieurs espèces fongiques (Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Ces résultats montrent la nécessité d'améliorer les modèles existants ou de développer de nouveaux modèles pour décrire de façon satisfaisante l'impact des facteurs environnementaux sur la germination des spores.

2. Modélisation de la prolifération mycélienne

2.1. Modélisation primaire

De nombreuses études ont été réalisées sur la prolifération mycélienne car les expériences sont moins contraignantes que le suivi de la germination des spores. Plusieurs méthodes d'inoculation sur milieu solide ont été développées pour suivre la prolifération mycélienne : dépôt d'une suspension de spores standardisée en point central, sous forme de spray ou avec du talc (Dantigny and Panagou, 2013). La méthode en point central est la méthode la plus couramment utilisée en modélisation, elle consiste à déposer une goutte de la solution de spores sur le milieu solide. Après inoculation, la moisissure forme généralement un mycélium visible de forme circulaire.

Différentes méthodes de mesures ont été développées pour quantifier la prolifération mycélienne. Les méthodes directes telles que la mesure de la longueur des hyphes ou le diamètre (ou rayon) du mycélium grâce à une analyse d'images ou un double décimètre sont les méthodes les plus simples et les plus fréquemment utilisées (Dantigny and Panagou, 2013; Taniwaki *et al.*, 2006). Des méthodes indirectes ont également été développées, ces dernières nécessitent généralement la destruction du mycélium sur son substrat notamment pour mesurer la matière sèche de la biomasse (indication sur la densité du mycélium), la quantité d'ergostérol (lipide membranaire spécifique des moisissures) ou de chitine (constituant de la paroi cellulaire). Ces méthodes alternatives peuvent être utilisées en milieu liquide ou en milieu solide (exemple : aliment) lorsque des mesures du diamètre du mycélium ne peuvent pas être effectuées. Il a également été rapporté que la production de chaleur par le mycélium (mesure calorimétrique) peut également être mesurée, cette méthode est non destructive mais plus onéreuse que celles citées précédemment (Dantigny and Panagou, 2013).

La méthode en point central est la plus utilisée car elle est la plus reproductible mais elle ne prend pas en compte la densité du mycélium. Toutefois, des études ont montré qu'il existait une corrélation entre la matière sèche de la biomasse fongique ou la quantité d'ergostérol accumulée et le diamètre du mycélium. Par conséquent, la mesure du diamètre du mycélium est un bon indicateur de la prolifération mycélienne.

La modélisation primaire consiste à représenter le rayon (ou le diamètre) de la moisissure en fonction du temps. Dans un premier temps, une phase de latence est observée, elle correspond à la période durant laquelle la croissance mycélienne n'est pas visible à l'œil nu (taille mesurée = taille du dépôt de la goutte). Généralement, on considère qu'un mycélium est visible lorsque sa taille est de 3 mm (Dantigny, 2021; Dantigny and Panagou, 2013). Cette phase de latence dépend de la taille de l'inoculum et des conditions environnementales. Dans un second temps, une croissance linéaire du mycélium est observée. Les données sont le plus fréquemment ajustées avec le modèle linéaire afin d'estimer la phase de latence et le taux de croissance (Equation 8) :

$$r(t) = \begin{cases} r_{(0)} + \varepsilon_i, & t \leq \lambda \\ r_{(0)} + \mu \cdot (t - \lambda) + \varepsilon_i, & t > \lambda \end{cases} \quad (8)$$

Équation 8. Modèle primaire permettant de décrire la croissance radiale (Dantigny and Panagou, 2013) où $r(t)$ est le rayon du mycélium (en mm) au temps d'incubation t (en jours), $r_{(0)}$ est le rayon initial (taille du dépôt, en mm), λ est la phase de latence (en jours), μ est le taux de croissance (en mm/jour) et ε_i est l'erreur résiduelle.

Ce modèle est le plus simple à utiliser, il décrit de façon satisfaisante la croissance linéaire des moisissures par régression linéaire (Dantigny and Panagou, 2013). D'autres modèles comme le modèle de Baranyi ou le modèle de Gompertz modifié peuvent également être utilisés dans certains cas (Dantigny, 2021; Dantigny and Panagou, 2013).

Grâce à la modélisation primaire, deux paramètres primaires sont estimés : λ et μ . Le premier paramètre est la phase de latence λ (en jours), elle représente le temps avant une croissance visible du mycélium. Sur la Figure 19, la phase de latence correspond au nombre de jours pendant lesquels le rayon du mycélium est égal 0, elle augmente lorsque a_w du milieu de culture diminue. Le second paramètre est le taux de croissance μ (en mm/jour), il représente l'augmentation quotidienne de la taille du mycélium. Sur la Figure 19, le taux de croissance correspond au coefficient directeur de la droite représentant le modèle linéaire (ce qui correspond à l'inclinaison de pente), il diminue lorsque a_w du milieu de culture diminue.

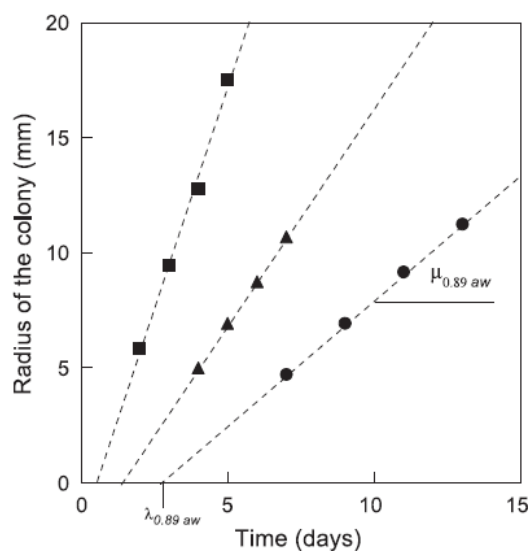


Figure 19. Cinétiques de croissance de *Penicillium chrysogenum* à 25°C sur milieu Potato Dextrose Agar à 0,97 a_w (■) 0,92 a_w (▲) et 0,89 a_w (●) (Dantigny *et al.*, 2005).

2.2. Modélisation secondaire

Comme évoqué précédemment, le modèle de Rosso est un modèle cardinal fréquemment utilisé pour décrire l'impact des facteurs environnementaux (notamment la température) sur le taux de croissance des moisissures (Morin-Sardin *et al.*, 2016; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a; Sautour *et al.*, 2001). Ce modèle a été adapté afin de décrire l'impact de a_w sur la croissance radiale des moisissures (Rosso and Robinson, 2001; Sautour *et al.*, 2001) (Equation 9):

$$\sqrt{\mu} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMR_{n(a_w)}} + \varepsilon_{ii}$$

(9)

$$CMR_{n(a_w)} = \begin{cases} \frac{(a_w - a_{wmin})^0 \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{wmin})^{n-1} \cdot \{(a_w - a_{wmin}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot [(n-1) \cdot a_{wopt} + a_{wmin} - n \cdot a_w]\}} & a_{wmin} < a_w < a_{wmax} \\ 0 & a_w \leq a_{wmin} \\ 0 & a_w > a_{wmax} \end{cases}$$

Équation 9. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la croissance radiale des moisissures (Rosso and Robinson, 2001) où a_{wmin} , a_{wopt} et a_{wmax} correspondent respectivement aux valeurs cardinales d' a_w de croissance minimale, optimale et maximale. Généralement, le paramètre a_{wmax} est fixé à 1,000. Le taux de croissance (μ) est estimé avec la modélisation primaire, μ_{opt} est la valeur de μ quand l' a_w est optimale, n est le paramètre de forme et ε_{ij} est l'erreur résiduelle. On utilise la racine carrée du taux de croissance (μ) afin de stabiliser la variance résiduelle.

Ce modèle peut également être utilisé pour modéliser l'impact d'autres facteurs environnementaux (exemple : pH) sur la croissance des moisissures (Figure 20). Toutefois, ce modèle n'est pas toujours adapté et l'ajustement des données n'est pas toujours satisfaisant notamment pour l' a_w . Dans une étude réalisée précédemment, l'impact de l' a_w sur la croissance radiale de *Paecilomyces niveus* (soluté NaCl) et de *Penicillium brevicompactum* (soluté glycérol) n'a pas été modélisé car la qualité d'ajustement avec le modèle de Rosso n'était pas satisfaisante (Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Ces résultats montrent qu'il est nécessaire d'adapter et de tester les modèles existants ou de développer de nouveaux modèles pour décrire de façon satisfaisante l'impact des facteurs environnementaux sur la prolifération mycélienne.

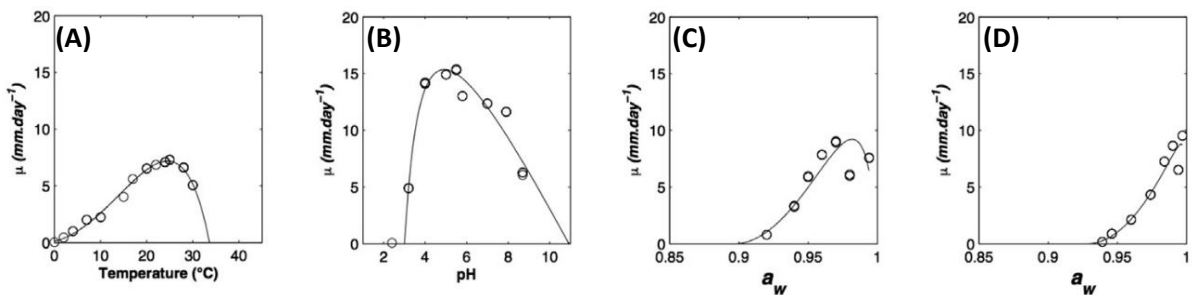


Figure 20. Impact de la température (A), du pH (B) et de l' a_w modulée par du glycérol (C) et du NaCl (D) sur le taux de croissance de *Mucor lanceolatus* sur milieu Potato Dextrose Agar. Symboles (O) = données expérimentales ; (—) = valeurs calculées avec le modèle de Rosso (Morin-Sardin *et al.*, 2016).

3. Influence des conditions expérimentales sur l'estimation des limites de croissance

Il est difficile de comparer les limites de croissance disponibles dans la bibliographie. Les conditions expérimentales peuvent avoir un fort impact sur les valeurs estimées. Pour illustrer ces propos, un tableau récapitulatif regroupant toutes les études menées sur l'impact de l' a_w sur la prolifération mycélienne sur milieux gélosés pour les espèces étudiées dans le cadre de la thèse a été produit (Tableau 2). L'ensemble des conditions expérimentales ont été ajoutées dans ce tableau afin d'être comparées. On constate que la valeur minimale d' a_w nécessaire pour avoir une prolifération mycélienne (MIN_{a_w}) peut varier pour une espèce, ce phénomène est probablement lié à la variabilité intra-spécifique. De nombreuses conditions expérimentales : la température, le pH, la composition du milieu de culture, la nature du soluté utilisée pour réduire l' a_w et la durée de l'expérience sont à prendre en compte lors de la comparaison des valeurs de croissance.

3.1. Température

De nombreux travaux ont montré que la température d'incubation peut avoir un impact sur les estimations des valeurs de croissance. Une étude a montré qu'une souche d'*Aspergillus flavus* s'est développée sur milieu Maize Meal Extract Agar à 0,85 a_w pour des températures de 25 et 30°C. En revanche, cette souche s'est développée à 0,95 a_w mais pas à 0,90 a_w pour une température de 15°C après 30 jours d'incubation (Marin *et al.*, 1998). Un phénomène similaire a été observé pour une autre souche d'*Aspergillus flavus* qui s'est développée sur milieu Potato Dextrose Agar à 0,891 a_w pour des températures de 20, 25 et 30°C. Elle s'est développée à 0,956 a_w mais pas à 0,929 a_w pour une température de 15°C après 15 jours d'incubation (Lee *et al.*, 2014). De même pour *Geotrichum candidum*, une souche s'est développée sur milieu Orange Serum Agar à 0,95 a_w pour des températures de 25 et 30°C mais elle ne s'est pas développée à cette a_w (croissance uniquement pour la condition témoin à 0,995 a_w) pour une température de 10°C après 60 jours d'incubation (Plaza *et al.*, 2003). Dans le cadre d'une étude monofactorielle sur l' a_w , il est nécessaire que la température d'étude soit proche de la température optimale de croissance des moisissures étudiées. Dans le cas contraire, le développement fongique pourrait être sous-estimé.

3.2. pH

Plusieurs études ont mis en évidence l'impact du pH sur les estimations des valeurs de croissance. Concernant *Penicillium roqueforti*, une souche s'est développée à 30°C sur milieu Malt Yeast Extract Agar à 0,86 a_w pour des valeurs de pH égales à 4,5 et 6,5. En revanche, la souche s'est développée à 0,89 a_w mais pas à 0,86 a_w pour des valeurs de pH égales à 5,5 et 7,5 (Gock *et al.*, 2003). Pour *Aspergillus flavus*, les valeurs ont été estimées à partir des graphiques. A pH 6,5, une souche s'est développée sur milieu Yeast Nitrogen Base Glucose Agar à 0,84 a_w . A pH 4,0, la souche s'est développée

à 0,87 a_w mais pas à 0,84 a_w après 100 jours d'incubation à 25°C (Pitt and Hocking, 1977). Dans le cadre d'une étude monofactorielle sur l' a_w , il est nécessaire que le pH d'étude soit proche du pH optimal de croissance des moisissures étudiées.

3.3. Milieu de culture

La composition du milieu de culture peut également impacter les estimations des valeurs de croissance. En effet, trois souches d'*Aspergillus flavus* isolées sur du maïs destiné à l'alimentation de volailles se sont développées à 0,83 a_w sur milieu Czapek Yeast Agar (considéré comme milieu riche dans l'étude). Sur milieu Corn Extract Agar (considéré comme milieu pauvre dans l'étude) à la même a_w , les souches se sont développées à 0,86 a_w mais pas à 0,83 a_w après 28 jours d'incubation à 30°C (Astoreca *et al.*, 2012). Concernant la souche CBS 122399 de *Penicillium camemberti*, deux études distinctes ont été réalisées à 20°C sur deux milieux de culture avec des compositions différentes dont l' a_w a été modifiée avec du NaCl. Sur milieu Malt Extract Autolysate Agar, cette souche s'est développée à 0,83 a_w après 10 jours d'incubation alors que sur milieu Czapek Yeast Agar elle ne s'est pas développée à 0,87 a_w après 56 jours d'incubation (Leggieri *et al.*, 2018, 2016). Dans le cadre d'une étude monofactorielle sur l' a_w , il est nécessaire que la composition du milieu de culture soit optimale pour la croissance des moisissures étudiées. Il est nécessaire de quantifier l'impact de la composition du milieu de culture (grâce à l'acquisition de données sur différents milieux de culture) afin que ce dernier puisse être pris en compte.

3.4. Nature du soluté dépresseur de l' a_w

Il a été rapporté que la nature du soluté utilisé pour réduire l' a_w du milieu de culture pouvait avoir un impact sur les estimations des valeurs de croissance. Une souche de *Penicillium roqueforti* et une souche de *Mucor circinelloides* se sont développées à 0,925 a_w sur le milieu Sabouraud Dextrose Agar contenant du glycérol, elles se sont développées à 0,950 a_w mais pas à 0,925 a_w sur le milieu contenant du NaCl à la même a_w après 10 jours d'incubation à 20°C (Marín *et al.*, 2014). Des résultats similaires ont été obtenus pour une souche de *Penicillium expansum* inoculée sur milieu Potato Dextrose Agar à 25°C après 25 jours d'incubation. Lorsque l' a_w du milieu de culture a été modifiée avec du glycérol, du sorbitol ou du glucose, la souche s'est développée sur les milieux de culture à 0,89 a_w . En revanche, lorsque l' a_w du milieu de culture a été modifiée avec du NaCl, la souche s'est développée à 0,960 a_w mais pas à 0,93 a_w . Il a été suggéré qu'un soluté ionique est généralement toxique à une plus faible concentration qu'un soluté non ionique (Morin-Sardin *et al.*, 2016). Si un soluté ionique est utilisé, il sera nécessaire de quantifier l'impact de la force ionique (grâce à l'acquisition de données à différentes forces ioniques) afin que ce dernier puisse être pris en compte en plus de l'effet lié à la réduction de l' a_w .

3.5. Durée d'incubation

La durée d'incubation peut également impacter les estimations des valeurs de croissance. Par exemple, une étude a montré que *Penicillium nalgiovense* s'est développé à 0,90 a_w mais pas à 0,87 a_w sur milieu Czapek Yeast Agar après 14 jours d'incubation à 20°C. L'incubation des milieux de culture avec les a_w testées les plus faibles (0,90 et 0,87 a_w) a été prolongée jusqu'à 56 jours. Après cette période d'incubation, la souche de *Penicillium nalgiovense* s'est développée à 0,87 a_w (Leggieri *et al.*, 2016). Ce phénomène a également été observé pour une souche de *Penicillium citrinum* et une souche de *Penicillium verrucosum*. Plusieurs études ont montré que lorsque l' a_w diminue, la phase de latence augmente. Par conséquent, les résultats présentés ci-dessus suggèrent que les valeurs de croissance déterminées suite à des études réalisées sur des courtes périodes (exemple : une dizaine de jours) peuvent sur-estimer la valeur minimale d' a_w nécessaire à la croissance si la durée de la phase de latence est supérieure à celle de l'expérience. Idéalement, il faudrait que la durée de l'expérience soit suffisamment longue pour être représentative de ce qui est retrouvé dans le contexte industriel (exemple : durée de vie de certains aliments supérieure à un mois).

3.6. Variabilité intra-spécifique

La variabilité intra-spécifique est également un facteur qui doit être pris en compte pour l'estimation des valeurs de croissance. Deux études réalisées sur *Penicillium expansum* permettent de montrer l'existence d'une variabilité au sein de cette espèce pour des souches isolées sur différents substrats (Lahlali *et al.*, 2005; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Les deux études ont été réalisées à 25°C sur milieu Potato Dextrose Agar dont l' a_w a été modifiée avec du NaCl. La souche isolée d'un fruit (pomme) ne s'est pas développée à 0,930 a_w après 25 jours d'incubation tandis que la souche isolée d'un produit laitier (fromage) s'est développée à 0,919 a_w après 30 jours d'incubation. Deux autres études ont mis en évidence l'existence d'une variabilité au sein d'une espèce pour des souches isolées sur un même type de substrat, la croissance de 10 souches de *Penicillium nalgiovense* isolées de saucisses sèches fermentées et 3 souches d'*Aspergillus flavus* isolées de maïs destiné à l'alimentation animale ont été comparées (Astoreca *et al.*, 2012; Ludemann *et al.*, 2004). Après 7 jours d'incubation à 25 °C, seulement 8 souches de *Penicillium nalgiovense* se sont développées à 0,90 a_w sur milieu Malt Extract Agar, les autres souches se sont développées à 0,95 a_w mais pas à 0,90 a_w (Ludemann *et al.*, 2004). Ce phénomène a également été observé chez *Aspergillus flavus*. Une seule souche s'est développée à 0,83 a_w sur milieu Czapek Yeast après 28 d'incubation à 25°C, les deux autres souches se sont développées à 0,86 a_w mais pas à 0,83 a_w (Astoreca *et al.*, 2012).

V. Travaux de thèse

1. Présentation des objectifs

La majorité des études de microbiologie prévisionnelle ont été réalisées sur des bactéries pathogènes ou d'altération et les informations concernant le développement de levures et moisissures sont très peu nombreuses malgré leur place importante dans l'agroalimentaire (fermentation ou altération de nombreux aliments), notamment dans l'environnement laitier.

Les principaux facteurs abiotiques qui peuvent avoir un impact sur le développement des moisissures sont la température, le pH, les conservateurs, les acides organiques, l' a_w et la composition gazeuse (O_2 et CO_2) (Dagnas and Membré, 2013). Ces facteurs peuvent avoir un rôle essentiel dans la conservation de certains produits laitiers. Parmi ceux cités précédemment, certains (température, pH, a_w) ont fait l'objet de nombreuses études alors que d'autres (notamment l' O_2 et le CO_2) ont été très peu étudiés jusqu'à présent.

L'objectif principal de la thèse est d'améliorer les connaissances sur la physiologie des moisissures vis-à-vis de l' a_w et du CO_2 , et de proposer de nouveaux modèles permettant de décrire leur comportement. En effet, si la modélisation de la physiologie bactérienne est très développée, les modèles doivent être adaptés à la physiologie fongique. A partir de l'objectif principal, plusieurs sous-objectifs ont été définis.

Le premier sous-objectif consiste à déterminer l'impact de l' a_w et du CO_2 sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier grâce à des études monofactorielles qui permettent d'étudier chaque facteur de façon indépendante. Il est intéressant d'étudier ces deux facteurs car de nombreux fromages subissent une étape de salage (en saumure ou à sec) qui contribue aux propriétés organoleptiques et à la conservation de ces produits (Guinee, 2007; Guinee and Fox, 2017). Les fromages peuvent également être emballés sous atmosphère modifiée (« *Modified Atmosphere Packaging* », MAP) afin d'augmenter leur durée de conservation (Khoshgozaran et al., 2012; Phillips, 1996). Ces deux facteurs abiotiques impactent la physiologie des moisissures qu'elles participent à l'affinage des fromages, ou qu'elles contribuent à leur altération. Les connaissances acquises pourront permettre de mieux maîtriser le développement des moisissures dans un environnement fromager.

Déjà évoqué précédemment, les études concernant l'impact de certains facteurs abiotiques dont l' a_w sur la croissance radiale sont nombreuses, le protocole pour l'acquisition des données (comprenant l'inoculation et le suivi régulier) est relativement simple à mettre en place. Au contraire, l'impact des mélanges gazeux sur la croissance radiale a été très peu étudié. Le protocole pour

l'acquisition des données est plus contraignant pour les mélanges gazeux que les autres facteurs abiotiques car ces expériences nécessitent du matériel supplémentaire. Pour une étude monofactorielle, le facteur abiotique doit être stable au cours du temps. Il est plus facile de maintenir stable une température, une a_w ou un pH qu'un mélange gazeux. En effet, la majorité des matériaux sont perméables aux gaz et la respiration des moisissures peut impacter la composition du mélange gazeux avec une consommation d'O₂ et une production de CO₂. Un nouveau dispositif expérimental a dû être développé pour acquérir des données de croissance radiale en fonction du pourcentage de CO₂.

Les données acquises seront ajoutées à l'outil de prévision des données microbiologiques Sym'Previus afin de compléter la base de données existante. Lorsque les données auront été collectées pour tous les facteurs abiotiques (température, pH, a_w , acides organiques, O₂ et CO₂), il sera possible d'identifier des combinaisons de facteurs permettant de limiter ou d'inhiber la croissance des moisissures d'altération. On parlera alors de « combinaisons d'effet barrière » à l'aide d'une étude plurifactorielle. Il sera nécessaire de trouver un compromis pour réduire ou inhiber le développement des moisissures d'altération sans toutefois empêcher le développement des moisissures d'intérêt technologique utilisés pour fermenter certains produits laitiers.

Le deuxième sous-objectif consiste à déterminer l'impact de la variabilité intra-spécifique sur les valeurs estimées de germination des spores et de croissance radiale pour l'espèce *Penicillium camemberti*. Des données seront acquises pour deux souches appartenant à cette espèce, la première souche appartient à la variété *camemberti* et la seconde souche appartient à la variété *caseifulvum*. Les deux souches sélectionnées appartiennent à la même espèce mais sont éloignées génétiquement afin de voir si ces dernières présentent la même réponse aux variations environnementales.

Le troisième sous-objectif consiste à déterminer l'origine des défauts de couleur observés à la surface de fromages à pâte molle et croûte fleurie. Ces défauts apparaissent de façon aléatoire et altèrent l'aspect visuel des fromages, ce qui peut entraîner un rejet par le consommateur. Il a été suggéré que ces phénomènes pourraient être liés à la physiologie des moisissures d'intérêt technologique utilisées pour affiner ces fromages et notamment *Penicillium camemberti*, espèce qui a été étudiée au cours de ce travail doctoral.

En résumé, ces travaux de thèse sont divisés en quatre tâches visant à répondre aux questions suivantes :

- Quel est l'impact de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier ? (Chapitre 2)
- Quel est l'impact du dioxyde de carbone sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier ? (Chapitre 3)
- Quel est l'impact du chlorure de sodium et du dioxyde de carbone sur la germination et la croissance radiale de *Penicillium camemberti* ? (Chapitre 4)
- Quelle est l'origine du « jaunissement » ou « brunissement » des fromages à pâte molle et croûte fleurie ? (Chapitre 5)

2. Présentation des modèles biologiques

Au cours de travail doctoral, 17 souches isolées de l'environnement laitier ont été étudiées. Toutes les souches appartiennent à la collection de culture de l'Université de Bretagne Occidentale (UBO culture collection, UBOCC) située à Plouzané en Bretagne à l'exception d'une souche (*Penicillium camemberti* variété *caseifulvum*) qui appartient au laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution situé à Orsay en région Parisienne. Certaines moisissures peuvent appartenir à la catégorie flore d'altération ou à la catégorie flore d'intérêt technologique, la classification dépend du contexte (substrat d'isolement). Les paragraphes suivants ont pour objectif de décrire brièvement chacune des souches étudiées.

A. *Aspergillus flavus* var. *columnaris*

❖ Classification

La classification d'*Aspergillus flavus* est la suivante : *Fungi*, *Dikarya*, *Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Eurotiomycetes*, *Eurotiomycetidae*, *Eurotiales*, *Aspergillaceae*, *Aspergillus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* var. *columnaris* (données Mycobank).



Figure 21. *Aspergillus flavus* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche d'*Aspergillus flavus* (UBOCC-A-108066) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée sur du beurre.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est jaune et vert (Figure 21).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Aspergillus flavus est une espèce ubiquitaire retrouvée dans plusieurs environnements : eau, sol, air et plantes (Augustina Egbuta *et al.*, 2016; Diaz-Guerra *et al.*, 2000). Cette espèce est un pathogène opportuniste qui peut être à l'origine d'aspergillose (Rudramurthy *et al.*, 2019). Dans l'agroalimentaire, *Aspergillus flavus* est une moisissure d'altération qui peut contaminer de nombreux produits : céréales, graines, noix, épices, viandes, lait, fromages, fruits et légumes (Pitt and Hocking, 2009; Sheikh-Ali *et al.*, 2014; Taniwaki *et al.*, 2018).

❖ Production de mycotoxines

Aspergillus flavus peut produire plusieurs mycotoxines dont les aflatoxines B, l'acide cyclopiazonique, la sterigmatocystine, la gliotoxine, l'acide aspergillique, l'acide kogique et l'aflatrem (Benkerroum, 2016; Frisvad *et al.*, 2019; Hymery *et al.*, 2014; Thrasher and Crawley, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 2. Récapitulatif des données de croissance d'*Aspergillus flavus* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	15	30	40	10	45
pH	3	8	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	18	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	18	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	148,2	-	222,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	740,8	-	-

B. *Bisifusarium domesticum*

❖ Classification

La classification de *Bisifusarium domesticum* est la suivante : *Fungi*, *Dikarya*, *Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Sordariomycetes*, *Hypocreomycetidae*, *Hypocreales*, *Nectriaceae*, *Bisifusarium*, *Bisifusarium domesticum* (données Mycobank).



Figure 22. *Bisifusarium domesticum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Bisifusarium domesticum* (UBOCC-A-113010) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée sur une croûte de fromage.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc crémeux (Figure 22).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Bisifusarium domesticum est une espèce adaptée à l'environnement fromager, elle est utilisée pour affiner des fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Saint-Nectaire, Reblochon, Raclette) et à pâte pressée cuite (exemple : Gruyère) (Bachmann and Fuerst, 2003; Bachmann *et al.*, 2005; Dupont *et al.*, 2017; Ropars *et al.*, 2012; Savary *et al.*, 2021).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Bachmann *et al.*, 2005).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 3. Récapitulatif des données de croissance de *Bisifusarium domesticum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	10	25	30	5	37
pH	4	10	10	3	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	9	18	-	27
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	4,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	22,2	-	37
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	296,3	-	370,4

C. *Cladosporium herbarum*

❖ Classification

La classification de *Cladosporium herbarum* est la suivante : *Fungi*, *Ascomycota*, *Pezizomycotina*, *Dothideomycetes*, *Dothideomycetidae*, *Capnodiales*, *Cladosporiaceae*, *Cladosporium herbarum* (données Mycobank).



Figure 23. *Cladosporium herbarum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Cladosporium herbarum* (UBOCC-A-108074) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée sur un fromage.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est marron foncé (Figure 23).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Cladosporium herbarum est une espèce ubiquitaire retrouvée dans plusieurs environnements : air, sol, textiles et peintures (Augustina Egbuta *et al.*, 2016; Schubert *et al.*, 2007). Dans l'agroalimentaire, *Cladosporium herbarum* est une moisissure d'altération qui peut contaminer de nombreux produits : céréales, fruits et légumes frais, fruits à coques, viandes réfrigérées et produits laitiers (exemples : margarine, beurre, fromage) (Garnier *et al.*, 2017a; Jacquet and Desfleurs, 1966c; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999; Pitt and Hocking, 1997).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Pitt and Hocking, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 4. Récapitulatif des données de croissance de *Cladosporium herbarum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	25	-	30
pH	3	6	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	4,5	63	-	81,1
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	13,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	22,2	370,4	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	148,2	296,3	-	370,4

D. *Geotrichum candidum*

❖ Classification

La classification de *Geotrichum candidum* est la suivante : *Fungi*, *Ascomycota*, *Saccharomycotina*, *Saccharomycetes*, *Saccharomycetidae*, *Saccharomycetales*, *Dipodascaceae*, *Geotrichum*, *Geotrichum candidum* (données Mycobank).



Figure 24. *Geotrichum candidum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Geotrichum candidum* (UBOCC-A-113018) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc (Figure 24).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Geotrichum candidum est une espèce ubiquitaire retrouvée dans plusieurs environnements : sol, air, eau, lait, plantes, ensilages, humains et animaux (Pottier *et al.*, 2008). Dans l'agroalimentaire, cette espèce est utilisée pour affiner les fromages à pâte molle et croûte fleurie (exemples : Camembert, Brie) et certains fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Saint-Nectaire, Reblochon) (Boutrou and Gue, 2005). Cette moisissure peut également contaminer plusieurs produits alimentaires : fruits (notamment les agrumes), légumes et produits laitiers (exemples : fromage frais, feta, crème, margarine) (Hudecová *et al.*, 2009; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999; Pitt and Hocking, 2009; Westall and Filtenborg, 1998).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Pitt and Hocking, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 5. Récapitulatif des données de croissance de *Geotrichum candidum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	25	30	-	37
pH	3	4	8	-	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	4,5	63	-	81,1
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	4,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	296,3	-	370,4
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	296,3	740,8	-	-

E. *Mucor circinelloides*

❖ Classification

La classification de *Mucor circinelloides* est la suivante : *Fungi*, *Mucoromyceta*, *Mucoromycota*, *Mucoromycotina*, *Mucoromycetes*, *Mucorales*, *Mucoraceae*, *Mucor*, *Mucor circinelloides* (données Mycobank).



Figure 25. *Mucor circinelloides* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Mucor circinelloides* (UBOCC-A-109182) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium présente un aspect « poilu » (Figure 25).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Mucor circinelloides est une espèce principalement retrouvée dans le sol et l'air (Hermet *et al.*, 2012). Cette moisissure peut également être responsable de mucormycoses humaines et animales (Pitt and Hocking, 2009; Wagner *et al.*, 2020). Dans l'agroalimentaire, cette espèce est utilisée pour affiner certains fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Saint-Nectaire, Tomme de Savoie) (Dupont *et al.*, 2017). Elle peut également contaminer les fruits et les produits laitiers (exemples : yaourt, fromage) (Garnier *et al.*, 2017b; Morin-Sardin *et al.*, 2016; Pitt and Hocking, 2009). Cette espèce a aussi été isolée sur de la viande, des céréales et des fruits à coques (Pitt and Hocking, 2009).

❖ Production de mycotoxines

Mucor circinelloides peut produire de l'acide 3-nitropropionique (Morin-Sardin *et al.*, 2017).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 6. Récapitulatif des données de croissance de *Mucor circinelloides* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	37	-	40
pH	3	8	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	9	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	13,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	148,2	-	222,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	740,8	-	-

F. *Mucor lanceolatus*

❖ Classification

La classification de *Mucor lanceolatus* est la suivante : *Fungi*, *Mucoromyceta*, *Mucoromycota*, *Mucoromycotina*, *Mucoromycetes*, *Mucorales*, *Mucoraceae*, *Mucor*, *Mucor lanceolatus* (données Mycobank).



Figure 26. *Mucor lanceolatus* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Mucor lanceolatus* (UBOCC-A-109153) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est noir (Figure 26).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Mucor lanceolatus est une espèce adaptée à l'environnement fromager, elle est utilisée pour affiner certains fromages à pâte pressée non cuite (exemples : Saint-Nectaire, la Tomme de Savoie) (Dupont *et al.*, 2017; Hermet *et al.*, 2012; Morin-Sardin *et al.*, 2016; Ropars *et al.*, 2012).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Garnier *et al.*, 2019; Morin-Sardin *et al.*, 2017).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 7. Récapitulatif des données de croissance de *Mucor lanceolatus* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	4	7	8	3	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	9	45	-	63
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	18	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	74,1	-	148,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	296,3	-	370,4

G. *Paecilomyces niveus*

❖ Classification

La classification de *Paecilomyces niveus* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Thermoascaceae, Paecilomyces, Paecilomyces niveus* (données Mycobank).



Figure 27. *Paecilomyces niveus* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Paecilomyces niveus* (UBOCC-A-110204) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée dans du lait de vache.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc (Figure 27).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Paecilomyces niveus est une espèce retrouvée dans le sol. Dans l'agroalimentaire, *Paecilomyces niveus* est une moisissure d'altération qui peut contaminer des agrumes (exemples : clémentine, orange), des produits à base de fruits (exemples : purée de fraises, jus d'ananas, jus concentré de pommes) et des produits laitiers (exemples : lait, fromage frais, boisson lactée) (Biango-Daniels *et al.*, 2019; Luangsa-ard *et al.*, 2004; Pitt and Hocking, 2009; Wang and Hodge, 2020).

❖ Production de mycotoxines

Paecilomyces niveus peut produire plusieurs mycotoxines dont la patuline, l'acide byssochlamique et l'acide mycophénolique (Benkerroum, 2016; Pitt and Hocking, 2009; Puel *et al.*, 2005).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 8. Récapitulatif des données de croissance de *Paecilomyces niveus* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	15	30	40	10	45
pH	3	3	7	-	8
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	4,5	27	36	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	13,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	296,3	-	370,4
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	740,8	-	-

H. *Penicillium bialowiezense*

❖ Classification

La classification de *Penicillium bialowiezense* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, Penicillium, Penicillium bialowiezense* (données Mycobank).



❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium bialowiezense* (UBOCC-A-110007) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée sur un produit laitier frais.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est jaune et vert avec des excudats et des bords irréguliers (Figure 28).

Figure 28. *Penicillium bialowiezense* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Penicillium bialowiezense a été isolé dans des sols forestiers (Won Ki *et al.*, 2018). Dans l'agroalimentaire, cette espèce est responsable de l'altération de produits laitiers (exemples : fromage, yaourt) et de raisin (Garnier *et al.*, 2017b; Nierop Groot *et al.*, 2019; Won Ki *et al.*, 2018). Cette espèce a également été isolée sur des saucisses et du pain (Coton *et al.*, 2021; Won Ki *et al.*, 2018).

❖ Production de mycotoxines

Penicillium bialowiezense est capable de produire de l'acide mycophénolique (Coton *et al.*, 2021; Prencipe *et al.*, 2018).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 9. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium bialowiezense* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	25	25	-	30
pH	3	6	8	-	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	27	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	18	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	22,2	37	-	74,1
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	74,1	370,4	-	592,6

I. *Penicillium camemberti*

❖ Classification

La classification de *Penicillium camemberti* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, Penicillium, Penicillium camemberti* (données Mycobank).

a. *Penicillium camemberti* var. *camemberti*



❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium camemberti* var. *camemberti* (UBOCC-A-113011) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 à 3) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée sur une croûte de fromage.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc (Figure 29).

Figure 29. *Penicillium camemberti* var. *camemberti* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Penicillium camemberti est une espèce adaptée à l'environnement fromager. Les souches de la variété *camemberti* sont utilisées pour affiner le Camembert et le Brie (Dupont *et al.*, 2017; Ropars *et al.*, 2020b, 2012).

❖ Production de mycotoxines

Les souches de la variété *camemberti* peuvent produire de l'acide cyclopiazonique (Ropars *et al.*, 2020b). La citrinine peut également être produite par certaines souches de *Penicillium camemberti* (Hymery *et al.*, 2014; Leggieri *et al.*, 2016; Sengun *et al.*, 2008).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 10. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium camemberti* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	3	4	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	18	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	18	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	74,1	-	148,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	74,1	740,8	-	-

b. *Penicillium camemberti* var. *caseifulvum*



Figure 30. *Penicillium camemberti* var. *caseifulvum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ **Substrat d'isolement**

La souche de *Penicillium camemberti* var. *caseifulvum* (ESE00019) étudiée au cours de la thèse (chapitres 2 et 3) a été isolée sur un fromage « sein de nounou ».

❖ **Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)**

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est vert / gris (Figure 30).

❖ **Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire**

Penicillium camemberti est une espèce adaptée à l'environnement fromager. Les souches de la variété *caseifulvum* ont été isolées sur des fromages comme la Rigotte de Condrieu et le Saint Marcellin (Ropars *et al.*, 2020b). Cette variété est également responsable d'un défaut de couleur sur un fromage de type Bleu (Suhr *et al.*, 2002; Van Den Tempel and Nielsen, 2000).

❖ **Production de mycotoxines**

Les souches de la variété *caseifulvum* ne produisent pas d'acide cyclopiazonique (Ropars *et al.*, 2020b). La citrinine peut également être produite par certaines souches de *Penicillium camemberti* (Hymery *et al.*, 2014; Leggieri *et al.*, 2016; Sengun *et al.*, 2008).

❖ **Caractéristiques de croissance**

Cette souche n'a pas été étudiée dans le cadre du projet PHYMIA 1, aucune donnée de croissance n'est disponible.

J. *Penicillium expansum*

❖ Classification

La classification de *Penicillium expansum* est la suivante : Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, *Penicillium*, *Penicillium expansum* (données Mycobank).



Figure 31. *Penicillium expansum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium expansum* (UBOCC-A-110032) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée sur du fromage frais.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est jaune et vert avec une marge blanche (Figure 31).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Dans l'agroalimentaire, *Penicillium expansum* est une moisissure d'altération qui peut contaminer de nombreux produits : fruits (exemples : pomme, poire, pêche, fraise, raisin, tomate), légumes (exemples : carotte, oignon), produits laitiers (exemples : margarine, fromage, yaourt), viandes, céréales et fruits à coques (De Clercq *et al.*, 2016; Pitt and Hocking, 2009; Won Ki *et al.*, 2018).

❖ Production de mycotoxines

Penicillium expansum peut produire plusieurs mycotoxines dont la patuline, la citrine et la roquefortine C (Benkerroum, 2016; Coton and Dantigny, 2019; Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008; Thrasher and Crawley, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 11. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium expansum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	3	5	8	-	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	9	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	13,5	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	74,1	-	148,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	740,8	-	-

K. *Penicillium fuscoglaucum*

❖ Classification

La classification de *Penicillium fuscoglaucum* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, Penicillium, Penicillium fuscoglaucum* (données Mycobank).



❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium fuscoglaucum* (UBOCC-A-113012) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc (Figure 32).

Figure 32. *Penicillium fuscoglaucum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Penicillium fuscoglaucum est principalement retrouvé dans des environnements naturels : caoutchouc, racines, bois, noix, eau (Ropars *et al.*, 2020a). Dans l'agroalimentaire, certaines souches sont commercialisées pour affiner principalement des fromages à pâte pressée (site LIP SAS) (Irlinger *et al.*, 2017). Cette moisissure peut également contaminer des produits laitiers (exemples : margarine, crème, fromage, yaourt) et du pain. Cette espèce a également été isolée sur de la viande et des fruits (Dupont *et al.*, 2017; Garnier *et al.*, 2017b; Kure and Skaar, 2019; Pitt and Hocking, 2009).

❖ Production de mycotoxines

Penicillium fuscoglaucum peut produire de l'acide cyclopiazonique (Pitt and Hocking, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 12. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium fuscoglaucum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	3	3	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	9	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	45	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	74,1	-	148,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	222,2	740,8	-	-

L. *Penicillium nalgiovense*

❖ Classification

La classification de *Penicillium nalgiovense* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, Penicillium, Penicillium nalgiovense* (données Mycobank).



❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium nalgiovense* (UBOCC-A-103013) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée sur une croûte de fromage.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est blanc (Figure 33).

Figure 33. *Penicillium nalgiovense* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Dans l'agroalimentaire, *Penicillium nalgiovense* est principalement utilisé pour la fermentation de viandes (exemples : saucisse, saucisson, salami) mais aussi pour affiner quelques fromages à pâte molle et croûte fleurie (Chávez *et al.*, 2011; Ludemann *et al.*, 2004; Mrázek *et al.*, 2016; Nielsen *et al.*, 1998). Cette moisissure peut également contaminer des fromages (Dupont *et al.*, 2017; Garnier *et al.*, 2017b; Haasum and Nielsen, 1998; Kure and Skaar, 2019).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Chávez *et al.*, 2011; Coton *et al.*, 2021; Pitt and Hocking, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 13. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium nalgiovense* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	25	30	-	37
pH	3	10	10	-	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	-	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	45	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	37	-	74,1
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	592,6	-	740,8

M. *Penicillium roqueforti*

❖ Classification

La classification de *Penicillium roqueforti* est la suivante : Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, *Penicillium*, *Penicillium roqueforti* (données Mycobank).



Figure 34. *Penicillium roqueforti* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium roqueforti* (UBOCC-A-113014) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'intérêt technologique qui a été isolée sur du fromage.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est vert avec des excudats et une marge blanche (Figure 34).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Penicillium roqueforti est une espèce ubiquitaire retrouvée dans plusieurs environnements : eau, air, bois, sol (Chávez *et al.*, 2011; Coton *et al.*, 2020; Ropars *et al.*, 2012). Dans l'agroalimentaire, *Penicillium roqueforti* peut être utilisé pour affiner des fromages à pâte persillée (exemples : Roquefort, Bleu, Fourmes d'Ambert). Il peut également contaminer d'autres fromages (exemples : Emmental, Parmesan, fromage de chèvre) et d'autres aliments comme le pain ou la viande (Coton *et al.*, 2020; Dupont *et al.*, 2017; Garnier *et al.*, 2017b; Ropars *et al.*, 2012).

❖ Production de mycotoxines

Penicillium roqueforti peut produire plusieurs mycotoxines dont la patuline, la roquefortine C, la toxine PR, l'acide penicillique, l'acide mycophénolique et les isofumigaclavines (Chávez *et al.*, 2011; Hymery *et al.*, 2014; Sengun *et al.*, 2008).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 14. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium roqueforti* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	3	4	8	-	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	18	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	18	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	37	370,4	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	74,1	740,8	-	-

N. *Penicillium solitum*

❖ Classification

La classification de *Penicillium solitum* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, Penicillium, Penicillium solitum* (données Mycobank).



Figure 35. *Penicillium solitum* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Penicillium solitum* (UBOCC-A-113015) étudiée au cours de la thèse (chapitres 1 et 2) est une souche d'altération qui a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est vert (Figure 35).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Dans l'agroalimentaire, *Penicillium solitum* est une moisissure d'altération qui peut contaminer plusieurs produits : produits laitiers (exemples : yaourt, fromage), viande séchée (exemples : salami, saucisson) et raisin (Garnier *et al.*, 2017b; Kure and Skaar, 2019; Pitt *et al.*, 1991; Ropars *et al.*, 2016; Won Ki *et al.*, 2018). Cette espèce a également été isolée sur de la viande (exemples : agneau, porc) et des fruits (exemples : pomme, poire, agrume) (Bourdichon *et al.*, 2012; Coton *et al.*, 2021; De Clercq *et al.*, 2016; Pitt *et al.*, 1991; Won Ki *et al.*, 2018).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée (Pitt and Hocking, 2009).

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 15. Récapitulatif des données de croissance de *Penicillium solitum* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	20	30	-	37
pH	3	6	8	-	9
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	-	81,1	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	4,5	45	72,1	-	-
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	74,1	-	148,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	-	740,8	-	-

O. *Scopulariosis asperula*

❖ Classification

La classification de *Scopulariosis asperula* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Hypocreomycetidae, Microascales, Microascaceae, Scopulariopsis, Scopulariopsis asperula* (données Mycobank).



❖ Substrat d'isolement

La souche de *Scopulariosis asperula* (UBOCC-A-113016) étudiée au cours de la thèse (chapitre 1 et 2) a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est marron avec quelques points blancs (Figure 36).

Figure 36. *Scopulariopsis asperula* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Scopulariopsis asperula est une espèce ubiquitaire retrouvée dans plusieurs environnements : plantes, sols, humains, animaux et autres (Dupont *et al.*, 2017; Ropars *et al.*, 2012; Woudenberg *et al.*, 2017). Dans l'agroalimentaire, elle peut être utilisée pour affiner des fromages à pâte pressée non cuite comme la Tomme des Pyrénées ou le Ossau-Iraty. Cette moisissure peut également contaminer les fromages à pâte molle et croûte fleurie (Jacquet and Desfleurs, 1966a).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée.

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 16. Récapitulatif des données de croissance de *Scopulariopsis asperula* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	25	30	-	37
pH	4	8	10	3	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	72	72	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	pas de croissance				
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	22,2	222,2	-	296,3
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	37	370,4	-	592,6

P. *Sporendonema casei*

❖ Classification

La classification de *Sporendonema casei* est la suivante : *Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Onygenales, Gymnoascaceae, Sporendonema, Sporendonema casei* (données NCBI).



Figure 37. *Sporendonema casei* sur PDA, boîte de pétri 90 mm.

❖ Substrat d'isolement

La souche de *Sporendonema casei* (UBOCC-A-113017) étudiée au cours de la thèse (chapitre 1) a été isolée dans l'environnement laitier.

❖ Aspect macroscopique sur milieu Potato Dextrose Agar (PDA)

Après inoculation en point central sur milieu PDA incubé à 25°C, le mycélium est orange clair (Figure 37).

❖ Niche écologique et importance dans l'agroalimentaire

Sporendonema casei est une espèce adaptée à l'environnement fromager, elle est utilisée pour affiner certains fromages à pâte pressée non cuite comme le Cantal et le Salers (Dupont *et al.*, 2017; Irlinger *et al.*, 2017; Ropars *et al.*, 2012). Cette moisissure peut également contaminer les fromages à pâte persillée lorsqu'elle est véhiculée dans l'air de l'environnement de production (Hammer and Gilman, 1944; Kandemir *et al.*, 2021; Ropars *et al.*, 2012).

❖ Production de mycotoxines

A ce jour, aucune production de mycotoxine n'a été observée.

❖ Caractéristiques de croissance

Tableau 17. Récapitulatif des données de croissance de *Sporendonema casei* (Coroller *et al.*, 2014).

	Croissance			Pas de croissance	
	minimum	optimum	maximum	minimum	maximum
Température (°C)	5	25	25	-	30
pH	5	10	10	4	-
acide lactique (g/L) à pH 4	4,5	45	72	-	-
acide lactique (g/L) à pH 5,6	pas de croissance				
acide propionique (mg/100g) à pH 4	7,4	7,4	148,2	-	222,2
acide propionique (mg/100g) à pH 5,6	37	148,2	222,2	-	296,3

VI. Références

- Abdel-Hadi, A. (2017). Comparative study for growth and sporulation of some mycotoxigenic fungi in relation to water activity effects. *African Journal of Microbiology Research*, 11(15), 613–619. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8497>
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., & Magan, N. (2012). A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface*, 9(69), 757–767. <https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0482>
- Abdelghany, T. M. (2018). *Mycology*. 13(July), 8012–8023.
- Abellana, M., Benedí, J., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (1999). Water activity and temperature effects on germination and growth of *E. amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 87(3), 371–380. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00828.x>
- Abellana, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Nielsen, P. V. (2000). Effect of modified atmosphere packaging and water activity on growth of *E. amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *Journal of Applied Microbiology*, 88(4), 606–616. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00999.x>
- Adler, L., Pedersen, A., & Tunblad-Johansson, I. (1982). Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiologia Plantarum*, 56(2), 139–142. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00315.x>
- Aguilera, J., Van Dijken, J. P., De Winde, J. H., & Pronk, J. T. (2005). Carbonic anhydrase (Nce103p): An essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochemical Journal*, 391(2), 311–316. <https://doi.org/10.1042/BJ20050556>
- Amoroso, G., Morell-Avrahov, L., Müller, D., Klug, K., & Sültemeyer, D. (2005). The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Molecular Microbiology*, 56(2), 549–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04560.x>
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Ramos, A. J., & Marín, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.002>
- Augustina Egbuta, M., Mwanza, M., & Oluranti Babalola, O. (2016). A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. *Advances in Microbiology*, 06(14), 1140–1158. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.614103>
- Bachmann, H., & Fuerst, M. S. (2003). Sticky cheese smear and natural white mould. *Milk Science International*, 58, 117–232.
- Bachmann, H. P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M. G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M. T., & Fürst, M. (2005). Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias Anticollanti on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, 38(4), 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Bahn, Y. S., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2005). Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during *Cryptococcus neoformans* growth, differentiation, and virulence. *Current Biology*, 15(22), 2013–2020. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.047>

- Bahn, Y. S., & Mühlischlegel, F. A. (2006). CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.09.003>
- Bahn, Y. S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J. C., Heitman, J., & Cardenas, M. E. (2007). Sensing the environment: Lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- Baltussen, T. J. H., Zoll, J., Verweij, P. E., & Melchers, W. J. G. (2020). Molecular Mechanisms of Conidial Germination in *Aspergillus* spp . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00049-19>
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, J. (1962a). Assimilation of carbon dioxide and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 548–551.
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962b). Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology*, 84, 829–840. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.829-840.1962>
- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962c). Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 58(1), 102–119. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90822-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90822-3)
- Benkerroum, N. (2016). Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 62, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.002>
- Bernáldez, V., Córdoba, J. J., Magan, N., Peromingo, B., & Rodríguez, A. (2017). The influence of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B1 production by a type strain of *Aspergillus flavus*. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.030>
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Beuchat, L. R. (1983). Influence of Water Activity on Growth, Metabolic Activities and Survival of Yeasts and Molds. *Journal of Food Protection*, 46(2), 135–141. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-46.2.135>
- Bhadauria, V., Banniza, S., Vandenberg, A., Selvaraj, G., & Wei, Y. (2012). Peroxisomal Alanine : Glyoxylate Aminotransferase AGT1 Is Indispensable for Appressorium Function of the Rice Blast Pathogen , *Magnaporthe oryzae*. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036266>
- Biango-Daniels, M. N., Snyder, A. B., Worobo, R. W., & Hodge, K. T. (2019). Fruit infected with *Paecilomyces niveus*: A source of spoilage inoculum and patulin in apple juice concentrate? *Food Control*, 97, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.10.020>
- Bonardi, A., Gratteri, P., & Nocentini, A. (2019). Carbonic anhydrases from pathogens: Fungal carbonic anhydrases and their inhibitors as potential antifungal agents. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target*, 419–448. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816476-1.00019-8>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I. B., Prajapati, J. B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelars, S., & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Boutrou, R., & Gue, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>

- Box, P. O. (1982). Growth and Accumulation of Solutes by *Phytophthora cinnamomi* and Other Lower Fungi in Response to Changes in External Osmotic Potential. *Journal of General Microbiology*, 2583–2590.
- Brand, A., & Gow, N. A. (2009). Mechanisms of hypha orientation of fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 12(4), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.05.007>
- Braun, A., Spona-Friedl, M., Avramov, M., Elsner, M., Baltar, F., Reinthaler, T., Herndl, G. J., & Griebler, C. (2021). Reviews and syntheses: Heterotrophic fixation of inorganic carbon - Significant but invisible flux in environmental carbon cycling. *Biogeosciences*, 18(12), 3689–3700. <https://doi.org/10.5194/bg-18-3689-2021>
- Cai, X., Yan, J., Liu, C., Xing, J., Huang, J., & Chen, X. (2020). Perilipin LDP1 coordinates lipid droplets formation and utilization for appressorium-mediated infection in *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology*, 22, 2843–2857. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15019>
- Cairns, T. C., Zheng, X., Zheng, P., Sun, J., & Meyer, V. (2019). Moulding the mould : understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for Biofuels*, 1–18.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *Lwt*, 89(June 2017), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., & Martín, A. (2017). The growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* strains on a cheese model system are influenced by physicochemical factors. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 6987–6996. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12865>
- Castelli, A., Littarru, G. P., & Barbaresi, G. (1969). Effect of pH and CO₂ concentration changes on lipids and fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archiv Für Mikrobiologie*, 66(1), 34–39. <https://doi.org/10.1007/BF00414661>
- Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R. O., & Laich, F. (2011). Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. *Mycofactories*, July, 73–98. <https://doi.org/10.2174/978160805223311101010073>
- Chawla, S. (2018). Role of Water Activity in Dairy Industry. *International Journal of Trend in Research and Development*, 5(2), 2394–9333. www.ijtrd.com
- Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., Dijksterhuis, J., Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., & Posthumus, M. A. (2004). Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol , a Volatile Self-Inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2823–2829. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2823>
- Chuaysrinule, C., Mahakarnchanakul, W., & Maneeboon, T. (2020). Comparative study on the effect of temperature and water activity on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius* isolates growth and mycotoxin production on a chili powder medium. *Cogent Food and Agriculture*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1782097>
- Coroller, L., Rigalma, K., & Dantigny, P. (2014). Projet PHYMIA.01 Modélisation prédictive de la germination et de la croissance par l'étude éco-physiologique de moisissures et de levures d'intérêt alimentaire.

- Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, *9*(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Coton, E., Coton, M., Hymery, N., Mounier, J., & Jany, J. L. (2020). *Penicillium roqueforti*: an overview of its genetics, physiology, metabolism and biotechnological applications. *Fungal Biology Reviews*, *34*(2), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.03.001>
- Coton, M., & Dantigny, P. (2019). Mycotoxin migration in moldy foods. *Current Opinion in Food Science*, *29*, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.007>
- Coton, M., Deniel, F., Mounier, J., Joubrel, R., Robieu, E., Pawtowski, A., Jeuge, S., Taminiau, B., Daube, G., Coton, E., & Frémaux, B. (2021). Microbial Ecology of French Dry Fermented Sausages and Mycotoxin Risk Evaluation During Storage. *Frontiers in Microbiology*, *12*(November), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737140>
- Couvert, O., Guégan, S., Hézard, B., Huchet, V., Lintz, A., Thuault, D., & Stahl, V. (2017). Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. *Food Microbiology*, *68*, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.003>
- Cuero, R. G., Smith, J. E., & Lacey, J. (1987). Interaction of water activity, temperature and substrate on mycotoxin production by *Aspergillus flavus*, *Penicillium viridicatum* and *Fusarium graminearum* in irradiated grains. *Transactions of the British Mycological Society*, *89*(2), 221–226. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(87\)80156-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(87)80156-0)
- Cummins, E. P., Selfridge, A. C., Sporn, P. H., Sznajder, J. I., & Taylor, C. T. (2014). Carbon dioxide-sensing in organisms and its implications for human disease Eoin. *Cell Mol Life Sci*. 2014, *71*, 831–845. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1470-6>.Carbon
- D’Enfert, C. (1997). Fungal spore germination: Insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, *21*(2), 163–172. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1997.0975>
- Dagnas, S., Gougouli, M., Onno, B., Koutsoumanis, K. P., & Membré, J. M. (2015). Modeling red cabbage seed extract effect on *Penicillium corylophilum*: Relationship between germination time, individual and population lag time. *International Journal of Food Microbiology*, *211*, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.008>
- Dagnas, S., Gougouli, M., Onno, B., Koutsoumanis, K. P., & Membré, J. M. (2017). Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, *240*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.013>
- Dagnas, S. P., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, *76*(3), 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R., & Syed, S. H. (1985). A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *Journal of Food Protection*, *48*(6), 532–537. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.6.532>
- Dantigny, P., Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2003). Predictive mycology: Some definitions. *Cryptogamie, Mycologie*, *24*(4), 377–383.
- Dantigny, P., & Panagou, E. Z. (2013). Predictive mycology (Issue October).

- Dantigny, Philippe. (2021). Applications of predictive modeling techniques to fungal growth in foods. *Current Opinion in Food Science*, 38, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.028>
- Dantigny, Philippe, Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., & Roussos, S. (2006). Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>
- Dantigny, Philippe, Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1–3), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>
- Dantigny, Philippe, Marín, S., Beyer, M., & Magan, N. (2007). Mould germination: Data treatment and modelling. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.002>
- Dantigny, Philippe, Nanguy, S. P. M., Judet-Correia, D., & Bensoussan, M. (2011). A new model for germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 146(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.022>
- Dave, S. R. (2016). Microbial Exopolysaccharide - An Inevitable Product for Living Beings and Environment. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 2(4), 109–111. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2016.02.00034>
- Davis, D. J., Burlak, C., & Money, N. P. (2000). Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research*, 104(7), 800–804. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002087>
- De Clercq, N., Vlaemyck, G., Van Pamel, E., Colman, D., Heyndrickx, M., Van Hove, F., De Meulenar, B., Devlieghere, F., & Van Coillie, E. (2016). Patulin production by *Penicillium expansum* isolates from apples during different steps of long-term storage. *World Mycotoxin Journal*, 9(3), 379–388. <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.1936>
- Decker, M., & Nielsen, P. V. (2005). The inhibitory effect of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* on the associated fungi of white mould cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.002>
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J. L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029>
- Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S., & Clinquart, A. (2012). Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 16(3), 369–381.
- Diaz-Guerra, T. M., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M., Gaztelurrutia, L., Navarro, J. I. V., & Tudela, J. L. R. (2000). Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), 2419–2422. <https://doi.org/10.1128/J.1128.38.6.2419-2422.2000>
- Dieuleveux, V., Pyl, D. V. A. N. D. E. R., & Chataud, J. (1998). Purification and Characterization of Anti-Listeria Compounds Produced by *Geotrichum candidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), 800–803.
- Dijksterhuis, J., Nijse, J., Hoekstra, F. A., & Golovina, E. A. (2007). High viscosity and anisotropy characterize the cytoplasm of fungal dormant stress-resistant spores. *Eukaryotic Cell*, 6(2), 157–170. <https://doi.org/10.1128/EC.00247-06>

- Dijksterhuis, Jan. (2017). The fungal spore and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 17, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.006>
- Divjak, S., & Mor, J. R. (1973). On the activity of carbon dioxide fixation in growing yeasts. *Archiv Für Mikrobiologie*, 94(3), 191–199. <https://doi.org/10.1007/BF00417451>
- Dixon, N. M., & Kell, D. B. (1989). The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*, 67(2), 109–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03387.x>
- Dumas, E., Feurtey, A., Rodriguez de la Vega, R., Le Prieur, S., Snire, A., Coton, M., Thierry, A., Coton, E., Le Piver, M., & Roueyre, D. (2020). Independent domestication events in the blue-cheese fungus. *Molecular Ecology*, 29(14), 0–2. <https://doi.org/10.1111/mec.15359>
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., & Selosse, M.-A. (2017). Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0030-2016>
- El-Kady, I. A., Moubasher, M. H., & Mostafa, M. E. (1995). Accumulation of sugar alcohols by filamentous fungi. *Folia Microbiologica*, 40(5), 481–486. <https://doi.org/10.1007/BF02814727>
- Elleuche, S., & Pöggeler, S. (2010). Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology*, 156(1), 23–29. <https://doi.org/10.1099/mic.0.032581-0>
- Fairclough, A. C., Cliffe, D. E., & Knapper, S. (2011). Factors affecting *Penicillium roqueforti* (*Penicillium glaucum*) in internally mould ripened cheeses: Implications for pre-packed blue cheeses. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(8), 1586–1590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02658.x>
- Fakruddin, M., Mazumder, R. M., & Shahnewaj, B. M. (2011). Predictive microbiology : Modeling microbial responses in food. *Ceylon Journal of Science (Biological Sciences)*, 40(2), 121–131.
- Filtenborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1)
- Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A., & Dragoni, I. (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *Journal of Food Protection*, 64(2), 246–251. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.2.246>
- Fischer, R., & Kües, U. (2006). Asexual Sporulation in Mycelial Fungi. *Growth, Differentiation and Sexuality*, 263–292. https://doi.org/10.1007/3-540-28135-5_14
- Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M. Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E., & Mounier, J. (2015). Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021>
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Novakova, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenar, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., & Houbraeken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1–63. [https://doi.org/10.1016/s0166-0616\(14\)60232-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0616(14)60232-3)
- Fung, D. Y. C. (2014). Yeasts and Molds. *Encyclopedia of Meat Sciences*, 395–404. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384731-7.00043-X>
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., & Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026>

- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. F., & Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, *117*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018>
- Garnier, L., Mounier, J., Lê, S., Pawtowski, A., Pinon, N., Camier, B., Chatel, M., Garric, G., Thierry, A., Coton, E., & Valence, F. (2019). Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. *Food Microbiology*, *81*(December 2017), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.003>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms*, *5*(3), 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., & Bensoussan, M. (1988). Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnology and Bioengineering*, *31*(5), 457–463. <https://doi.org/10.1002/bit.260310510>
- Gibbons, J. G., & Rinker, D. C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Current Opinion in Genetics and Development*, *35*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.07.003>
- Gibson, A. M., Baranyi, J., Pitt, J. I., Eyles, M. J., & Roberts, T. A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, *23*(3–4), 419–431. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8)
- Gillot, G., Decourcelle, N., Dauer, G., Barbier, G., Coton, E., Delmail, D., & Mounier, J. (2016). 1-Octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. *Food Microbiology*, *57*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.008>
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., & Battilani, P. (2011). Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: Influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*, *4*(4), 425–432. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1300>
- Gitterman, C. O., & Knight, S. G. (1952). Carbon dioxide fixation into amino acids of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Bacteriology*, *64*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1128/jb.64.2.223-231.1952>
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, *81*(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00166-6)
- Gonçalves, A. A., & Kechinski, C. P. (2011). Hurdle technology in the food industry. *Food Engineering, September 2016*, 85–146.
- Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2018). Overview of oxidative stress response genes in selected halophilic fungi. *Genes*, *9*(3). <https://doi.org/10.3390/genes9030143>
- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., & Plementinas, A. (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 77, pp. 71–96). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387044-5.00003-0>

- Gostinčar, C., Turk, M., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2009). The expressions of $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ -desaturases and an elongase by the extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* are salt dependent. *FEMS Yeast Research*, *9*(2), 247–256. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00481.x>
- Gottlieb, D. (1950). The physiology of spore germination in fungi. *The Botanical review*.
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. P. (2013). Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, *161*(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.006>
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *The Fungal Kingdom, May*, 267–292. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch12>
- Graafmans, W. D. J. (1973). The Influence of Carbon Dioxide on Morphogenesis in *Penicillium isariiforme*. *Arch. Mikrobiol*, *91*, 67–76.
- Granger, D. L., Perfect, J. R., & Durack, D. T. (1985). Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *Journal of Clinical Investigation*, *76*(2), 508–516. <https://doi.org/10.1172/JCI112000>
- Guinee, T. P. (2007). Salt in cheese. *Cheese Problems Solved*, 80–99. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.80>
- Guinee, Timothy P., & Fox, P. F. (2017). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(3), 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, *113*(11), 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Gunde-cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. *Food Technology and Biotechnology*, *2*, 170–179.
- Guynot, M. E., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2003). Modified Atmosphere Packaging for Prevention of Mold Spoilage of Bakery Products with Different pH and Water Activity Levels. *Journal of Food Protection*, *66*(10), 1864–1872. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1864>
- Haasum, I., & Nielsen, P. V. (1998). Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 451–460.
- Hall, R. A., de Sordi, L., MacCallum, D. M., Topal, H., Eaton, R., Bloor, J. W., Robinson, G. K., Levin, L. R., Buck, J., Wang, Y., Gow, N. A. R., Steegborn, C., & Mühlischlegel, F. A. (2010). CO₂ acts as a signalling molecule in populations of the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, *6*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001193>
- Hammer, B. W., & Gilman, J. C. (1944). Red mold on blue cheese. *Journal of Dairy Science*, *17*, 413–418. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(44\)92617-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(44)92617-2)
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J. L. (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology*, *116*(6), 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>

- Hocking, A. D. (1986). Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. *Journal of General Microbiology*, 132(2), 269–275. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-2-269>
- Hocking, A. D. (1990). Responses of fungi to modified atmospheres. *Fumigation and Controlled Atmosphere Storage of Grain: Proceedings of an International Conference, Singapore, 14-18 February 1989. ACIAR Proceedings No. 25.*, 70–82.
- Hocking, Ailsa D., & Miscamble, B. F. (1995). Water relations of some Zygomycetes isolated from food. *Mycological Research*, 99(9), 1113–1118. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80781-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80781-8)
- Hocking, Ailsa D., & Pitt, J. I. (1979). Water relations of some *Penicillium* species at 25 °C. *Transactions of the British Mycological Society*, 73(1), 141–145. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(79\)80084-4](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(79)80084-4)
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Current Genetics*, 61(3), 373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Holmquist, G. U., Walker, H. W., & Stahr, H. M. (1983). Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48(3), 778–782. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb14897.x>
- Homa, M., Ibragimova, S., Szebenyi, C., Nagy, G., Zsindely, N., Bodai, L., Vágvölgyi, C., Nagy, G., & Papp, T. (2022). Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Fungi*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/jof8040404>
- Hudecová, A., Valík, L., & Liptáková, D. (2009). Quantification of *Geotrichum candidum* growth in co-culture with lactic acid bacteria. *Czech Journal of Food Sciences*, 27 (SPECIAL ISSUE 2). <https://doi.org/10.17221/205/2009-cjfs>
- Hwang, D. H., Chabot, J. F., Hood, L. F., & Kinsella, J. E. (1976). Ultrastructural changes in *Penicillium roqueforti* during germination and growth. *Journal of Food Biochemistry*, 3–14. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.01092-1>
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J. L., Barbier, G., & Coton, E. (2014). Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- Irlinger, F., Helinck, S., & Jany, J. L. (2017). Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Ed., Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00011-9>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966a). " *Scopulariopsis brevicaslis* " bainier, ou mieux " *Scopulariopsis fusca* " zach, agent des taches superficielles brun violettes des fromages à pâte molle. *Le Lait*, 46(455–456), 241–253. <https://doi.org/10.1051/lait:1966455-45612>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966b). *Cladosporium herbarum* link, agent tardif de "bleu" sur les fromages à pâte molle, et specialement le Camembert. *Le Lait*, 458.
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966c). Etude d'un nouvel accident de " bleu" en fromagerie de Camembert. *Le Lait*, 46(459–460), 599–610. <https://doi.org/10.1051/lait:1966459-46024>
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R. R., Sánchez-Carbente, M. D. R., Folch-Mallol, J. L., Pérez-Llano, Y., Gunde-Cimerman, N., Sánchez, N. D. C., & Batista-García, R. A. (2020). Haloadaptative responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation: Morphology, compatible solutes, and oxidative stress at nacl saturation. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof6040316>

- Jones, R. P., & Greenfield, P. F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 4(4), 210–223. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90034-5](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90034-5)
- Judet-Correia, D., Bollaert, S., Duquenne, A., Charpentier, C., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2010). Validation of a predictive model for the growth of *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.009>
- Juodeikiene, G., Basinskiene, L., Bartkiene, E., & Matusевичius, P. (2012). Mycotoxin Decontamination Aspects in Food, Feed and Renewables Using Fermentation Processes. *Structure and Function of Food Engineering*. <https://doi.org/10.5772/46184>
- Kalai, S., Anzala, L., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2017). Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. *International Journal of Food Microbiology*, 240, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.024>
- Kandemir, H., Dukik, K., Stielow, J. B., & Ahmed, S. A. (2021). Phylogenetic and ecological reevaluation of the order Onygenales. *Fungal Diversity*, 115,1-72. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1049506/v1>
- Kanekar, P., Kanekar, S., & Kelkar, A. S. (2012). *Halophiles – Taxonomy , Diversity , Physiology*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-2229-3>
- Kejžar, A., Gobec, S., Plemenitaš, A., & Lenassi, M. (2013). Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology*, 117(5), 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.006>
- Khan, I., Tango, C. N., Miskeen, S., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Hurdle technology: A novel approach for enhanced food quality and safety – A review. *Food Control*, 73, 1426–1444. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.010>
- Khoshgozaran, S., Azizi, M. H., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: A review. *Dairy Science and Technology*, 92(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0044-3>
- Kirtil, E., Kilercioglu, M., & Oztop, M. H. (2016). Modified Atmosphere Packaging of Foods. *Reference Module in Food Science*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03218-2>
- Klengel, T., Liang, W., Chaloupka, J., Ruoff, C., Naglik, J. R., Eckert, S. E., Mogensen, E. G., Tuite, M. F., Levin, L. R., Buck, J., & Mühlschlegel, F. A. (2005). *Fungal Adenylyl Cyclase Integrates CO2 Sensing with cAMP Signaling and Virulence*. 15(22), 2021–2026. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.040>
- Kogej, T., Gorbushina, A. A., Gunde-cimerman, N., & Money, N. P. (2006). Hypersaline conditions induce changes in cell-wall melanization and colony structure in a halophilic and a xerophilic black yeast species of the genus *Trimmatostroma*. *Mycological Research*, 110, 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.01.014>
- Kogej, T., Gostinčar, C., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., & Gunde-Cimerman, N. (2006). Mycosporines in extremophilic fungi - Novel complementary osmolytes? *Environmental Chemistry*, 3(2), 105–110. <https://doi.org/10.1071/EN06012>
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6600–6605. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6600-6605.2005>

- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, *153*(12), 4261–4273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Koňuchová, M., & Valík, L. (2021). Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: Effects of temperature and water activity. *Microorganisms*, *9*(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030532>
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, *74*, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>
- Kure, C. F., & Skaar, I. (2019). The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science*, *29*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, *103*(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002>
- Lambou, K., Pennati, A., Valsecchi, I., Tada, R., Sherman, S., Sato, H., Beau, R., Gadda, G., & Latgé, J. P. (2013). Pathway of glycine betaine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, *12*(6), 853–863. <https://doi.org/10.1128/EC.00348-12>
- Lasram, S., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Mliki, A., & Ghorbel, A. (2016). Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, water activity and carbon source. *Journal of Stored Products Research*, *69*, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.06.002>
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J. D., & Brugère, H. (1999). Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Medecine Veterinaire*, *150*(5), 413–430.
- Leclercq-Perlat, M. N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H. E., & Corrieu, G. (2004). Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research*, *71*(3), 346–354. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000196>
- Lee, S., Yoon, Y., Kim, D. M., Kim, D. S., Park, K. H., & Chun, H. S. (2014). Mathematical models to predict kinetic behavior and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under various temperature and water activity conditions. *Food Science and Biotechnology*, *23*(3), 975–982. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0132-2>
- Leeuwen, M. R. Van, Smant, W., Boer, W. De, & Dijksterhuis, J. (2008). Filipin is a reliable in situ marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *Journal of Microbiological Methods*, *74*, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.04.001>
- Leggieri, M. C., Decontardi, S., & Battilani, P. (2018). Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology*, *278*(January), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Leggieri, M. C., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2016). Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signaled in cheese under different temperature and water activity regimes. *Toxins*, *9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxins9010004>
- Linder, M. B. (2009). Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, *14*(5), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.04.001>

- Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. E. (2005). Hydrophobins: The protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(5), 877–896. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2005.01.004>
- Liu, K. H., Ding, X. W., Narsing Rao, M. P., Zhang, B., Zhang, Y. G., Liu, F. H., Liu, B. B., Xiao, M., & Li, W. J. (2017). Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 8(SEP), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01789>
- López Díaz, T. M., González, C. J., Moreno, B., & Otero, A. (2002). Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food Microbiology*, 19(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0440>
- Luangsa-ard, J. J., Manoch, L., Hywel-jones, N., Artjariyasripong, S., & Samson, R. A. (2004). Thermotolerant and Thermoresistant *Paecilomyces* and its Teleomorphic States Isolated from Thai Forest and Mountain Soils. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 37, 94–101.
- Luard, E. J. (1982a). Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. *Journal of General Microbiology*, 128(11), 2563–2574. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2563>
- Luard, E. J. (1982b). Effect of osmotic shock on some intracellular solutes in two filamentous fungi. *Journal of General Microbiology*, 128(11), 2575–2581. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2575>
- Lucas, C., Da Costa, M., & Van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*, 6(3), 187–191. <https://doi.org/10.1002/yea.320060303>
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M. L., & Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003>
- Luxo, C., Nobre, M. F., & Da Costa, M. S. (1993). Intracellular polyol accumulation by yeastlike fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water stress (NaCl). *Canadian Journal of Microbiology*, 39(9), 868–873. <https://doi.org/10.1139/m93-130>
- Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., & Ventosa, A. (2010). Halophiles : Life in Saline Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6971–6981. <https://doi.org/10.1128/AEM.01868-10>
- Magan, N., & Lacey, J. (1984a). Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions - British Mycological Society*, 82(1), 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80213-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80213-2)
- Magan, N., & Lacey, J. (1984b). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions - British Mycological Society*, 82(1), 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80214-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80214-4)
- Magan, N., & Lacey, J. (1984c). Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. *Transactions of the British Mycological Society*, 82(2), 305–314. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(84\)80074-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(84)80074-1)
- Mahbobinejhad, Z., Aminian, H., Ebrahimi, L., & Vahdati, K. (2019). Reduction of aflatoxin production by exposing *Aspergillus flavus* to CO₂. *Journal of Crop Protection*, 8(4), 441–448.

- Marcellino, S. N., & Benson, D. R. (2013). The Good, the Bad, and the Ugly: Tales of Mold-Ripened Cheese. *Microbiology Spectrum*, 1(1), 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.cm-0005-12>
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2014). Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *International Dairy Journal*, 36(2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.012>
- Marín, S., Colom, C., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2009). Modelling of growth of aflatoxigenic *A. flavus* isolates from red chilli powder as a function of water availability. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.020>
- Marin, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A. J., Vinas, I., & Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 25–36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00297.x>
- Martin, R., Pohlert, S., Mühlischlegel, F. A., & Kurzai, O. (2017). CO₂ sensing in fungi : at the heart of metabolic signaling. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0700-0>
- Mayo, B., Rodr, J., & Bel, A. (2021). Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their. *Foods*, 10(602).
- McSweeney, P. L. H. (2004). *Biochemistry of cheese ripening*. 57(2), 127–144.
- Membré, J. M., & Lambert, R. J. W. (2008). Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.006>
- Mitchell, A. P. (2005). Fungal CO₂ Sensing: A Breath of Fresh Air. *Current Biology*, 15(22), 934–936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.058>
- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Montel, M. C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J. L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 12–32. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.002>
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J. L., & Coton, E. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Mrázek, J., Pachlová, V., Buňka, F., Černíková, M., Dráb, V., Bejblová, M., Staněk, K., & Buňková, L. (2016). Effects of different strains *Penicillium nalgiovense* in the Nalžovy cheese during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2547–2554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7375>
- Muria, S. R., Fozla, D., & Khoirunnisa, F. K. (2020). Thermal Inactivation of *Talaromyces flavus* Ascospores in Pineapple Juice as Influenced by Temperature , Soluble Solids , and Spore Age. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*, 2(2), 111–119.
- Musa, H., Kasim, F. H., Nagoor Gunny, A. A., & Gopinath, S. C. B. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry*, 69(March), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.026>

- Naz, S., Gueguen-minerbe, M., Cretenet, M., & Vernoux, J. (2013). Aromatic amino acids as precursors of antimicrobial metabolites in *Geotrichum candidum*. *FEMS Microbiology Letters*, *344*, 39–47. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12152>
- Nguyen Van Long, N., & Dantigny, P. (2016). *Fungal Contamination in Packaged Foods* (pp. 45–63). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00004-8>
- Nguyen Van Long, Nicolas, Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., & Vasseur, V. (2017). Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology*, *68*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, Nicolas, Rigalma, K., Jany, J. L., Mounier, J., & Vasseur, V. (2021). Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International*, *148*(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>
- Nguyen Van Long, Nicolas, Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K., & Mounier, J. (2017). Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of fungi from dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02109>
- Nielsen, M. S., Frisvad, J. C., & Nielsen, P. V. (1998). Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *42*(1–2), 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00070-1)
- Nierop Groot, M., Abee, T., & van Bokhorst-van de Veen, H. (2019). Inactivation of conidia from three *Penicillium* spp. isolated from fruit juices by conventional and alternative mild preservation technologies and disinfection treatments. *Food Microbiology*, *81*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.004>
- Noble, E. P., Reed, D. R., & Wang, C. H. (1958). Utilization of acetate, pyruvate, and CO₂ by *Penicillium digitatum*. *Canadian Journal of Microbiology*, *4*(5), 469–476. <https://doi.org/10.1139/m58-050>
- Norlia, M., Jinap, S., Nor-Khaizura, M. A. R., Radu, S., John, J. M., Rahman, M. A. H., Peter, M. L., & Sharif, Z. (2020). Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production in peanut meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology*, *335*(August). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108836>
- Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., & Paulsch, W. E. (1978). Patulin Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature. *Journal of Food Protection*, *41*, 885–890. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.6.485>
- Northolt, M. D., Van EGMOND, H. P., & Paulsch, W. E. (1977). Differences Between *Aspergillus flavus* Strains in Growth and Aflatoxin B₁ Production in Relation to Water Activity and Temperature. *Journal of Food Protection*, *40*(11), 778–781. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-40.11.778>
- Oren, A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites? *FEMS Microbiology Letters*, *269*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00650.x>
- Oshero, N., & May, G. S. (2001). The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, *199*(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00178-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00178-1)
- Padhan, S. (2018). Hurdle Technology: A Review Article. *Trends in Biosciences*, *11*(27), 3457–3462.

- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. In *AIMS Microbiology* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2006). Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.002>
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E. C., Druzhinina, I. S., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Gostinčar, C., Kostanjšek, R., Folch-Mallol, J. L., Batista-García, R. A., & Sánchez-Carbente, M. D. R. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells*, *9*(3), 1–21. <https://doi.org/10.3390/cells9030525>
- Peromingo, B., Rodríguez, A., Bernáldez, V., Delgado, J., & Rodríguez, M. (2016). Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science*, *122*, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.024>
- Phillips, C. A. (1996). Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, *31*(6), 463–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
- Pinon, A., Zwietering, M., Perrier, L., Membré, J. M., Leporq, B., Mettler, E., Thuault, D., Coroller, L., Stahl, V., & Vialette, M. (2004). Development and Validation of Experimental Protocols for Use of Cardinal Models for Prediction of Microorganism Growth in Food Products. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(2), 1081–1087. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1081-1087.2004>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology*, *101*(1), 35–40. <https://doi.org/10.1099/00221287-101-1-35>
- Pitt, J.I., & Hocking, A. D. (1997). *Fungi and food spoilage*.
- Pitt, J.I., Spotts, R. A., Holmes, R. J., & Cruickshank, R. H. (1991). *Penicillium solitum* Revived, and its Role as a Pathogen of Pomaceous Fruit. *The American Phytopathological Society*, *1108*.
- Pitt, John I., & Miscamble, B. F. (1995). Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection*, *58*(1), 76–80. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-58.1.86>
- Pitt, John I, & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*.
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, *94*(4), 549–554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01909.x>
- Plaza, P., Usall, J., Teixidó, N., & Viñas, I. (2004). Effect of water activity and temperature on competing abilities of common postharvest citrus fungi. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(1), 75–82. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00292-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00292-7)
- Plemenitaš, A., Vaupotič, T., Lenassi, M., Kogej, T., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, *61*, 67–75. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.06>
- Plemenitaš, Ana, Konte, T., Gostinč, C., & Cimerman, N. G. (2016). Transport Systems in Halophilic Fungi. Yeast Membrane Transport, *Advances in Experimental Medicine and Biology* *892*, 307–325. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6>

- Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms : *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.021>
- Prencipe, S., Siciliano, I., Gatti, C., Garibaldi, A., Lodovica, M., Botta, R., & Spadaro, D. (2018). Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins. *Food Microbiology*, 76(July), 396–404.
- Priesterjahn, E. M., Geisen, R., & Schmidt-Heydt, M. (2020). Influence of light and water activity on growth and mycotoxin formation of selected isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Microorganisms*, 8(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122000>
- Puel, O., Tadriss, S., Galtier, P., Oswald, I. P., & Delaforge, M. (2005). *Byssoschlamys nivea* as a Source of Mycophenolic Acid. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1), 550–553. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.550>
- Riquelme, M. (2013). Tip growth in filamentous fungi: A road trip to the apex. *Annual Review of Microbiology*, 67(June), 587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155652>
- Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154(8), 539–546. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2)
- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y., Bennetot, B., & Giraud, T. (2020). *Comptes Rendus Biologies*.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology*, 30(22), 4441–4453.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>
- Ropars, J., Rodriguez, R., Vega, D., López-villavicencio, M., Gouzy, J., Dupont, J., Swennen, D., Dumas, E., Branca, A., Ropars, J., Rodriguez, R., Vega, D., López-villavicencio, M., & Gouzy, J. (2016). Diversity and Mechanisms of Genomic Adaptation in *Penicillium*.
- Ropars, J., Rodri, R. C., & Branca, A. (2015). Adaptive Horizontal Gene Transfers between Multiple Cheese-Associated Fungi Report Adaptive Horizontal Gene Transfers between Multiple Cheese-Associated Fungi. *Current Biology*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.025>
- Rosso, L., Lobry, J. R., Bajard, S., & Flandrois, J. P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 610–616. <https://doi.org/10.1128/aem.61.2.610-616.1995>
- Rosso, L., Lobry, J. R., & Flandrois, J. P. (1993). An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. *Journal of Theoretical Biology*, 162(4), 447–463.
- Rosso, L., & Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3), 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00469-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4)
- Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., Mouton, J. W., & Meis, J. F. (2019). Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. *Journal of Fungi*, 5(3), 1–23. <https://doi.org/10.3390/jof5030055>

- Saharan, G. S., Mehta, N., & Meena, P. D. (2015). Alternaria diseases of crucifers: Biology, ecology and disease management. *Alternaria Diseases of Crucifers: Biology, Ecology and Disease Management*, 1–291. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0021-8>
- Sandulachi, E. (2012). *Water activity concept and its role in doos preservation*. 40–48.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C., & Bensoussan, M. (2001). A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00471-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00471-8)
- Savary, O., Coton, M., Jc, F., Nodet, P., Ropars, J., Coton, E., & J-l, J. (2021). Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese , description of *Bisifusarium allantoides* sp . nov ., *Bisifusarium penicilloides* sp . nov ., *Longinectria* gen . nov . *lagenoides* sp . nov . and *Longinectria*. *Mycosphere*, 12(June), 1077–1100. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/13>
- Schale, F., Naresh, M., & Aldred, D. (2011). The influence of water activity and temperature on germination, growth and sporulation of *Stachybotrys chartarum* strains. *Mycopathologica*, 172(1), 17–23.
- Schinner, F., Concin, R., & Binder, H. (1982). Heterotrophic CO₂-Fixation by Fungi in Dependence on the Concentration of the Carbon Source. *Phyton*, 22(1), 81–85. www.biologiezentrum.at
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2009). Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), 493–503. <https://doi.org/10.1128/AEM.02077-08>
- Schubert, K., Groenewald, J. Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C. F., Zalar, P., Hoog, G. S. De, & Crous, P. W. (2007). Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae , Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. 105–156. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.05>
- Sengun, I., Yaman, D., & Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 291–298. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x041>
- Sheikh-Ali, S. I., Ahmad, A., Mohd-Setapar, S. H., Zakaria, Z. A., Abdul-Talib, N., Khamis, A. K., & Hoque, M. E. (2014). The potential hazards of *Aspergillus* sp. in foods and feeds, and the role of biological treatment: A review. *Journal of Microbiology*, 52(10), 807–818. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4294-7>
- Sietsma, J. H., Wosten, H. A. B., & Wessels, J. G. H. (1995). Cell wall growth and protein secretion in fungi. *Canadian Journal of Botany*.
- Sims, W. (1986). Effect of carbon dioxide on the growth and form of *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology*, 22(3), 203–208. <https://doi.org/10.1099/00222615-22-3-203>
- Skizewska, W., Struszczyk-Swita, K., & Marchut-Mikolajczyk, O. (2022). Metabolic Potential of Halophilic Filamentous Fungi — Current Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4189).
- Spinnler, H. E. (2004). *Surface Mould-ripened Cheeses*.
- Steinberg, G., Penalva, M. A., Riquelme, M., Wösten, H. A., & Harris, S. D. (2017). Cell biology of hyphal growth. *The Fungal Kingdom*, 231–265. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch11>
- Stoppani, A. O., Conches, L., De Favelukes, S. L., & Sacerdote, F. L. (1958). Assimilation of carbon dioxide by yeasts. *The Biochemical Journal*, 70(3), 438–455. <https://doi.org/10.1042/bj0700438>

- Stoppani, A. O., Favelukes, L. S., De Conches, L., & Sacerdot, F. L. (1957). Mechanism of carbon dioxide fixation by *Saccharomyces cerevisiae*.
- Stretton, S., & Goodman, A. E. (1998). Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 73(1), 79–85. <https://doi.org/10.1023/A:1000610225458>
- Suhr, K. I., Haasum, I., Steenstrup, L. D., & Larsen, T. O. (2002). Factors affecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2786–2794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74365-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74365-8)
- Supuran, C. T., & Capasso, C. (2021). A highlight on the inhibition of fungal carbonic anhydrases as drug targets for the antifungal armamentarium. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094324>
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1–2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00487-1)
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2010). Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.030>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Hocking, A. D., & Fleet, G. H. (2006). Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/0-387-28391-9_3
- Taniwaki, Marta Hiromi, Pitt, J. I., & Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, 23, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>
- Tannous, J., Atoui, A., El Khoury, A., Francis, Z., Oswald, I. P., Puel, O., & Lteif, R. (2015). A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Science and Nutrition*, 4(4), 611–622. <https://doi.org/10.1002/fsn3.324>
- Tao, L., Zhang, Y., Fan, S., Nobile, C. J., Guan, G., & Huang, G. (2017). Integration of the tricarboxylic acid (TCA) cycle with cAMP signaling and Sfl2 pathways in the regulation of CO₂ sensing and hyphal development in *Candida albicans*. In *PLoS Genetics* (Vol. 13, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006949>
- Taylor, J. (2011). One Fungus = One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. *IMA*, 10.
- Teira, E., Fernández, A., Álvarez-Salgado, X. A., García-Martín, E. E., Serret, P., & Sobrino, C. (2012). Response of two marine bacterial isolates to high CO₂ concentration. *Marine Ecology Progress Series*, 453(May), 27–36. <https://doi.org/10.3354/meps09644>
- Tenenhaus-Aziza, F., & Ellouze, M. (2015). Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, 45(PB), 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.026>

- Thierry, A., Maillard, M. B., Bonnarme, P., & Roussel, E. (2005). The addition of *Propionibacterium freudenreichii* to raclette cheese induces biochemical changes and enhances flavor development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(10), 4157–4165. <https://doi.org/10.1021/jf0481195>
- Thirumala, S., Nathu, M. P., & Aravind, H. B. (2014). Air borne microbial Hazards in Dairy and Poultry farm workers of Davangere , Karnataka. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, *2*(2), 325–328.
- Thrasher, J. D., & Crawley, S. (2009). The biocontaminants and complexity of damp indoor spaces: More than what meets the eyes. In *Toxicology and Industrial Health* (Vol. 25, Issue 10). <https://doi.org/10.1177/0748233709348386>
- Tobal, J. M., & Balieiro, M. E. da S. F. (2013). Role of carbonic anhydrases in pathogenic microorganisms: A focus on *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, *63*(PART 1), 15–27. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.064444-0>
- Toledo, A. V., Franco, M. E. E., Yanil Lopez, S. M., Troncozo, M. I., Saparrat, M. C. N., & Balatti, P. A. (2017). Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *99*, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.04.004>
- Tresner, H. D., & Hayes, J. A. (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*, *22*(2), 210–213. <https://doi.org/10.1128/aem.22.2.210-213.1971>
- Turk, M., Abramović, Z., Plemenitaš, A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research*, *7*(4), 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00209.x>
- Turk, M., Méjanelle, L., Šentjurc, M., Grimalt, J. O., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2004). Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, *8*(1), 53–61. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0360-5>
- Valík, L., Baranyi, J., & Görner, F. (1999). Predicting fungal growth: The effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, *47*(1–2), 141–146. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00201-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00201-3)
- Van Den Tempel, T., & Nielsen, M. S. (2000). Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, *57*(3), 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00263-4)
- Van Egmond, H. P. (1983). Mycotoxins in dairy products. *Food Chemistry*, *11*(4), 289–307. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90076-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90076-6)
- Verdín, J., Sánchez-León, E., Rico-Ramírez, A. M., Martínez-Núñez, L., Fajardo-Somera, R. A., & Riquelme, M. (2019). Off the wall: The rhyme and reason of *Neurospora crassa* hyphal morphogenesis. *Cell Surface*, *5*(February). <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100020>
- Villa-rojas, R., Sosa-morales, M. E., López-malo, A., & Tang, J. (2012). International Journal of Food Microbiology Thermal inactivation of *Botrytis cinerea* conidia in synthetic medium and strawberry puree. *International Journal of Food Microbiology*, *155*, 269–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.021>
- Visconti, V., Coton, E., Rigalma, K., & Dantigny, P. (2021). Effects of disinfectants on inactivation of mold spores relevant to the food industry: a review. *Fungal Biology Reviews*, *38*, 44–66. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2021.09.004>

- Visconti, V., Rigalma, K., Coton, E., & Dantigny, P. (2020). Impact of intraspecific variability and physiological state on *Penicillium commune* inactivation by 70% ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, 332(February), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108782>
- Visconti, V., Rigalma, K., Coton, E., & Dantigny, P. (2021). Impact of the physiological state of fungal spores on their inactivation by active chlorine and hydrogen peroxide. *Food Microbiology*, 100(June). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103850>
- Visconti, V., Rigalma, K., Coton, E., & Dantigny, P. (2022). Impact of temperature application and concentration of commercial sanitizers on inactivation of food-plant fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 366(January). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109560>
- Wagner, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartz, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2020). A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 44, 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Wang, T. W., & Hodge, K. T. (2020). *Paecilomyces niveus* as a Wound-Infecting Pathogen of Citrus: Oranges and Clementines. *Plant Health Progress*, 21(4), 333–334. <https://doi.org/10.1094/PHP-05-20-0044-BR>
- Wells, J. M., & Uota, M. (1969). Germination and growth of five fungi in low-oxygen and high-carbon dioxide atmospheres.
- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(3), 263–290. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00038-8)
- Wendell Davis, J., Vernon, H., & Bert E., C. H. (1956). Carbon dioxide fixation and biosynthesis of amino acids in yeast. *Biochimica and Biophysica acta*, 21, 101–105.
- Wessels, B. Y. J. G. H. (1993). Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist*, 45, 397–413.
- Westall, S., & Filtenborg, O. (1998). Yeast occurrence in Danish feta cheese. *Food Microbiology*, 15(2), 215–222. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0161>
- Wheeler, K. A., Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (1988). Water relations of some *Aspergillus* species isolated from dried fish. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(4), 631–637. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(88\)80038-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(88)80038-x)
- Witteveen, C. F. B., & Visser, J. (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 134(1), 57–62. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00381-E](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00381-E)
- Won Ki, K., Hyun Kyu, S., Sung Kyo, W., Myung Soo, P., Narayan Chandra, P., & Seung Hun, Y. (2018). Six Species of *Penicillium* Associated with Blue Mold of Grape. *Mycobiology*, 180–185. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2007.35.4.180>
- Woudenberg, J. H. C., Meijer, M., Houbraken, J., & Samson, R. A. (2017). *Scopulariopsis* and *scopulariopsis*-like species from indoor environments. *Studies in Mycology*, 88, 1–35. [https://doi.org/10.1016/s0166-0616\(14\)60232-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0616(14)60232-3)
- Wyatt, T. T., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2013). Fungal spores for dispersion in space and time. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>

Yang, H., & Lucas, G. B. (1970). Effects of N₂-O₂ and CO₂-O₂ tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured tobacco. *Applied Microbiology*, 19(2), 271–277. <https://doi.org/10.1128/aem.19.2.271-277.1970>

Yates, A. R., Seaman, A., & Woodbine, M. (1967). Growth of *Byssochlamyces nivea* in various carbon dioxide atmospheres. *Canadian Journal of Microbiology*, 13(52), 1120–1123.

Yu, T., & Chen, Y. (2019). Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. *Science of the Total Environment*, 655, 865–879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.301>

Zaki, A. I., Eckert, J. W., & Endo, R. M. (1973). The ultrastructure of germinating conidia of *Penicillium digitatum* inhibited by sec-butylamine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 3(1), 7–13. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(73\)90003-5](https://doi.org/10.1016/0048-3575(73)90003-5)

Zhang, N., & Zhao, X. H. (2010). Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 613–619. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0108-z>

Zidan, M. A., & Abdel-Mallek, A. Y. (1987). Effect of NaCl on the accumulation of glycerol by three *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology*, 27(7), 393–397. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620270713>

Chapitre 2 : Impact de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier

I. Introduction

Le sel participe aux propriétés organoleptiques et à la conservation des aliments depuis plusieurs millénaires. Dans l'industrie laitière, de nombreux fromages subissent une étape de salage, la technique utilisée pour réaliser cette étape dépend du type de fromage. Des cristaux de sel secs peuvent être directement ajoutés et mélangés avec le caillé des fromages (exemple : Cheddar), du sel sec ou une solution de sel peut être frottée à la surface des fromages moulés (exemple : fromages de type bleu) ou les fromages moulés peuvent être immergés dans une solution de saumure (exemples : Gouda, Brie) (Guinee and Fox, 2017). La majorité des fromages ont un pourcentage de sel (chlorure de sodium, NaCl) inférieur à 10% et une activité de l'eau (a_w) supérieure à 0,90 a_w (Guinee, 2007; Guinee and Fox, 2017). L'ajout de sel permet de limiter le développement des microorganismes indésirables en diminuant l' a_w des aliments. A titre d'exemples, le Brie et le Camembert ont une a_w proche de 0,97 a_w alors que le Roquefort a une a_w proche de 0,91 a_w (Guinee, 2007). Plus l' a_w d'un aliment est élevée et plus ce dernier constitue une matrice favorable au développement des microorganismes.

Déjà évoqué précédemment, l'impact de l' a_w sur le développement fongique a déjà fait l'objet de nombreuses études. Plusieurs travaux ont été réalisés sur les espèces emblématiques d'intérêt technologique telles que *Mucor lanceolatus*, *Penicillium camemberti* et *Penicillium roquefortii* (Casquete *et al.*, 2018; Gock *et al.*, 2003; Leggieri *et al.*, 2018, 2016; Marín *et al.*, 2014; Morin-Sardin *et al.*, 2017; Nguyen Van Long *et al.*, 2021, 2017; Valík *et al.*, 1999). En revanche, il semblerait qu'aucune étude n'ait été réalisée pour d'autres espèces comme *Bisifusarium domesticum* et *Sporendonema casei* alors que ces dernières ont une place importante dans l'affinage des fromages puisqu'elles sont utilisées pour la production du Saint-Nectaire et de la Raclette ou du Cantal et du Salers respectivement (Dupont *et al.*, 2017; Irlinger *et al.*, 2017; Ropars *et al.*, 2012). Concernant les moisissures d'altération, il existe également une disparité au niveau des études réalisées jusqu'à présent. De nombreuses données sont disponibles pour *Penicillium expansum* et *Aspergillus flavus* (y compris sur leur production de mycotoxines) (Astoreca *et al.*, 2012; Giorni *et al.*, 2011; Lahlali *et al.*, 2005; Lasram *et al.*, 2016; Northolt *et al.*, 1978, 1977) tandis que pour d'autres espèces comme *Cladosporium herbarum*, *Penicillium bialowiezense* et *Scopulariopsis asperula*, peu voire aucune donnée n'est disponible alors que ces espèces ont été identifiées comme étant responsables de l'altération des produits laitiers et notamment de fromages à pâte molle et croûte fleurie (Garnier *et al.*, 2017; Jacquet and Desfleurs, 1966a, 1966b, 1966c; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999; Pitt and Hocking, 2009).

Dans les études publiées, différents solutés (exemples : glucose, sucrose, fructose, glycérol, chlorure de sodium) sont ajoutés pour réduire l' a_w des milieux de culture. Certaines études ont permis de mettre en évidence une différence de sensibilité des espèces fongiques à la réduction de l' a_w mais

aussi une différence de réponse en fonction de la nature du soluté utilisé. Les solutés sont généralement classés en deux groupes en fonction de leur dissolution dans l'eau sous forme d'ions (soluté ionique) ou non (soluté non ionique). Les solutés ioniques sont généralement toxiques à des plus faibles concentrations que les solutés non ioniques. Par exemple, il a été rapporté que des espèces appartenant au genre *Mucor* sont plus sensibles à un stress ionique qu'à un stress non ionique (Marín *et al.*, 2014; Morin-Sardin *et al.*, 2016). Lorsqu'un soluté ionique est utilisé, il est possible que deux effets soient cumulés : l'effet de l' a_w et l'effet de la force ionique.

L'objectif de cette étude est de répondre à la question : « Quel est l'impact de l'activité de l'eau sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier ? ». Cette étude a été divisée en quatre étapes qui ont consisté à : (i) mesurer la croissance radiale sur milieu solide en présence de glycérol ou de NaCl pour 16 souches appartenant à 16 espèces isolées dans un environnement laitier (ii) utiliser des modèles mathématiques pour décrire la réponse des moisissures à la diminution de l' a_w (iii) réaliser une classification des moisissures en fonction de la réponse observée et (iv) représenter l'impact de la force ionique sur la croissance radiale des moisissures pour tester l'impact de la force ionique sur la différence de réponse observée entre un soluté ionique et un soluté non ionique.

II. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment

Article publié dans le journal *Food Research International*.

Valle Marion ^{a,b}, Nguyen Van Long Nicolas ^b, Jany Jean-Luc ^c, Bregier Thibaud ^c, Pawtowski Audrey ^c, Barbier Georges ^c, Rigalma Karim ^c, Vasseur Valérie ^c, Huchet Véronique ^b, Coroller Louis ^{a*}

^a Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

^c Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29280 Plouzané, France

***Corresponding authors**

Mailing Address: Louis Coroller, Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

E-mail: louis.coroller@univ-brest.fr

Highlights

- The impact of ionic and non ionic solutes on fungal growth were studied
- *Aspergillus* and *Penicillium* spp. strains were the most xerophile studied fungi
- The fastest growth was observed for *Mucor* species (>10 mm.day⁻¹)
- Ionic solutes impact fungal growth through water activity and ionic strength
- Fungal growth rate was modelled as a function of water activity

Abstract

Filamentous fungi are used in the dairy industry as adjunct cultures in fermented products, but can also lead to food spoilage, waste and economic losses. The control of filamentous fungi with abiotic factors contributes to longer food shelf life and prevention of fungal spoilage. One of the main abiotic factors for controlling fungal growth in foods is water activity (a_w). This study aimed to evaluate radial growth as a function of a_w for sixteen fungal adjuncts and/or spoilers isolated from dairy products or a dairy environment. Glycerol (a non-ionic compound) and sodium chloride (NaCl, an ionic compound) were used to adjust the a_w of culture media. This study showed significant diversity in the responses of the tested fungal strains as a function of medium a_w . The growth response of *Penicillium bialowiezense* and *Sporendonema casei* was binary, with no clear decrease of growth rate until the growth limit, when the a_w was reduced. For the strains of *Bisifusarium domesticum*, *Mucor circinelloides* and *Penicillium camemberti*, a decrease of a_w had the same impact on radial growth rate regardless of the a_w belonging to their growth range. For the strains of *Aspergillus flavus*, *Cladosporium herbarum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor lanceolatus*, *Penicillium expansum*, *Penicillium fuscoglaucum*, *Penicillium nalgiovense*, *Paecilomyces niveus*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium solitum* and *Scopulariopsis asperula*, the impact of a decrease in a_w was more pronounced at high a_w than at low a_w . A mathematical model was suggested to describe this impact on the radial growth rate. For all tested species, radial growth was more sensitive to NaCl than glycerol. The ionic strength of NaCl mainly explains the difference in the effects of the two solutes.

Keywords

Mycelial growth, predictive microbiology, sodium chloride, glycerol, ionic strength

1. Introduction

In the food industry, filamentous fungi and yeasts are used as adjunct cultures to make fermented products, including sausages (Berwal and Dincho, 1995), cheeses (Nielsen et al., 1998) and beverages (Malbaša et al., 2011). Some species, however, can also spoil a large range of foods such as dairy (Garnier et al., 2017) or bakery goods (Dagnas and Membré, 2013). Indeed, the quality of food products can be affected by fungi, which can alter the colour, odour and taste of products, leading to economic losses and food waste. In addition, safety concerns exist concerning their ability to produce mycotoxins in food products (Sengun et al., 2008).

In the dairy industry, fungal contamination of products mainly originates from the production environment, in which spores are highly dispersed i.e., air, work surfaces, equipment, workers, ingredients for food production (Bernardi et al., 2019; Kure and Skaar, 2019). Cheeses are excellent substrates for fungal growth, and can be spoiled during production, ripening, storage, distribution in food shops or consumers' homes (Garnier et al., 2017). While some mycotoxins are unstable in a cheese matrix, others can persist under processing conditions (Kure and Skaar, 2019). The food industry, and especially the dairy industry, now aims to replace traditional preservation techniques by alternative methods in order to reduce the use of chemical compounds in food, in line with developments in food legislation and new consumer demands.

The control of abiotic factors contributes greatly to the prevention of fungal spoilage and shelf-life extension. Water activity (a_w) is generally assumed to be one of the most important factors impacting fungal growth; it may also contribute to reducing mycotoxin production (Camardo Leggieri et al., 2016; Dagnas and Membré, 2013; Gibson et al., 1994; Kosegarten et al., 2017). Salts and sugars can be added to foods to improve the organoleptic properties of products and to limit the development of spoilage microorganisms by reducing a_w . The nature of the solute used to reduce a_w is known to influence the relationship between the medium a_w and fungal proliferation (Pitt and Hocking, 1977; Rosso and Robinson, 2001). The a_w of dairy products depends on the type of product and on the production stages (drying, ripening, salting) and techniques: 0.988–0.995 a_w for whole milk, 0.961–0.980 a_w for butter

(unsalted), 0.979 a_w for cream (40% fat), 0.970–0.980 a_w for Camembert, Brie and Emmental cheeses, 0.945–0.950 a_w for Cheddar and Gruyère cheeses and 0.917–0.920 a_w for Parmesan cheese (Fox, 1997; Guinee and Fox, 2017; Schmidt and Fontana, 2008). Most fungi are able to grow at low a_w compared with bacteria (Guinee and Fox, 2017), and the main species responsible for cheese spoilage belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The latter are tolerant to a_w reduction but other abiotic factors can also have an impact on the fungal population dynamics by favouring the growth of certain species at the expense of others (Kure and Skaar, 2019; Marín et al., 2014; Musa et al., 2018). Although fungi can spoil all types of cheeses, fungal contamination occurs mainly in soft cheeses with high a_w (Kure and Skaar, 2019). Nonetheless, little is known concerning this effect in terms of risk management by predictive mycology, especially for dairy products. It was previously reported that cardinal values obtained with NaCl could be an appropriate method to develop predictive models for fungal cheese spoilage, although further studies would be needed to better understand and model the effects of NaCl on fungal growth (Nguyen Van Long et al., 2017).

In the current study, the effect of a_w on the radial growth of sixteen fungal adjuncts and/or spoilers encountered in the dairy industry was studied by using glycerol (a non-ionic compound) and sodium chloride (NaCl, an ionic compound) as solutes in culture media to modulate a_w . This study aims at assessing the diversity in physiological responses to variation of water activity adjusted with ionic or non-ionic solute of the prominent fungal species encountered in the dairy environment in order to control the spoilage of different dairy products or to improve the colonization of cheeses by adjuncts. A predictive mycology approach was used to estimate the a_w cardinal values of fungal growth for strains belonging to sixteen different species. The models obtained for both solutes were compared to highlight the diversity of fungal physiological responses and the impact of the solute choice for a_w reduction. The data obtained with glycerol and NaCl were also used to suggest a model of the radial growth response to ionic strength.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains

Sixteen fungal strains belonging to different species were selected for their significance in dairy products or the dairy environment (Table 1). All strains and informations about them were provided by the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (University of Western Brittany [UBOCC], Plouzané, France). Each strain was genetically identified by the UBOCC. Additional sequencing of the cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase (CFS) encoding gene was done to identify UBOCC-A-109153, since the *Mucor circinelloides* complex was recently resolved (Wagner et al., 2020) (GenBank accession number: OK560012, data not shown).

Table 1. List of the strains used in this study.

Fungal species	Strain Collection number (UBOCC)	Substrate of origin	Type of isolate
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-108066	butter	Spoiler
<i>Cladosporium herbarum</i>	UBOCC-A-108074	cheese	Spoiler
<i>Bisifusarium domesticum</i>	UBOCC-A-113010	cheese (crust)	Adjunct
<i>Geotrichum candidum</i>	UBOCC-A-113018	dairy environment	Adjunct
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109182	dairy environment	Spoiler
<i>Mucor lanceolatus</i>	UBOCC-A-109153	dairy environment	Adjunct
<i>Paecilomyces niveus</i>	UBOCC-A-110204	cow milk	Spoiler
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-110007	fresh dairy product	Spoiler
<i>Penicillium camemberti</i>	UBOCC-A-113011	cheese (crust)	Adjunct
<i>Penicillium expansum</i>	UBOCC-A-110032	fresh cheese	Spoiler
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	UBOCC-A-113012	dairy environment	Spoiler
<i>Penicillium nalgiovense</i>	UBOCC-A-113013	cheese (crust)	Adjunct
<i>Penicillium roqueforti</i>	UBOCC-A-113014	cheese	Adjunct
<i>Penicillium solitum</i>	UBOCC-A-113015	dairy environment	Spoiler
<i>Scopulariopsis asperula</i>	UBOCC-A-113016	dairy environment	No information
<i>Sporendonema casei</i>	UBOCC-A-113017	dairy environment	No information

2.2. Conidia production

Conidia were harvested from cultures obtained on potato dextrose agar (PDA, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA, pH 5.6, 0.995 a_w) after a 7-day incubation at 25°C in the dark. For spore collection, the cultures were flooded with sterile water containing Tween 80 at 0.01% (v/v). Conidia concentrations were estimated using a haemocytometer (Malassez, Preciss, Paris, France), and conidia were diluted prior to storage (suspended in 15% glycerol at -80°C) or inoculation. In specific situations, different incubation/harvest parameters were used in order to maximize the conidium concentration: (1) the incubation temperature was increased to 30°C for the *P. niveus* strain, and (2) the incubation period was extended to 14 days for the *P. niveus*, *B. domesticum* and *S. asperula* strains. We verified that freezing step of conidial suspensions did not impact the radial growth of fungi. The growth rates obtained with fresh and frozen conidia were not significantly different.

2.3. Growth media

Radial growth assessments were performed on potato dextrose broth (PDB, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA) supplemented with agar (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France); the pH of the culture medium was 5.3. Glycerol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) was added according to the Langmuir equation (Nevarez et al., 2009). Ten a_w levels were tested, from 0.820 to 0.995 a_w (0.820, 0.880, 0.900, 0.920, 0.940, 0.950, 0.960, 0.970, 0.980 and 0.995 a_w). NaCl (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added according to the Stokes-Robinson equation (Robinson and Stokes, 1965). Eleven a_w levels were tested, ranging from 0.815 to 0.995 a_w (0.815, 0.840, 0.862, 0.902, 0.919, 0.935, 0.950, 0.964, 0.977, 0.988 and 0.995 a_w). In order to prevent agar polymerization issues, the culture medium and water activity depressor were double-concentrated in the same bottle, while agar was double-concentrated in another bottle. The solutions were sterilised separately by autoclaving (20 min at 121°C). Before use, the culture medium was mixed with the depressor and agar at 55°C and poured into Petri dishes.

2.4. Medium inoculation and radial growth assessment

Conidium suspensions were diluted down to 10^6 conidia/mL in a solution containing Tween 80 at 0.01% (v/v), and were adjusted, using glycerol or NaCl, to the a_w of the agar medium to be inoculated. Then,

10 µL of a 10⁶ conidia/mL suspension were deposited on the medium in the centre of Petri dishes (4 technical replicates) containing 20 mL of tested medium. The Petri dishes were sealed with parafilm and incubated in plastic boxes (34 x 25 x 12 cm) containing 200 mL of a solution at the same a_w of the tested medium in order to avoid desiccation of the agar plate. The petri dishes were incubated at 25°C. Previous studies were performed on the selected strains to evaluate the impact of temperature on the fungal growth (unpublished data). The optimal growth temperature was always found in the 20°C-30°C range depending on the strain tested. Thallus diameters were regularly measured in two directions using a precision decimetre during a maximum storage period of 70 days.

2.5. Data treatment and statistical analyses

2.5.1. Radial growth modelling

Radial growth was modelled as a function of time with a two-phase primary model (Equation 1) (Dagnas and Membré, 2013; Nguyen Van Long et al., 2017) to estimate the primary parameters, namely the latency and radial growth rate:

$$r_{(t)} = \begin{cases} r_{(0)} + \varepsilon i & \text{if } t \leq \lambda \\ r_{(0)} + \mu \cdot (t - \lambda) + \varepsilon i & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (1)$$

in which $r_{(t)}$ is the thallus radius (mm), t is the incubation time (days), λ is the latency (days) and μ is the radial growth rate (mm.day⁻¹), and εi the residual error on the estimated radius. In this study, the radius $r_{(0)}$ was fixed at 3 mm.

2.5.2. Modelling the effect of water activity on the radial growth primary parameters

For the glycerol data, the radial growth rate (μ , mm.day⁻¹) was modelled as a function of water activity (a_w) with a monophasic model developed to demonstrate the effect of a_w on mould growth (Equation 2) (Rosso and Robinson, 2001):

$$\sqrt{\mu} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMR_{n(a_w)} + \varepsilon i} \quad (2)$$

$$CMR_{n(a_w)} = \begin{cases} \frac{(a_w - a_{wmin})^n \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{wmin})^{n-1} \cdot \{(a_w - a_{wmin}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot [(n-1) \cdot a_{wopt} + a_{wmin} - n \cdot a_w]\}} & a_w \leq a_{wmin} \\ 0 & a_{wmin} < a_w < a_{wmax} \\ 0 & a_w > a_{wmax} \end{cases}$$

where $a_{w\ min}$, $a_{w\ opt}$ and $a_{w\ max}$ are the cardinal a_w values corresponding to the minimum, optimum and maximum a_w values respectively and ε_{ii} is the residual error on the estimated value. In this study, the $a_{w\ max}$ parameter was fixed at 1.000. The radial growth rate, μ , was estimated with Equation (1); μ_{opt} is the value of μ when a_w is equal to $a_{w\ opt}$. n is a shape parameter, equal to 2 in our case (Rosso and Robinson, 2001). When the data did not allow the estimation of an optimal value, the $a_{w\ opt}$ parameter was fixed at the average value between the two a_w levels for which the highest growth rates were observed. This model describes a regular reduction of growth rate by a_w decrease.

For the NaCl data, two different equations were used to model the radial growth rate (μ , mm.day⁻¹) as a function of a_w . For some strains, the Cardinal Model Rosso (CMR) model (Equation 2) was used. For other strains, a biphasic model adapted from a model developed for growth modelling of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature was used (Equation 3) (Le Marc et al., 2002):

$$\sqrt{\mu} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMLM_n(a_w)} + \varepsilon_{ii} \quad (3)$$

$$CMLM_n(a_w) = \begin{cases} \frac{(a_w - a_{w1})^2 \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot [(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot (a_{wopt} + a_{w1} - 2 \cdot a_w)]}, & \text{if } a_w \geq a_{wc} \\ \frac{(a_{wc} - a_{w1})^2 \cdot (a_{wc} - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot [(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot (a_{wc} - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot (a_{wopt} + a_{w1} - 2 \cdot a_{wc})]} \cdot \left(\frac{a_w - a_{wmin}}{a_{wc} - a_{wmin}}\right)^2, & \text{if } a_w < a_{wc} \end{cases}$$

where the parameters are the same as those described for Equation 2, with two additional parameters: a_{wc} , the a_w at which the switch between two different growth phases is observed, and a_{w1} , the point of intersection between the first linear part and the abscissa straight line. When the data did not allow the $a_{w\ opt}$ to be obtained, this parameter was fixed at the average value between the two a_w levels for which the highest growth rates were observed, and ε_{ii} is the residual error on the estimated value. This model describes the irregular evolution of the growth rate as a function of a_w , with a lower sensitivity to a_w variations at the lowest a_w range. The latter model was called Cardinal Model Le Marc (CMLM) in the present work.

The models were fitted by minimizing the sums of squares of the residuals (*lsqcurvefit* function, MATLAB 2018, The Mathworks Inc., USA). Linear approximations and calculations were performed to es-

timate the confidence intervals with a risk $\alpha = 0.05$ (*nlparci* function of MATLAB). The Akaike information criterion (AIC) was used to evaluate the fitting performances of the tested models and to determine which model had the best fit with the data.

2.5.3. Theoretical impact of ionic strength on radial growth rates

The effect of NaCl concentration on radial growth rates differs from that of glycerol concentration. Glycerol is a non-ionic solute that penetrates the microbial cells and limits growth in a way that could be influenced by water availability. The impact of a_w could therefore be modelled by the effects of these solutes, as follows:

$$\mu = \mu_{opt} * CMR_{n(a_w)}$$

where $CMR_{n(a_w)}$ is the water activity associated with the use of glycerol.

When NaCl is used in formulations of food or growth media, we hypothesize that its impact on the growth rate involves both a_w and ionic strength. The growth rate in NaCl experiments should, therefore, be expressed as follows:

$$\mu = \mu_{opt} * CMR_{n(a_w)} * \gamma_{n(is)}$$

where $CMR_{n(a_w)}$ could be associated with the impact of the water activity and $\gamma_{n(is)}$ is the impact of the ionic strength.

Assuming that the effect of glycerol on the radial growth rate is only due to the effect of water activity, the effect of ionic strength could be expressed as:

$$\mu_{opt} * \gamma_{n(is)} = \frac{\mu}{CMR_{n(a_w)}}$$

The effect of ionic strength on radial growth rate can be assessed by making a graphical representation of $\frac{\mu}{CMR_{n(a_w)}}$ as a function of ionic strength (*is*).

3. Results

3.1. Effect of a_w reduction on radial growth kinetics

For all tested strains, a latency phase was observed prior to the formation of a visible thallus. The duration of this latency phase varied among the tested strains and a_w levels. After the initial latency

phase, the growth of the thallus radius was linear. This phenomenon was observed in all conditions except when the tested a_w was below the minimum a_w required for the fungus to produce a visible mycelium within 70 days. This level was called $MINa_w$ in our study and can serve a rough indicator of sensitivity to a_w reduction for a given strain. If the lag phase was longer than the experiment duration (i.e. no visible growth at the end of incubation period), the radial growth rate (μ) was not estimated. However, the lag phase was not always satisfactorily estimated, this could bias estimations of secondary modelling. For these reasons, only the radial growth rate values were used for secondary modelling.

3.2. Effect of a_w reduction on radial growth rate (μ)

The reduction of a_w in the culture medium led to a lag phase increase and a radial growth rate decrease for both solutes. The CMR model (Equation 2) was used to represent a linear evolution of the growth rate in suboptimal conditions, while the CMLM model (Equation 3) was used to represent the lower sensitivity to a_w variations at low a_w . For all strains, the data from the glycerol experiments were fitted with the CMR model, whereas the CMLM model was needed to fit data obtained from the NaCl experiments for eleven out of the sixteen strains.

The different strains were classified into three groups depending on their response to a_w reduction when NaCl was used as the solute: 1) strains for which a linear evolution of the growth rate was observed in suboptimal conditions for both solutes (CMR); 2) strains for which a linear evolution of the growth rate for glycerol experiments (CMR) and a non-linear evolution of the growth rate for NaCl experiments (CMLM) were observed in suboptimal conditions; and 3) strains for which none of the models tested in the current study were satisfactory to fit the data.

The *B. domesticum*, *M. circinelloides* and *P. camemberti* strains had a linear evolution of growth rate in suboptimal a_w conditions for both solutes (Fig. 1A–C) and were classified into the first group. The CMR model was the best fitting model for these data (Table 2). Of these three strains, *B. domesticum* and *M. circinelloides* were more sensitive to a_w reduction than *P. camemberti*. For both these species, the $MINa_w$ corresponding to the low a_w with visible growth were above or equal to 0.900 a_w for both

solutes. The $MINa_w$ for the *P. camemberti* strain could not be determined for either solute because it grew at the lowest tested a_w (i.e., 0.820 and 0.815 a_w for the glycerol and NaCl experiments, respectively). Moreover, the *B. domesticum*, *M. circinelloides* and *P. camemberti* strains grew faster on glycerol media than on NaCl media. These results suggest that these species were more sensitive to NaCl than glycerol. Regardless of the solute, *M. circinelloides* grew faster than the other species of this group. The μ_{opt} were estimated above 11 mm.day⁻¹, whereas they were estimated between 2.6 and 3.4 mm.day⁻¹ and under 1 mm.day⁻¹ for *P. camemberti* and *B. domesticum*, respectively, for both solutes. Eleven strains were classified into the second group (*A. flavus*, *C. herbarum*, *M. lanceolatus*, *P. fuscoglaucum*, *P. nalgiovense*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *S. asperula*, *G. candidum*, *P. niveus* and *P. expansum*). For these strains, in suboptimal conditions, a constant evolution of the growth rate as a function of the a_w of the medium was observed using glycerol, whereas a non-linear evolution of the growth rate was observed using NaCl (Fig. 1D–H and Fig. 2A–F). For that reason, the CMR model and the CMLM model had the best fit for the glycerol and NaCl data, respectively. Consequently, two supplementary secondary parameters had to be estimated for NaCl (Table 2 and Table 3). The $MINa_w$ of the *A. flavus*, *P. fuscoglaucum*, *P. nalgiovense*, *P. roqueforti* and *P. solitum* strains could not be determined for either of the solutes because the fungi grew at the lowest tested a_w . Of the eleven strains, *M. lanceolatus*, *G. candidum* and *P. niveus* were the most sensitive to a_w reduction, with the $MINa_w$ above 0.900 a_w for both solutes. The *Aspergillus* and *Penicillium* strains were the most tolerant to a_w reduction. For the majority of these strains, the μ_{opt} were estimated between 2.7 and 5.5 mm.day⁻¹. Nevertheless, *M. lanceolatus* grew faster, with estimations of μ_{opt} above 6.5 mm.day⁻¹, while *S. asperula* grew slower, with estimations under 1.2 mm.day⁻¹ for both solutes. The estimations of a_{w1} and a_{wc} depended on the species and the extent of the biphasic effect phenomenon.

For the *P. bialowiezense* and *S. casei* strains, which were in the third group, the radial growth rate changes were not fitted by the secondary models tested (Fig. 2G–H). They grew very slowly, the estimated growth rates were under 1 mm.day⁻¹ for all tested conditions as for *B. domesticum* (in the first group). The $MINa_w$ of *P. bialowiezense* could not be determined (Table 3) because it grew at the lowest

tested a_w . The $MINa_w$ for *S. casei* were equal or close to 0.900 a_w for both solutes (Table 3). None of the tested models were able to satisfactorily fit the data.

3.3. Effect of ionic strength on radial growth rate (μ) for NaCl experiments

Our proposed hypothesis for the glycerol experiments was that the impact on the growth rate was only due to a_w reduction, while for NaCl experiments the impact on the growth rate was due to the effects of a_w reduction and the ionic strength of the solute. The a_w effect observed on the growth rate for glycerol was removed to NaCl data in order to show the effect of ionic strength on the growth rate. A linear decrease in the growth rate was observed for *M. circinelloides*, *G. candidum* and *P. roqueforti* (Fig. 3A-C) between 0 and 0.95 mol·L⁻¹ (corresponding to 0.995 and 0.935 a_w , respectively). This suggests a linear effect of ionic strength on the growth rate in this ionic strength range. In contrast, for *P. nalgiovense* (Fig. 4D), ionic strength seemed to have no clear effect on the growth rate.

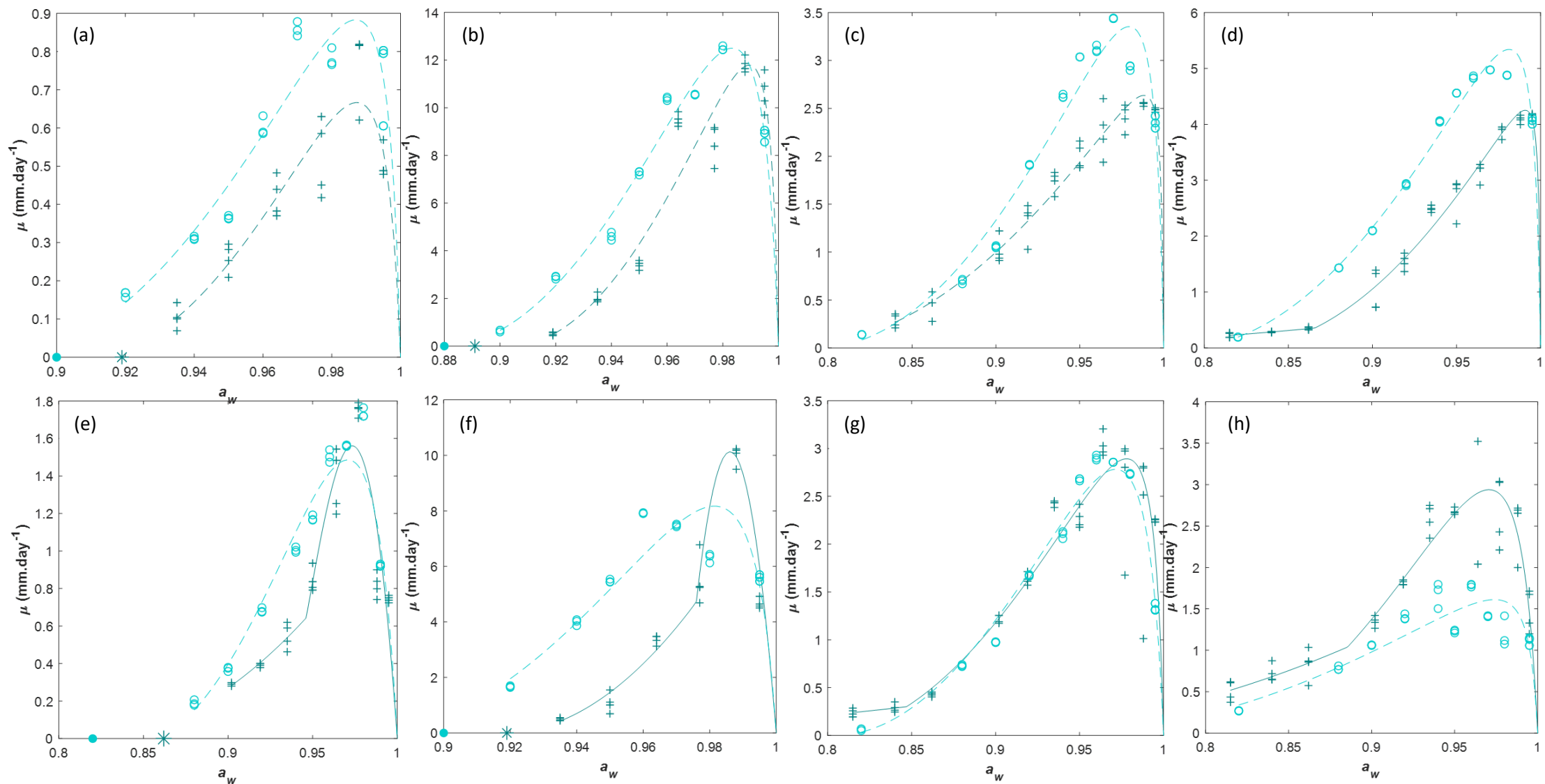


Figure 1. Influence of a_w reduction of PDA medium at 25°C on the growth rate of *B. domesticum* (a), *M. circinelloides* (b), *P. camemberti* (c), *A. flavus* (d), *C. herbarum* (e), *M. lanceolatus* (f), *P. fuscoglaucum* (g) and *P. nalgiovense* (h). Water activity was reduced either with glycerol: (-), no growth observed after 70 days (●), μ_{max} observed (○) and fitted value with CMR model values (---); or NaCl: (-), no growth observed after 70 days (*), μ_{max} observed (+) and fitted with CMR model (---) or CMLM model values (—).

Table 2

Estimation of secondary model parameters (and confidence intervals, $\alpha = 0.05$) obtained by fitting the CMR (Eq. (2)) or CMLM (Eq. (3)) models to radial growth rate (μ_{max}) of *B. domesticum*, *M. circinelloides*, *P. camemberti*, *A. flavus*, *C. herbarum*, *M. lanceolatus*, *P. fuscoglaucum* and *P. nalgiovense* at 25°C as a function of PDA medium containing either glycerol or NaCl to adjust a_w . The accuracy of models was evaluated by using the Akaike Information criterion (AIC). (MIN_{a_w}): the lowest a_w with observed growth. When growth was observed at the lowest tested a_w , the MIN_{a_w} was considered inferior or equal to this value. (-): model not adjusted or parameter not estimated.

Species	<i>B. domesticum</i>		<i>M. circinelloides</i>		<i>P. camemberti</i>		<i>A. flavus</i>	
Group	1		1		1		2	
Solute	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl
MIN_{a_w}	0.920	0.935	0.900	0.902	≤ 0.820	≤ 0.815	≤ 0.820	≤ 0.815
Model	CMR	CMR	CMR	CMR	CMR	CMR	CMR	CMLM
$a_w min$	0.883 ± 0.006	0.908 ± 0.005	0.880 ± 0.002	0.903 ± 0.003	0.794 ± 0.005	0.776 ± 0.005	0.786 ± 0.002	0.619 ± 0.113
$a_w opt$	0.987 ± 0.001	0.987 ± 0.001	0.983 ± 0.001	0.989 ± 0.001	0.979 ± 0.001	0.988 ± 0.001	0.981 ± 0.000	0.991 ± 0.002
μ_{opt}	0.88 ± 0.03	0.67 ± 0.03	12.50 ± 0.23	11.79 ± 0.46	3.35 ± 0.07	2.64 ± 0.05	5.34 ± 0.05	4.25 ± 0.10
$a_w 1$	-	-	-	-	-	-	-	0.818 ± 0.007
$a_w c$	-	-	-	-	-	-	-	0.866 ± 0.007
AIC	-62.48	-57.91	-27.53	12.86	-47.46	-68.53	-85.14	-51.23
Species	<i>C. herbarum</i>		<i>M. lanceolatus</i>		<i>P. fuscoglaucum</i>		<i>P. nalgiovense</i>	
Group	2		2		2		2	
Solute	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl
MIN_{a_w}	0.880	0.902	0.920	0.935	≤ 0.820	≤ 0.815	≤ 0.820	≤ 0.815
Model	CMR	CMLM	CMR	CMLM	CMR	CMLM	CMR	CMLM
$a_w min$	0.849 ± 0.004	0.815 ± 0.038	0.876 ± 0.007	0.917 ± 0.005	0.804 ± 0.003	0.549 ± 0.631	0.709 ± 0.020	0.645 ± 0.072
$a_w opt$	0.971 ± 0.001	0.973 ± 0.002	0.981 ± 0.001	0.986 ± 0.006	0.972 ± 0.001	0.978 ± 0.002	0.974 ± 0.002	0.971 ± 0.002
μ_{opt}	1.49 ± 0.04	1.56 ± 0.08	8.17 ± 0.34	10.09 ± 3.44	2.78 ± 0.04	2.89 ± 0.12	1.61 ± 0.06	2.94 ± 0.11
$a_w 1$	-	0.927 ± 0.009	-	0.972 ± 0.470	-	0.794 ± 0.012	-	0.795 ± 0.017
$a_w c$	-	0.946 ± 0.004	-	0.976 ± 0.003	-	0.847 ± 0.015	-	0.886 ± 0.016
AIC	-62.71	-38.11	-3.53	2.73	-73.16	-1.13	-35.74	-30.68

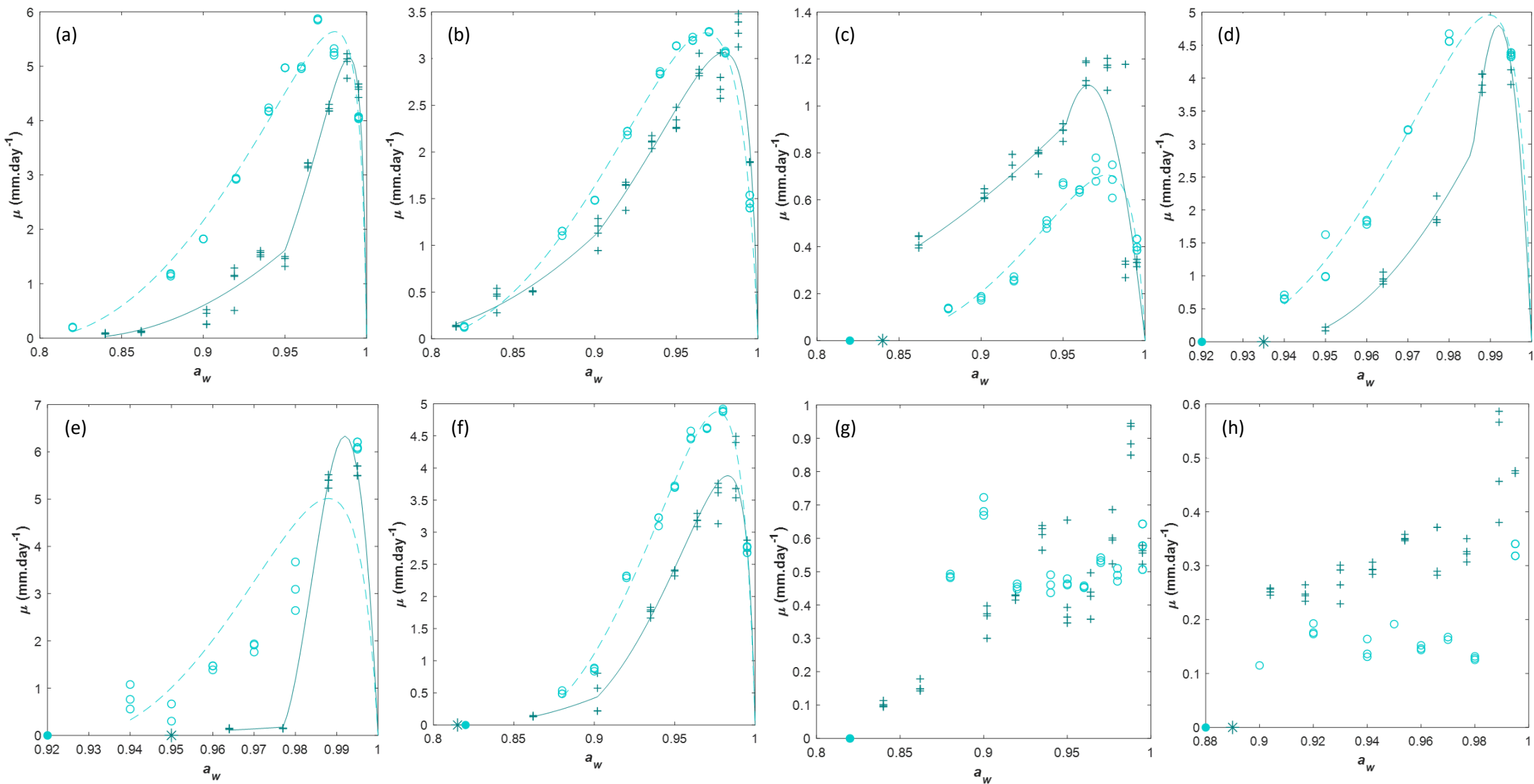


Figure 2. Influence of a_w reduction of PDA medium at 25°C on the growth rate of *P. roqueforti* (a), *P. solitum* (b), *S. asperula* (c), *G. candidum* (d), *P. niveus* (e), *P. expansum* (f), *P. bialowiezense* (g) and *S. casei* (h). Water activity was reduced either with glycerol (-), no growth observed after 70 days (\bullet), μ_{max} observed (\circ) and fitted with CMR model values ($+$); or NaCl (-): no growth observed after 70 days ($*$), μ_{max} observed (\oplus) and fitted with CMR model ($+$) or CMLM model values (\oplus).

Table 3

Estimation of secondary model parameters (and confidence intervals, $\alpha = 0.05$) obtained by fitting the CMR (Eq. (2)) or CMLM (Eq. (3)) models to radial growth rate (μ_{max}) of *P. roqueforti*, *S. asperula*, *G. candidum*, *P. niveus*, *P. expansum*, *P. bialowiezense* and *S. casei* at 25°C as a function of PDA medium containing either glycerol or NaCl to adjust a_w . The accuracy of models was evaluated using the Akaike information criterion (AIC). (MIN_{aw}): the lowest a_w with an observed growth. When a growth was observed at the lowest tested a_w , the MIN_{aw} was considered inferior or equal to this value. (-): model not adjusted or parameter not estimated.

Species	<i>P. roqueforti</i>		<i>P. solitum</i>		<i>S. asperula</i>		<i>G. candidum</i>	
Group	2		2		2		2	
Solute	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl
MIN _{aw}	≤ 0.820	≤ 0.815	≤ 0.820	≤ 0.815	0.880	0.862	0.940	0.950
Model	CMR	CMLM	CMR	CMLM	CMR	CMLM	CMR	CMLM
$a_w min$	0.796 ± 0.004	0.822 ± 0.006	0.792 ± 0.001	0.763 ± 0.013	0.833 ± 0.005	0.686 ± 0.050	0.919 ± 0.002	0.937 ± 0.002
$a_w opt$	0.980 ± 0.001	0.989 ± 0.001	0.968 ± 0.000	0.979 ± 0.001	0.977 ± 0.001	0.965 ± 0.017	0.990 ± 0.001	Fixed at 0.992
μ_{opt}	5.64 ± 0.10	5.16 ± 0.18	3.28 ± 0.02	3.06 ± 0.07	0.71 ± 0.02	1.09 ± 0.10	4.96 ± 0.13	4.77 ± 0.18
$a_w 1$	-	0.912 ± 0.006	-	0.809 ± 0.009	-	0.932 ± 0.904	-	0.978 ± 0.004
$a_w c$	-	0.950 ± 0.004	-	0.902 ± 0.027	-	0.952 ± 0.100	-	0.986 ± 0.001
AIC	-46.84	-18.67	-123.06	-55.11	-86.03	-31.24	-38.76	-51.27
Species	<i>P. niveus</i>		<i>P. expansum</i>		<i>P. bialowiezense</i>		<i>S. casei</i>	
Group	2		2		3		3	
Solute	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl	Glycerol	NaCl
MIN _{aw}	0.940	0.964	0.880	0.840	0.880	≤ 0.815	0.900	0.904
Model	CMR	CMLM	CMR	CMLM	-	-	-	-
$a_w min$	0.927 ± 0.007	0.916 ± 0.019	0.848 ± 0.002	0.814 ± 0.017	-	-	-	-
$a_w opt$	Fixed at 0.988	Fixed at 0.992	0.977 ± 0.001	Fixed at 0.983	-	-	-	-
μ_{opt}	5.01 ± 0.66	6.31 ± 0.19	4.87 ± 0.07	3.88 ± 0.12	-	-	-	-
$a_w 1$	-	0.975 ± 0.004	-	0.869 ± 0.008	-	-	-	-
$a_w c$	-	0.977 ± 0.004	-	0.902 ± 0.009	-	-	-	-
AIC	26.27	-56.62	-66.95	-35.39	-	-	-	-

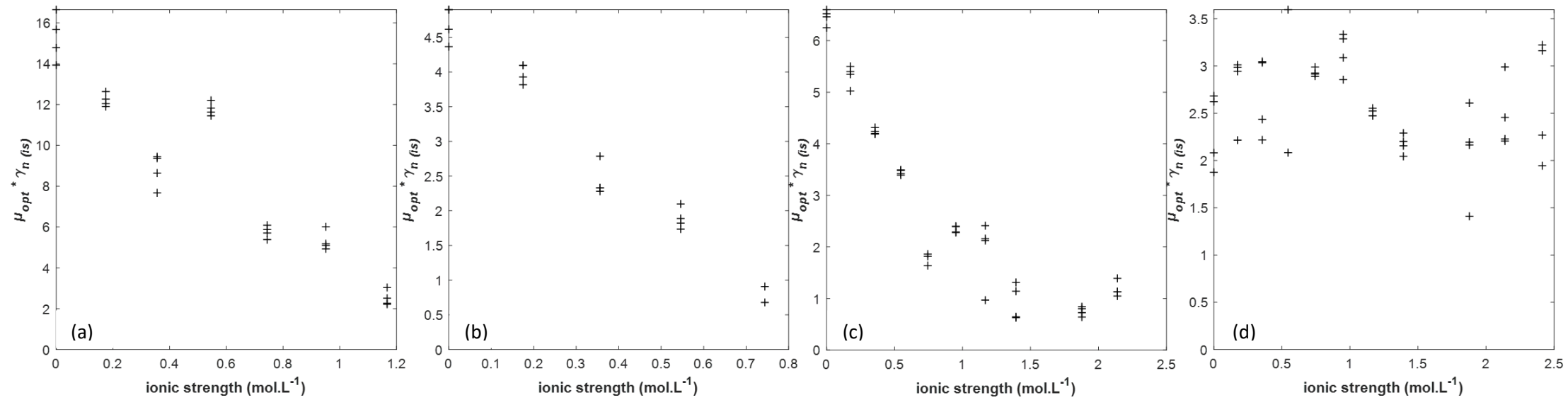


Figure 3. Influence of the ionic strength of PDA medium at 25°C on $\mu_{opt N} * \gamma_{n(is)}$ (+) of *M. circinelloides* (a), *G. candidum* (b), *P. roqueforti* (c) and *P. nalgiovense* (d).

4. Discussion

This study aimed to compare the physiological responses of filamentous fungi found in cheeses to a_w reduction, using either a non-ionic compound (glycerol) or an ionic compound (NaCl). Numerous studies on the growth or mycotoxin production of *A. flavus*, *P. roqueforti* or *P. expansum* as a function of a_w are available in the literature. However, little or no data are available for *S. casei*, *B. domesticum* and other less emblematic species, although their occurrence and function in the dairy industry have become increasingly evident (Bachmann et al., 2005; Dupont et al., 2017; Irlinger et al., 2015).

According to a previous study (Marín et al., 2014), *Aspergillus* and *Penicillium* are generally more tolerant of reduced a_w than *Mucor* species, and the present data support this observation. Indeed, *Mucor* species do not belong to the phylum Ascomycota like the other species of the present study but to the Mucoromycota. They also appear to be very different regarding their ecological strategy: they are not S-selected species, competitive in a stressful environment, but rather ruderal or R-selected species (Cooke and Rayner, 1984; Magan and Aldred, 2007) with rapid growth, rapid commitment to reproduction, utilization of easily assimilable resources and non-persistence (Cooke and Rayner, 1984). In accordance with other studies, lowering the a_w of the medium limits the radial growth of a fungus. It is noteworthy that some differences can be observed between the various published studies due to intraspecific variability or experimental conditions, such as the composition of culture media and nature of the solute, which makes it difficult to compare the a_w values obtained from different studies. Regarding intraspecific variability, strain choice can have a significant impact on the growth parameters. One study showed that only 80% of *P. nalgiovense* strains isolated from regional sausages were able to grow at 0.90 a_w (the lowest a_w level tested) and 25°C on malt extract agar containing glycerol (Ludemann, 2004). In the current study, the adjunct *P. nalgiovense* strain isolated from a cheese crust was able to grow at the lowest tested a_w level, which corresponded to 0.820 a_w for the glycerol experiments. It was also previously reported that the temperature and a_w cardinal values varied significantly among 29 *P. roqueforti* strains isolated from different cheeses and environments (Nguyen Van Long et al., 2021). For *P. expansum*, when NaCl was used as the solute in PDA medium incubated at 25°C, the

$MINa_w$ for a strain isolated from decayed apple was between 0.93 and 0.96 a_w (Lahlali et al., 2005), whereas this value was between 0.89 and 0.92 a_w for a strain isolated from fresh cheese (Nguyen Van Long et al., 2017). The value in the present study was between 0.815 and 0.840 a_w .

Previous studies have shown that culture media composition could also influence the growth response to a_w reduction. The $MINa_w$ for a strain of *P. camemberti* (CBS 122399) was 0.90 a_w on Czapek yeast agar (Camardo Leggieri et al., 2016), whereas it was below 0.83 a_w on malt extract autolysate agar (Camardo Leggieri et al., 2018). Both media had been incubated at 20°C, and NaCl was used as a water activity depressor. The $MINa_w$ for NaCl experiments of the *Penicillium camemberti* strain in our study was closer to the one obtained in the malt extract autolysate agar than those obtained in Czapek yeast agar because the strain grew at 0.815 a_w when NaCl was used as the solute. In addition, the $MINa_w$ was higher for low nutrient medium compared with a rich nutrient culture medium as observed on three strains of *A. flavus* grown on corn extract medium (low nutrient) or CYA medium (nutrient rich) at 30°C (Astoreca et al., 2012). Moreover, the nature of the solute (sugar, salt) added to the culture media could have an effect on the a_w values. For *P. expansum*, grown at 25°C on PDA, the $MINa_w$ was equal to or below 0.890 a_w when glycerol, sorbitol or glucose was used as a depressor, while the $MINa_w$ was between 0.930 and 0.960 a_w when NaCl was used as a depressor (Lahlali et al., 2005). Similar results were observed for *A. flavus* (Pitt and Hocking, 1977).

In addition, the maximum incubation time set in a study can bias the minimum a_w level for growth when the growth latency is longer than the duration of the experimental incubation. For *P. nalgio-vense*, the observed $MINa_w$ was 0.90 a_w when the experiments were monitored for 14 days, whereas it was 0.87 a_w when the incubation time was extended to 56 days (Camardo Leggieri et al., 2016). This observation suggested that experiments with a short incubation period, such as 7 days (Ludemann, 2004) or 10 days (Camardo Leggieri et al., 2018), could underestimate the growth latency and potentially overestimate the $MINa_w$ for growth in comparison with studies with longer incubation times such as 30 days (Nguyen Van Long et al., 2017), 70 days (Morin-Sardin et al., 2016) or 100 days (Pitt and

Hocking, 1977; Pitt and Miscamble, 1995). Naturally, longer incubation times can lead to culture medium stability issues that could also cause technical bias.

Regarding *M. lanceolatus*, there were differences in the estimated values of the secondary parameters for NaCl experiments in two previous studies. In the first study (Morin-Sardin et al., 2016), the $a_{w\ min}$ and $a_{w\ opt}$ were estimated at 0.928 and 0.996 a_w , while in the second study (Nguyen Van Long et al., 2017) these parameters were estimated at 0.870 and 0.969 a_w . These differences could be due to differences in the experimental conditions. Morin-Sardin et al. (2016) used PDB to dilute the spores, and Nguyen Van Long et al. (2017) used culture media buffered at pH 4.2 with a mixture of citric acid monohydrate and dibasic sodium phosphate. All data from both of these studies were fitted with the CMR model. In our study, the spores were diluted in a water and Tween solution, the culture media were not buffered, and the NaCl data were fitted with the CMLM model. Consequently, all experimental parameters (temperature, pH, culture medium), but also the intraspecific variability must be taken into account for data comparison because they could impact the apparent values of the a_w limit.

In the literature, the most common model used to fit the data and estimate the cardinal a_w values of fungi is the cardinal model (CMR model) (Rosso and Robinson, 2001). However, this model was not always suitable in our study because the μ_{opt} could be underestimated and the $a_{w\ min}$ could be overestimated as the growth rate for some strains was less impacted by a_w variations at low a_w using NaCl. Therefore, the CMLM model, derived from a temperature cardinal model (Le Marc et al., 2002), was tested.

When glycerol was used, the a_w reduction had a consistent impact on the radial growth rate for all tested strains. In this case, the CMR model could be used. When a shift in the growth rate sensitivity was observed between low and high a_w changes with NaCl, the CMLM model could be used. This model is an extension of the cardinal model with two supplementary parameters, and allowed a good description of fungal growth for NaCl experiments. However, the use of the CMLM model could be limited in specific situations since this model may require optimization of the experimental design or additional data.

A simplification of the CMLM model was tested to reduce the number of parameters by studying the correlation of $a_{w\ min}$, $a_{w\ opt}$, $a_{w\ 1}$ and $a_{w\ c}$ (data not shown). This model simplification was not used for data fitting because it was not possible to set a constant a_w value for the shift, as its position is species dependent. For *A. flavus*, *P. nalgiovense* and *S. asperula* (Table 2 and Table 3), the estimated $a_{w\ min}$ seemed to be underestimated because the values were very low. The confidence intervals of $a_{w\ min}$ for *A. flavus* and *P. fuscoglaucum* were very wide, with values above 0.100 a_w compared with those of the other fungi which indicates a lower precision of estimation in these two cases (Table 2). The estimations of $a_{w\ min}$ were lower than the $MINa_w$ when the growth / no growth interface was observed for the majority of the experiments. This phenomenon was probably due to the limited number of experimental data close to $MINa_w$. The acquisition of more data could lead to more accurate estimation of $a_{w\ min}$, although these results will probably not be very different from those presented in this study. To keep food safety conditions, the use of a model which underestimated $a_{w\ min}$ was better compared to one which overestimated this parameter.

Tolerance mechanisms to a_w reduction were more often described in yeasts than in filamentous fungi (this occurred in two halotolerant yeasts : *Hortaea werneckii*, which can sometimes contaminate salted foods (Cabañes et al., 2012; Musa et al., 2018; Zalar et al., 2019), and *Debaryomyces hansenii*, which can be an adjunct (cheeses, sausages) or a spoiler in foods (Garnier et al., 2017; Musa et al., 2018)). The addition of sugars or salts to the culture media leads to hyperosmotic shock. One of the main strategies used by different fungal species is the accumulation of compatible solutes to limit the loss of turgor pressure and cell volume (Luxo et al., 1993). Compatible solutes are generally uncharged organic molecules with a low molecular weight. They protect the cells under osmotic stress without inhibiting enzymatic activities. Glycerol is generally the main compatible solute accumulated under water stress (Gunde-Cimerman et al., 2018; Kogej et al., 2007; Zidan and Abdel-Mallek, 1987), but several polyols (arabinitol, erythritol, mannitol and others) (Adler et al., 1982) and other compounds, such as trehalose and proline (Davis et al., 2000; Jennings and Burke, 1990; Welsh, 2000), can be accumulated by fungi. *G. candidum* does not have an effective retention system to maintain a high glycerol

concentration within its cells (Hocking, 1986; Luxo et al., 1993), but it is able to accumulate arabinitol, which might act as a compatible solute under salt stress (Luxo et al., 1993). A strain of *A. flavus* was identified as a high producer of sugar alcohols and was able to accumulate D-arabinitol, D-mannitol and glycerol after 15 days at 28°C on Czapek medium containing 15% NaCl (El-Kady et al., 1995). Regarding other strategies described in *H. werneckii*, cell melanisation promotes glycerol retention by decreasing cell porosity (Gunde-Cimerman et al., 2018; Kejžar et al., 2013; Kogej et al., 2007; Musa et al., 2018) and mycosporine-like amino acids might contribute to osmoregulation as compatible solutes for a particular range of salinity (Kogej et al., 2007, 2006). The plasma membrane composition (sterol-to-phospholipid ratios, unsaturated fatty acids, fluids domains) could modify membrane fluidity (Gunde-Cimerman et al., 2009; Turk et al., 2007, 2004). Several shifts in the transcription of genes involved in plasma membrane and cell wall composition were also observed under salt stress. This suggests that the plasma membrane and cell wall could be modified under high salt content, as for *Aspergillus sydowii*, which has rarely been found in dried foods (Pérez Llano et al., 2020). In addition, different strategies have been identified concerning the intracellular tolerance to Na⁺ ions: *D. hansenii* relies on the accumulation of Na⁺ ions without toxic effect, while *H. werneckii* relies on the exclusion of Na⁺ and the maintenance of Na⁺ intracellular concentrations under the toxic level (Gunde-Cimerman et al., 2018, 2009; Kogej et al., 2005; Musa et al., 2018). These results suggest that several mechanisms could be involved in salt tolerance.

Significant differences between glycerol and NaCl have been previously reported (Giorni et al., 2011; Lahlali et al., 2005; Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2017), with $a_{w\ min}$ significantly affected by the solute used (Nguyen Van Long et al., 2017; Rosso and Robinson, 2001). Another study showed that the species *P. expansum* and *M. circinelloides* were more sensitive to ionic stress than non-ionic stress (Lahlali et al., 2005; Marín et al., 2014; Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2017). High concentrations of salt may lead to oxidative stress, with the production of reactive oxygen species (ROS) that could damage biomolecules or cells. This phenomenon could explain the

growth differences between these solutes. For non-ionic osmolytes, ATP synthesis and lipid peroxidation decreased in *H. werneckii*, while at high concentrations of NaCl, gene expression linked to energy production and oxidative damage protection increased (Gunde-Cimerman et al., 2018). Another study conducted on strains of *H. werneckii*, *D. hansenii* and *A. flavus* showed that the number of genes encoding antioxidant enzymes was correlated with the maximum tolerated salinity (Gostinčar and Gunde-Cimerman, 2018). A different study focusing on *Aspergillus sydowii* showed that hydroperoxides, which provide an indication about the oxidation of biomolecules, were three-fold higher in the mycelium at 5.13 M compared with 1.0 M NaCl, and the activity of catalase significantly increased in the mycelium at the higher tested salinity (Jiménez-Gómez et al., 2020). All of these observations suggest that high salt concentrations could induce oxidative stress.

The impact of ionic strength in our study was investigated by representing the $\mu_{opt} * \gamma_{n(is)}$ as a function of ionic strength (Fig. 3). Ionic strength seemed to have an effect on the growth rate of *M. circinelloides*, *G. candidum* and *P. roqueforti*. Increasing concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions might affect the cellular system of fungi by modifying enzymatic activity. The decreased growth rate related to ionic strength could be linear until ionic saturation of the cellular system is achieved; beyond that, the impact of ionic strength could become less significant on the growth rate. This hypothesis might explain why the impact of NaCl on the growth rate for *P. solitum* and *P. roqueforti* in a previous study became less than that of glycerol for the lowest a_w (Marín et al., 2014). On the contrary, no effect was observed on the growth rate of *P. nalgiovense*, suggesting that this strain was not sensitive to ionic strength. This species could, therefore, be used to make fermented products containing high amounts of salt, such as cured sausages, as it seems to have developed specific physiological strategies to grow at high ionic strength. Fungal sensitivity to ionic strength seems to be species-dependent. Indeed, it was reported that a moderate increase of NaCl concentration (< 10%) could improve the growth of some fungi as for *Penicillium nalgiovense* for which an increase of 4% NaCl produced a significant stimulus on growth (García-Rico et al., 2011). A previous study showed that the optimal a_w for growth of *Penicillium nal-*

giovense and other *Penicillium* and *Aspergillus* species was 0.950 a_w (corresponding to 8% NaCl) compared to 0.990 a_w and 0.910 a_w which corresponding to 0 and around 13% NaCl respectively (Camardo Leggieri et al., 2018). In another study, the growth rate of *Penicillium roqueforti* and *Penicillium solitum* were higher at 4% NaCl than 0 and around 8% NaCl. Likewise, the growth rate of *Penicillium olsonii* and *Aspergillus pseudoglaucus* were higher at around 8% NaCl than 0 and around 12% NaCl (Marín et al., 2014). Nevertheless, additional studies are needed. The data transformation used in this study is impacted by the experimental variability. Consequently, the impact of ionic strength does not show a clear trend for some strains. Further studies could be performed by combining several abiotic factors (temperature, pH, organic acids, a_w and modified atmospheres) in culture media then in food matrices to validate the growth rates predicted in culture media. Similar methods to those described in previous studies could be used, the results of them in cheese matrices were hopeful (Morin-Sardin et al., 2016; Nguyen Van Long et al., 2017).

To conclude, this study helps to estimate the development of food technology and spoilage strains by taking into account a large diversity of fungi found in a dairy environment as a function of reduced a_w by solutes of different types. Fungal growth as a function of a_w reduction by ionic compounds suggests that ionic strength may impact fungal growth. Predictive mycology tools may be of interest in understanding the physiology of the selected fungi as a function of a_w variation in food or industrial environments, such as *B. domesticum*, which is widely used in the production of Saint-Nectaire and raclette cheeses (Bachmann et al., 2005), and *C. herbarum*, which has been reported as a spoiler of soft cheeses (Bailly & Brugère, 1999; Jacquet & Desfleurs, 1966).

Acknowledgements

We would like to thank our partners which supports the PHYMIA 2 project “Bba Milk Valley” and the “Conseils Régionaux de Bretagne” and “Pays de la Loire”.

We would like to thank Dr. Jeanne Ropars and Pr. Henry-Eric Spinnler for the discussions and their expertise about this subject.

References

- Adler, L., Pedersen, A., Tunblad-Johansson, I., 1982. Polyol accumulation by two filamentous fungi grown at different concentrations of NaCl. *Physiologia Plantarum* 56, 139–142. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1982.tb00315.x>
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Ramos, A.J., Marín, S., 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology* 156, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.002>
- Bachmann, H.P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M.G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.T., Fürst, M., 2005. Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias Anticollanti on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 38, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Bailly, J.D., Brugère, H., 1999. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de médecine vétérinaire* 150, 413–430.
- Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. Current Opinion in Food Science, Trends in sustainable food processing. *Food Mycology* 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Berwal, J.S., Dincho, D., 1995. Molds as Protective Cultures for Raw Dry Sausages. *Journal of Food Protection* 58, 817–819. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.7.817>
- Cabañes, F.J., Bragulat, M.R., Castellá, G., 2012. *Hortaea werneckii* isolated from silicone scuba diving equipment in Spain. *Medical Mycology* 50, 852–857. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.679628>
- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., Battilani, P., 2018. Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology* 278, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., Battilani, P., 2016. Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes. *Toxins* (Basel) 9. <https://doi.org/10.3390/toxins9010004>
- Cooke, R.C., Rayner, A.D.M., 1984. Ecology of saprotrophic fungi. Longman, London; New York.
- Dagnas, S., Membré, J.-M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection* 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Davis, D.J., Burlak, C., Money, N.P., 2000. Osmotic pressure of fungal compatible osmolytes. *Mycological Research* 104, 800–804. <https://doi.org/10.1017/S0953756299002087>
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2017. Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0030-2016>
- El-Kady, I., Moubasher, H., Mostafa, M., 1995. Accumulation of sugar alcohols by filamentous fungi. *Folia Microbiologica* 40, 481–486. <https://doi.org/10.1007/BF02814727>
- Fox, P.F., 1997. Advanced Dairy Chemistry Volume 3: Lactose, water, salts and vitamins, 2nd ed. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4409-5>
- Garcia-Rico, R., Chavez, R., Fierro, F., Laich, F., 2011. Mold-Fermented Foods: *Penicillium* spp. as Ripening Agents in the Elaboration of Cheese and Meat Products, in: Mycofactories. pp. 73-98. <https://doi.org/10.2174/978160805223311101010073>

- Garnier, L., Valence, F., Mounier, J., 2017. Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A., 1994. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419–431. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8)
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Battilani, P., 2011. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal* 4, 425–432. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1300>
- Gostinčar, C., Gunde-Cimerman, N., 2018. Overview of Oxidative Stress Response Genes in Selected Halophilic Fungi. *Genes* 9, 143. <https://doi.org/10.3390/genes9030143>
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Chapter 13 - Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 317–375. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., Oren, A., 2018. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 353–375. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy009>
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., Plemenitaš, A., 2009. Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research* 113, 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.002>
- Hocking, A.D., 1986. Effects of Water Activity and Culture Age on the Glycerol Accumulation Patterns of Five Fungi. *Microbiology*, 132, 269–275. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-2-269>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Dugat-Bony, E., 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters* 362, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>
- Jacquet, J., Desfleurs, M., 1966. *Cladosporium herbarum* link, agent d'accidents tardifs de "bleu" sur les fromages a pâte molle, et spécialement le Camembert. <https://doi.org/10.1051/LAIT:196645820>
- Jennings, D.H., Burke, R.M., 1990. Compatible solutes – the mycological dimension and their role as physiological buffering agents. *New Phytologist* 116, 277–283. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb04715.x>
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R.R., Sánchez-Carbente, M. del R., Folch-Mallol, J.L., Pérez-Llano, Y., Gunde-Cimerman, N., Sánchez, N. del C., Batista-García, R.A., 2020. Haloadaptative Responses of *Aspergillus sydowii* to Extreme Water Deprivation: Morphology, Compatible Solutes, and Oxidative Stress at NaCl Saturation. *Journal of Fungi* 6, 316. <https://doi.org/10.3390/jof6040316>
- Kejžar, A., Gobec, S., Plemenitaš, A., Lenassi, M., 2013. Melanin is crucial for growth of the black yeast *Hortaea werneckii* in its natural hypersaline environment. *Fungal Biology* 117, 368–379. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.03.006>
- Kogej, T., Gostinčar, C., Volkmann, M., Gorbushina, A., Gunde-Cimerman, N., 2006. Mycosporines in Extremophilic Fungi—Novel Complementary Osmolytes? <https://doi.org/10.1071/EN06012>
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A., Gunde-Cimerman, N., 2005. The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 6600–6605. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6600-6605.2005>

- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A.A., Galinski, E.A., Gunde-Cimerman, N., 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* (Reading, Engl.) 153, 4261–4273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Kosegarten, C.E., Ramírez-Corona, N., Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., 2017. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. *International Journal of Food Microbiology* 240, 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.024>
- Kure, C.F., Skaar, I., 2019. The fungal problem in cheese industry. Current Opinion in Food Science, Trends in sustainable food processing. *Food Mycology* 29, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H., 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 103, 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002>
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* 73, 219–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00640-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00640-7)
- Ludemann, V., 2004. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology* 96. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(04\)00132-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(04)00132-1)
- Luxo, C., Nobre, M.F., Costa, M.S. da, 1993. Intracellular polyol accumulation by yeastlike fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water stress (NaCl). *Canadian Journal of Microbiology* 39, 868–873. <https://doi.org/10.1139/m93-130>
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034>
- Malbaša, R.V., Lončar, E.S., Vitas, J.S., Čanadanović-Brunet, J.M., 2011. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chemistry* 127, 1727–1731. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.048>
- Marín, P., Palmero, D., Jurado, M., 2014. Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *International Dairy Journal* 36, 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.012>
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J.-L., Coton, E., 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology* 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Musa, H., Kasim, F.H., Nagoor Gunny, A.A., Gopinath, S.C.B., 2018. Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry*. 69, 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.026>
- Nevarez, L., Vasseur, V., Le Madec, A., Le Bras, M.A., Coroller, L., Leguérinel, I., Barbier, G., 2009. Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *International Journal of Food Microbiology* 130, 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.013>

- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology* 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J.-L., Mounier, J., Vasseur, V., 2021. Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International* 148, 110610. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>
- Nielsen, M.S., Frisvad, J.C., Nielsen, P.V., 1998. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *International Journal of Food Microbiology* 42, 91–99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00070-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00070-1)
- Pérez Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E., Druzhinina, I., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-cimerman, N., Zalar, P., Gostinčar, C., Kostanjsek, R., Folch-Mallol, J., Batista García, R., Sánchez, M., 2020. Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells* 9, 525. <https://doi.org/10.3390/cells9030525>
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1977. Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology* 101, 35–40. <https://doi.org/10.1099/00221287-101-1-35>
- Pitt, J.I., Miscamble, B.F., 1995. Water Relations of *Aspergillus flavus* and Closely Related Species. *Journal of Food Protection* 58, 86–90. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.1.86>
- Robinson, R.A., Stokes, R.H., 1965. *Electrolyte Solutions* 2d ed. Butterworth and Co., Ltd, London, p. 158.
- Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology* 63, 265–273. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00469-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00469-4)
- Schmidt, S.J., Fontana, A.J., 2008. Appendix E: Water Activity Values of Select Food Ingredients and Products, in: *Water Activity in Foods*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 407–420. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.app5>
- Sengun, I., Yaman, D., Gonul, S., 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal* 1-3, 291-298. <https://doi.org/info:doi/10.3920/WMJ2008.x041>
- Turk, M., Abramović, Z., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N., 2007. Salt stress and plasma-membrane fluidity in selected extremophilic yeasts and yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research* 7, 550–557. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00209.x>
- Turk, M., Méjanelle, L., Sentjurs, M., Grimalt, J., Gunde-cimerman, N., Plemenitas, A., 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles : life under extreme conditions* 8, 53–61. <https://doi.org/10.1007/s00792-003-0360-5>
- Wagner, L., Stielow, J.B., de Hoog, G.S., Bensch, K., Schwartze, V.U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., Walther, G., 2020. A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 44, 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Welsh, D.T., 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 263–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00542.x>

Zalar, P., Zupančič, J., Gostinčar, C., Zajc, J., de Hoog, G.S., De Leo, F., Azua-Bustos, A., Gunde-Cimerman, N., 2019. The extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* - a model for intraspecific hybridization in clonal fungi. *IMA Fungus* 10, 10. <https://doi.org/10.1186/s43008-019-0007-5>

Zidan, M.A., Abdel-Mallek, A.Y., 1987. Effect of NaCl on the accumulation of glycerol by three *Aspergillus* species. *Journal of Basic Microbiology* 27, 393–397. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620270713>

III. Références

- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcerro, A., Ramos, A. J., & Marín, S. (2012). Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.002>
- Casquete, R., Benito, M. J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A. I., & Martín, A. (2018). Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *Lwt*, 89(June 2017), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., & Selosse, M.-A. (2017). Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0030-2016>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., & Battilani, P. (2011). Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: Influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*, 4(4), 425–432. <https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1300>
- Gock, M. A., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Poulos, P. G. (2003). Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 11–19. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00166-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00166-6)
- Guinee, T. P. (2007). Salt in cheese. *Cheese Problems Solved*, 80–99. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.80>
- Guinee, Timothy P., & Fox, P. F. (2017). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Irlinger, F., Helinck, S., & Jany, J. L. (2017). Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00011-9>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966a). " *Scopulariopsis brevicaslis* " bainier, ou mieux " *Scopulariopsis fusca* " zach, agent des taches superficielles brun violettes des fromages à pâte molle. *Le Lait*, 46(455–456), 241–253. <https://doi.org/10.1051/lait:1966455-45612>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966b). *Cladosporium herbarum* link, agent tardif de "bleu" sur les fromages à pâte molle, et spécialement le Camembert. *Le Lait*, 458.
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966c). Etude d'un nouvel accident de " bleu" en fromagerie de Camembert. *Le Lait*, 46(459–460), 599–610. <https://doi.org/10.1051/lait:1966459-46024>
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002>
- Lasram, S., Hamdi, Z., Chenenaoui, S., Mliki, A., & Ghorbel, A. (2016). Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, water activity and carbon source. *Journal of Stored Products Research*, 69, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2016.06.002>

- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J. D., & Brugère, H. (1999). Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Medecine Veterinaire*, 150(5), 413–430.
- Leggieri, M. C., Decontardi, S., & Battilani, P. (2018). Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology*, 278(January), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Leggieri, M. C., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., & Battilani, P. (2016). Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signaled in cheese under different temperature and water activity regimes. *Toxins*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxins9010004>
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2014). Effect of solute and matric potential on growth rate of fungal species isolated from cheese. *International Dairy Journal*, 36(2), 89–94. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.01.012>
- Morin-Sardin, S., Nodet, P., Coton, E., & Jany, J. L. (2017). *Mucor*: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, 31(1), 12–32. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.002>
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J. L., & Coton, E. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., & Vasseur, V. (2017). Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology*, 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J. L., Mounier, J., & Vasseur, V. (2021). Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International*, 148(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>
- Northolt, M. D., Van Egmond, H. P., & Paulsch, W. E. (1978). Patulin Production by Some Fungal Species in Relation to Water Activity and Temperature. *Journal of Food Protection*, 41, 885–890. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-42.6.485>
- Northolt, M. D., Van EGMOND, H. P., & Paulsch, W. E. (1977). Differences Between *Aspergillus flavus* Strains in Growth and Aflatoxin B1 Production in Relation to Water Activity and Temperature. *Journal of Food Protection*, 40(11), 778–781. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-40.11.778>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Valík, L., Baranyi, J., & Görner, F. (1999). Predicting fungal growth: The effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1–2), 141–146. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00201-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00201-3)

Chapitre 3 : Impact du dioxyde de carbone sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier

I. Introduction

Afin de répondre aux demandes croissantes des consommateurs et poursuivre leur implication dans la démarche du « *clean label* », les industries agroalimentaires ont développé des méthodes alternatives pour conserver les produits alimentaires en limitant l'ajout d'additifs (notamment les conservateurs). L'emballage sous atmosphère modifiée est une méthode alternative utilisée pour ralentir, réduire ou inhiber le développement des microorganismes et donc augmenter la durée de vie des aliments. De nombreux produits alimentaires peuvent être conservés dans ce type d'emballage tels que la viande, les produits laitiers, les fruits et légumes (Khoshgozaran *et al.*, 2012; Phillips, 1996). Ces emballages contiennent généralement des pourcentages élevés de CO₂ et faibles en O₂. Le mélange gazeux peut être modifié en fonction du type d'aliment conservé.

Déjà évoqué précédemment, l'impact des mélanges gazeux sur le développement fongique n'a pas fait l'objet de nombreuses études. La quantité de données disponibles est beaucoup plus faible par rapport aux études réalisées sur la température et l' a_w (Abellana *et al.*, 2000). Toutefois, quelques données sont disponibles pour des espèces emblématiques d'intérêt technologique ou d'altération rencontrées dans l'environnement laitier telles que *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti* ou encore *Aspergillus flavus* (Doyon *et al.*, 1997; Nguyen Van Long and Dantigny, 2016; Taniwaki *et al.*, 2010, 2009, 2001). Dans la majorité des études disponibles, l'augmentation du CO₂ entraîne une diminution de la prolifération mycélienne et de la production de mycotoxines. En revanche, comme dans le cas de l' a_w , d'autres espèces moins emblématiques comme *Cladosporium herbarum*, *Penicillium bialowiezense* et *Scopulariopsis asperula* n'ont pas fait l'objet d'études alors qu'il a été rapporté que ces espèces sont impliquées dans l'altération des produits laitiers (Garnier *et al.*, 2017; Jacquet and Desfleurs, 1966a, 1966b, 1966c; Le Bars-Bailly *et al.*, 1999; Pitt and Hocking, 2009).

Une étude monofactorielle est généralement réalisée afin de comprendre l'effet d'un facteur abiotique sur la physiologie des microorganismes. Dans ce cas, le facteur étudié est maintenu à un niveau constant tout au long de l'expérience. Par exemple, l'étude de l'effet de l'activité de l'eau (a_w) est réalisée par l'acquisition de cinétiques de germination des spores ou de croissance du mycélium à différents niveaux d' a_w . Au cours de chacune de ces cinétiques, l' a_w du milieu de culture reste stable. Malheureusement, maintenir un niveau de gaz de l'espace de tête statique est plus complexe. En effet, la majorité des matériaux sont perméables aux gaz et la respiration des moisissures peut impacter la composition du mélange gazeux avec une consommation d'O₂ et une production de CO₂. L'étude de l'impact des mélanges gazeux nécessite le développement de dispositifs expérimentaux spécifiques. Dans le cadre de la thèse, un nouveau dispositif expérimental a été développé pour l'acquisition des données. Ce dispositif permet d'éviter les variations de composition du mélange gazeux liées aux phénomènes cités précédemment. Le mélange gazeux est renouvelé régulièrement de façon à ce qu'il soit

maintenu stable au cours du temps. Une description détaillée du développement méthodologique est donnée dans le paragraphe « III. Mise au point du dispositif expérimental » car elle n'a pas été incluse dans l'article scientifique.

L'objectif de cette étude est de répondre à la question : « Quel est l'impact du dioxyde de carbone sur la croissance radiale des moisissures rencontrées dans l'environnement laitier ? ». Cette étude a été divisée en quatre étapes qui ont consisté à : (i) développer un nouveau dispositif expérimental permettant d'étudier la croissance radiale des moisissures en milieu solide et en présence de CO₂, (ii) mesurer la croissance radiale pour 14 souches appartenant à 14 espèces isolées dans un environnement laitier et (iii) utiliser des modèles mathématiques pour décrire la réponse des moisissures à l'augmentation du pourcentage de CO₂ et (iv) réaliser une classification des moisissures en fonction de la réponse observée.

II. Impact of carbon dioxide on the radial growth of fungi in a dairy environment

Article soumis au journal *Food Microbiology*.

Valle Marion ^{a,b}, Nguyen Van Long Nicolas ^b, Jan y Jean-Luc ^a, Koullen Loona ^a, Couvert Olivier ^a, Huchet Véronique ^b, Coroller Louis ^a

^a Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

***Corresponding authors**

Mailing Adress: Louis Coroller, Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

E-mail: louis.coroller@univ-brest.fr

Highlights

- The impact of carbonic acid on fungal growth was studied and modeled
- Fungal growth was inhibited by increasing the carbonic acid concentration
- *Mucor lanceolatus* was the least sensitive strain to CO₂
- *Geotrichum candidum* and *Mucor circinelloides* were sensitive to H₂CO₃
- Fungal growth could be improved at a low CO₂ percentage

Abstract

In dairy industry, filamentous fungi are used as adjunct cultures in fermented products for their technological properties but they could also be responsible for food spoilage and mycotoxin production. The consumer demands about free-preservative products has increased in recent years and lead to develop alternative methods for food preservation. Modified Atmosphere Packaging (MAP) can inhibit fungal growth and therefore increase the food product shelf-life. This study aimed to evaluate radial growth as a function of CO₂ and more particularly carbonic acid for fourteen adjuncts and/or fungal spoiler isolated from dairy products or dairy environment by using predictive mycology tools. The impact of the different chemical species linked to CO₂ (notably carbonic acid) were study because it was reported previously that undissociated carbonic acid impacted bacterial growth and bicarbonates ions were involved in modifications of physiological process of fungal cells. A significant diversity in the responses of selected strains was observed. *Mucor circinelloides* had the fastest growth rates ($\mu > 11$ mm.day⁻¹) while *Bisifusarium domesticum*, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium bialowiezense* had the slowest growth rates ($\mu < 1$ mm.day⁻¹). Independently of the medium pH, the majority of strains were sensitive to total carbonic acid. In this case, it was not possible to conclude if CO₂ active form was gaseous or aqueous so modeling were performed as a function of CO₂ percentage. Only *Geotrichum candidum* and *M. circinelloides* strains were sensitive to undissociated carbonic acid. Among the fourteen strains, *P. bialowiezense* was the less sensitive strain to CO₂, no growth was observed at 50% of CO₂ only for this strain. *M. lanceolatus* was the less sensitive strain to CO₂, the CO₂ 50 which reduce the growth rates by 50% was estimated at 138% of CO₂. Low CO₂ percentage improved the growth of *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti* and *Paecilomyces niveus*. Mathematical models (without and with optimum) were suggested to describe the impact of CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration on fungal growth rate.

Keywords

modified atmosphere, carbon dioxide, carbonic acid, mycelial growth, predictive mycology

1. Introduction

In the dairy industry, several fungal species, such as *Bisifusarium domesticum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor lanceolatus*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, and *Scopulariopsis asperula*, are used as starter cultures to make cheeses (Dupont et al., 2017; Ropars et al., 2020). These fungi contribute to the organoleptic properties of fermented products. In soft cheeses (Camembert and Brie), the proteolytic and lipolytic activities of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* lead to the production of volatile compounds such as ketones, alcohols, esters, aldehydes, lactones and other compounds that influence the flavor of cheeses (Molimard and Spinnler, 1996; Spinnler, 2004). *Bisifusarium domesticum* is used to prevent excessive stickiness of the surface of Raclette and Gruyère cheeses (Bachmann and Fuerst, 2003; Bachmann et al., 2005; Savary et al., 2021).

Nonetheless, yeasts and molds can also spoil dairy products, especially cheeses (Garnier et al., 2017b; Kure and Skaar, 2019). Airflows in the food processing environment represent one of the major sources of contamination; these contribute to the dissemination of fungal spores, which could then be deposited on food surfaces, equipment, raw materials or workers (Bernardi et al., 2019; Kure and Skaar, 2019). Good manufacturing hygiene practices and air-renewal or filtration systems could reduce fungal spoilage and thus food losses and waste (Dagnas and Membré, 2013; Garnier et al., 2017a). The main fungal spoilers of cheeses belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* (Kure and Skaar, 2019). These fungi can alter the organoleptic properties of products and some species produce mycotoxins: compounds toxic for humans, even at low concentrations. Aflatoxin M1 and ochratoxin A are the most hazardous mycotoxins found in cheeses (Hymery et al., 2014). Mycotoxins do not have the same stability through the food chain since some of them, such as cyclopiazonic acid, may be able to resist industrial processing and remain stable, whereas others, such as patulin, break down in the cheese matrix (Kure and Skaar, 2019; Sengun et al., 2008).

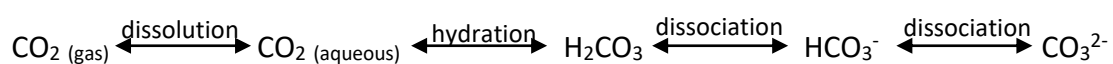
Abiotic factors can be used to prevent fungal spoilage and to extend food shelf life. Temperature and water activity (a_w) are recognized as the main efficient factors to control fungal development (Dagnas and Membré, 2013). It is relatively easy to study both (using a programmed incubator and culture

media containing an a_w depressor, respectively), so they have been extensively documented in the literature (Abellana et al., 2000). By contrast, only a few studies have been performed to determine the impact of a gas atmosphere on fungal development because, among other reasons, it is difficult to achieve the acceptable experimental conditions, i.e., accurate and stable gas headspace for fungal respiration and experimental apparatus permeability or gas dissolution in the culture medium. For example, previous studies have been performed with adapted plastic bags (Nguyen Van Long et al., 2017b; Taniwaki et al., 2001), flasks (Hoogerwerf et al., 2002), anaerobic jars (Taniwaki et al., 2010, 2009) or other systems (Giorni et al., 2008; Magan and Lacey, 1984) that were continuously or regularly flushed to maintain a constant gas mixture.

In order to respond to changes in food legislation or new consumer demands, such as for fewer chemical compounds in food, the food industry has developed alternative techniques for food preservation (Abellana et al., 2000). Modified atmosphere packaging (MAP) is one of these alternative methods, which consists in storing a product within a packaging generally containing low oxygen (O_2) and high carbon dioxide (CO_2) concentrations, with a balanced nitrogen (N_2) level, thereby limiting microbial growth (Khoshgozaran et al., 2012; Kirtil et al., 2016; Phillips, 1996). Fruits, vegetables, cheese, meat, fish, poultry and bakery products can be packaged in MAP with a gas composition adapted to the product and its sensitivity to the gas.

An increase in CO_2 leads to an increase in carbonic acid in the studied matrix (Couvert et al., 2017). CO_2 can be dissolved in the aqueous phase of the food matrix or culture medium this phenomenon depends on the temperature and pH. After this step, the hydration of CO_2 leads to the formation of carbonic acid (H_2CO_3), which could undergo a pH-dependent dissociation into H^+ and HCO_3^- ions. Then, the dissociation of HCO_3^- leads to the formation of CO_3^{2-} and H^+ . The successive equilibria between different chemical species are represented in the diagram

below (Couvert et al., 2017):



It has been suggested that CO₂ and its derivatives whose undissociated carbonic acid (H₂CO₃) seemed to inhibit bacterial growth (Couvert et al., 2017) and the dissociated carbonic acid (notably bicarbonate ions HCO₃⁻) are responsible for modifying several fungal cellular processes (Daniels et al., 1985; Dixon and Kell, 1989; Stretton and Goodman, 1998; Yu and Chen, 2019); therefore, it is assumed that carbonic acid is also responsible for the fungistatic or fungicidal effect of CO₂ used in MAP. Thus, the accuracy of fungal growth prediction could be improved by taking this factor into account in predictive mycology. To the best of our knowledge, no data regarding the impact of carbonic acid on fungal growth are available in the published literature.

The current study assessed the effect of CO₂ and, more specifically, of carbonic acid on the radial growth of fourteen starters and/or filamentous spoiler fungi encountered in the dairy industry. The diversity of the radial growth response to MAP conditions was studied with fungi isolated from dairy environment in order to help prevent the fungal spoilage of dairy products or to improve the colonization of cheeses by starters. To this end, an experimental apparatus was developed for data acquisition in static MAP conditions and a predictive mycology approach was used to determine the impact of carbonic acid on the fungal growth of the selected strains.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains

Fourteen fungal strains belonging to different species were selected based on their importance in dairy products or the dairy environment (Table 1). All strains and related information were provided by the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection ([UBOCC], Plouzané, France). Each strain was genetically identified by rDNA ITS sequencing. Additional sequencing of the cyclopropane fatty-acyl-phospholipid synthase (CFAS) encoding gene was performed to identify UBOCC-A-109153, since the *Mucor circinelloides* complex was recently resolved into distinct species using a CFAS marker (Wagner et al., 2020) (GenBank accession number: OK560012, data not shown).

Table 1. List of the fungal strains used in the present study. UBOCC = Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (University of Western Brittany [UBOCC], Plouzané, France). Type of isolate (spoilage or technological adjunct) was specifically defined for each strain depending on the isolation conditions.

Fungal species	Strain Collection number (UBOCC)	Substrate of origin	Type of isolate
<i>Aspergillus flavus</i>	UBOCC-A-108066	butter	Spoiler
<i>Cladosporium herbarum</i>	UBOCC-A-108074	cheese	Spoiler
<i>Bisifusarium domesticum</i>	UBOCC-A-113010	cheese (crust)	Adjunct
<i>Geotrichum candidum</i>	UBOCC-A-113018	dairy environment	Adjunct
<i>Mucor circinelloides</i>	UBOCC-A-109182	dairy environment	Spoiler
<i>Mucor lanceolatus</i>	UBOCC-A-109153	dairy environment	Adjunct
<i>Paecilomyces niveus</i>	UBOCC-A-110204	cow milk	Spoiler
<i>Penicillium bialowiezense</i>	UBOCC-A-110007	fresh dairy product	Spoiler
<i>Penicillium expansum</i>	UBOCC-A-110032	fresh cheese	Spoiler
<i>Penicillium fuscoglaucum</i>	UBOCC-A-113012	dairy environment	Spoiler
<i>Penicillium nalgiovense</i>	UBOCC-A-113013	cheese (crust)	Adjunct
<i>Penicillium roqueforti</i>	UBOCC-A-113014	cheese	Adjunct
<i>Penicillium solitum</i>	UBOCC-A-113015	dairy environment	Spoiler
<i>Scopulariopsis asperula</i>	UBOCC-A-113016	dairy environment	No information

2.2. Conidia production

First, conidia were harvested with sterile water containing Tween 80 at 0.01% (v/v) from cultures obtained on potato dextrose agar (PDA, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA, pH 5.6, 0.995 a_w) after a 7-day incubation period at 25°C in the dark. Then, the spore suspension of each strain was used to inoculate Roux flasks containing 125 mL of PDA. After a new incubation period at 25°C (7 days except for *Paecilomyces niveus* and *Scopulariopsis asperula*, which require 14 days), the spores were harvested by flooding the culture with sterile water containing Tween 80 at 0.01% (v/v) and 15% glycerol (W/W). Glass beads (Dominique Dutscher, Brumath, France) were also added to improve the harvest by gently shaking the flasks. The conidial concentration of each strain was estimated using a hemocytometer (Malassez, Préciss, Paris, France) before storage at -80°C.

2.3. Growth media

In MAP conditions, when an agar medium is exposed to gaseous CO₂, this leads to a decrease in pH due to the dissociation of carbonic acid. This phenomenon is dependent on the initial pH and temperature; it was reported that the dissolution of CO₂ in water is favored at low temperature and high pH (Couvert et al., 2017). For the present work, it was important to limit this phenomenon as much as possible in order to maintain a monofactorial study design. Preliminary tests were performed on the selected strains to evaluate the impact of temperature and pH on fungal growth to find a compromise between negligible carbonic acid dissolution and optimal temperature and pH levels (data not shown). The optimal temperature for growth was between 20°C and 30°C depending on the strain. A pH value of 4.7 did not have a significant effect on the growth of the selected strains, except for *S. asperula* for which the radial growth was decreased by two-fold. Therefore, the selected experimental conditions for all strains were 25°C and pH 4.7 in order to limit CO₂ dissolution, except for *S. asperula* for which a pH of 7.0 was used.

The pH of the culture media was adjusted based on a previous study (Couvert et al., 2017). Briefly, the pH of the culture media was adjusted with an HCl solution (0.1 M) to reach a pH of 4.7 when exposed to the modified atmosphere. For *S. asperula*, the pH of the culture media was adjusted with a NaOH solution (0.5 M) to reach a pH of 7.0 when exposed to a modified atmosphere.

For each experiment, six Petri dishes containing culture media without conidia were exposed to the modified atmosphere to verify the initial pH of the culture media and its stability over time. The pH of three Petri dishes was measured after about two days of exposure to the modified atmosphere and the pH of the three other Petri dishes was measured at the end of each experiment.

2.4. Medium inoculation

A new frozen aliquot of the strains was used for each CO₂ partial pressure. The conidia suspensions were diluted down to 10⁶ conidia/mL in sterile water containing Tween 80 at 0.01% (v/v). Then, 10 µL of the standardized conidia suspension was deposited on the medium in the center of the Petri dishes

(four technical replicates) containing 22 mL of culture medium. The Petri dishes were sealed with Parafilm that we poked holes in to improve the gas diffusion whilst limiting spore dispersion. The Petri dishes were incubated in the experimental device at 25°C for a maximum duration of 70 days.

2.5. Gas mixture, experimental device and radial growth assessment

Eight partial pressures of CO₂ (I5100M14R0A000 carbon dioxide, Air Liquide S.A. Paris, France) were tested: 0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6 and 0.7 bar (corresponding to 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70% of CO₂) with the O₂ partial pressure maintained at 0.05 bar (5% of O₂) and complemented with N₂ (I4001M20R2A000 nitrogen, Air Liquide S.A. Paris, France). All gas mixtures were performed in scuba tanks (18 L, 230 bars, Aqualung, Carros, France).

The Petri dishes were placed in a desiccator (25.4 x 33.8 x 35.6 cm) that was used as a modified atmosphere cabinet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) connected to a scuba tank containing the gas mixture. An electronic system (Arduino card) (506-7187, RS Components SAS, Beauvais, France) combined with solenoid valves (370-0078, RS Components SAS, Beauvais, France) was developed to regularly renew the gas mixture in the modified atmosphere cabinet by injecting 18 liters of gas mixture each hour. The gas mixture in the modified atmosphere cabinet was monitored daily with a gas analyzer (Vigaz canal 120-II, VISCIANO, Saint Genis Pouilly, France). A vessel with water was placed inside the modified atmosphere cabinet to keep the relative humidity stable and to limit desiccation of the agar plate.

To measure the thallus diameters, the cabinet was removed from the incubator and placed in a Captair Pyramid portable glove bag (Erlab, Val-de-Reuil, France). The glove bag was flushed three times with the tested gas mixture (approximately 36 liters of gas mixture per flush). Then, the cabinet was opened in the glove bag to measure the thallus diameters, which was done in two directions using a precision decimeter.

2.6. Determination of dissolved carbonic acid concentration

In the 4.0–7.0 pH range, it is assumed that CO₂ is partially dissolved in water, forming carbonic acid (H₂CO₃), which dissociates into HCO₃⁻ and H⁺ (pKa = 6.37). For a pH of 4.7, the dissociation of HCO₃⁻ into CO₃²⁻ and H⁺ is negligible, explaining why HCO₃⁻ was taken into account, whereas CO₃²⁻ was not. The

total concentration of carbonic acid was determined by calculating the difference of the HCl concentration in the culture medium between the control condition (C_{medium} at 0% of $CO_2 = 0.9$ mM HCl) and the tested condition (C_{medium} at x% of CO_2) using the following equation (Equation 1):

$$C_{solution}V_{added} = C_{medium}V_{medium} \quad (1)$$

where $C_{solution}$ is the concentration of the added HCl solution (= 0.1 M), V_{added} is the volume of HCl solution added to reach a pH of 4.7 at equilibrium when the culture medium is exposed to the tested gas mixture, and C_{medium} is the concentration of HCl per liter (= V_{medium}) of culture medium.

Equation 2 (Gorman, 1973) was used to determine the undissociated carbonic acid concentration (Equation 2):

$$[\text{undissociated carbonic acid}] = \frac{[\text{total carbonic acid}]}{1 + 10^{pH-pKa}} \quad (2)$$

where $[\text{total carbonic acid}]$ corresponds to the total carbonic acid concentration determined above, $pH = 4.7$ and $pKa = 6.37$ (Couvert et al., 2017). The dissociated carbonic acid concentration was then determined by calculating the difference between the total carbonic acid concentration and the undissociated carbonic acid concentration. All concentrations are given in the Supplementary Data.

To determine the active form of carbonic acid (dissociated, undissociated or total carbonic acid), supplementary data were acquired at a second pH close to pH 7.0 or 7.3 (except for *S. asperula*, studied only at pH 7.0). The concentration of all carbonic acid forms was determined as explained above. All concentrations are reported in the Supplementary Data.

2.7. Data treatment and statistical analyses

2.7.1. Radial growth modelling

The size of the radial thallus ($r(t)$, mm) was modeled as a function of the incubation time (t , days), as previously described using a primary model (Dagnas and Membré, 2013; Nguyen Van Long et al., 2017a; Valle et al., 2022), to estimate the primary parameters (Equation 3):

$$r(t) = \begin{cases} r_{(0)} + \varepsilon_i & \text{if } t \leq \lambda \\ r_{(0)} + \mu \cdot (t - \lambda) + \varepsilon_i & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (3)$$

where $r_{(t)}$ is the thallus radius (mm), t is the incubation time (days), λ is the latency (days) and μ is the radial growth rate (mm.day⁻¹) and ε_i is the residual error. In this study, the radius $r_{(0)}$ was fixed at 3 mm which corresponded to the size of the deposited drop.

2.7.2. Modelling the effect of CO₂ or undissociated carbonic acid concentration on the radial growth primary parameters

The radial growth rate (μ , mm.day⁻¹) was modeled as a function of CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration. The following equation (Presser et al., 1997) was used to describe the growth response to CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration (Equation 4):

$$\sqrt{\mu(CO_2)} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMP1_n(CO_2)} + \varepsilon_{ii}$$

$$CMP1_n(CO_2) = \left(1 - \frac{CO_2}{MIC}\right)^\alpha \text{ with } CO_{2\ 50} = MIC * \left(\frac{1}{2}\right)^{1/\alpha} \quad (4)$$

where $CO_{2\ 50}$ is the CO₂ percentage when $\mu = \mu_{opt}/2$ (i.e., the CO₂ percentage which reduces the growth rate by 50%). CO₂ percentage could be replaced by [undissociated carbonic acid] corresponding to the undissociated carbonic acid concentration and $CO_{2\ 50}$ could be replaced by [undissociated carbonic acid]₅₀ corresponding to the concentration of undissociated carbonic acid which reduces the growth rate by 50%. MIC is the lowest CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration from which there is no growth ($\mu = 0$ mm.day⁻¹). The radial growth rate, μ , was estimated with Equation (3), μ_{opt} is the value of μ when CO₂ percentage or the undissociated carbonic acid concentration is equal to 0, α is a shape parameter and ε_{ii} is the residual error.

A supplementary parameter was added to Equation 4 when an optimal CO₂ percentage value for the growth was observed, i.e., the growth was increased by a low concentration of CO₂ percentage (Equation 5):

$$\sqrt{\mu(CO_2)} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMP2_n(CO_2)} + \varepsilon_{ii}$$

$$CMP2_n(CO_2) = \left(1 - \frac{CO_2 - CO_{2\ opt}}{MIC}\right)^\alpha \text{ with } CO_{2\ 50} = CO_{2\ opt} + MIC * \left(\frac{1}{2}\right)^{1/\alpha} \quad (5)$$

where all parameters are the same as in Equation 4, and CO_2_{opt} is CO_2 percentage at which the fastest growth is observed (μ_{opt}).

2.7.3. Statistical analysis

2.7.3.1. Determination of the form of carbonic acid that affects fungal growth

To assess which carbonic acid form (undissociated, dissociated or both) affects fungal growth, two ratios of two μ obtained at pH 4.7 and pH 7.0 or 7.3 were calculated:

$$R = \frac{\mu_{pH\ 4.7} [Carbonic\ acid]}{\mu_{pH\ 7.0\ or\ 7.3} [Carbonic\ acid]} = \frac{\gamma_{pH\ 4.7} \cdot \gamma_{\% CO_2} (Carbonic\ acid)}{\gamma_{pH\ 7.0\ or\ 7.3} \cdot \gamma_{\% CO_2} (Carbonic\ acid)}$$

One ratio is calculated for the control condition at 0% of CO_2 and $0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ irrespective of the form considered. The second ratio is calculated for another carbonic acid concentration corresponding to the concentration obtained at pH 7.0 and 50% of CO_2 (i.e. 0.5 bar) for *Aspergillus flavus*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti* and *Mucor circinelloides*, or at pH 7.3 and 30% of CO_2 (i.e. 0.3 bar) for the other strains (*Scopulariopsis asperula* was not tested). Many concentration values were acquired at pH 4.7 and, therefore, the closest tested concentration to the one obtained at a pH of 7.0 or 7.3 was used to calculate the R ratio. Following the gamma concept (Zwietering et al., 1992), the effect of each factor has an independent and multiplicative effect on growth and is reflected by its γ value, which ranges from 0 to 1. Not taking the interactions between the effect of the pH and the effect of carbonic acid into account, the ratio calculated from the μ values at different pH values should be constant regardless of the level of carbonic acid, i.e., the ratio calculated from the μ values obtained without carbonic acid should be close to the ratio calculated from the μ values with an acid carbonic concentration. In most cases, growth is inhibited at pH 4.7 compared to pH 7.0 or 7.3; the ratio is then lower than 1.0. If the ratio is conserved for one carbonic acid form, this means that this form plays a major role in the physiological inhibition mechanism. If the ratios are different, this means that the form of the acid is not meaningful or that the weight of the interaction is high. In the tested range of pH and CO_2 percentage values, it is expected that there will be no or only a low interaction between

the pH and the carbonic acid. On the resulting graphs, we should see a change in the growth rate due to the effect of the pH.

2.7.3.2. Data modelling

The models were fitted by minimizing the sums of squares of the residuals (*lsqcurvefit* function, MATLAB 2018, The Mathworks Inc., USA). Linear approximations and calculations were performed to estimate the confidence intervals with a risk $\alpha = 0.05$ (*nlparci* function of MATLAB). The fitting performances of the models were evaluated based on the root mean square error (RMSE).

To validate the presence of an optimal CO₂ percentage value for radial growth, the growth rate data were fitted with the two secondary models described above. To find the most appropriate model, the fitting performances were compared using the Akaike information criterion (AIC) and the RMSE.

3. Results

3.1. Effect of CO₂ on radial growth kinetics

A latency phase was observed before the formation of a visible thallus for all the tested strains. The duration of the latency phase varied among the tested strains and with the CO₂ percentage. The higher the percentage of CO₂, the longer the latency phase for most strains. *Mucor circinelloides* had the shorter latency phase compared with other strains such as *Bisifusarium domesticum*, *Cladosporium herbarum* or *Penicillium bialowiezense*. After the initial latency phase, the increase in the thallus radius was linear, which made it possible to estimate μ . When the latency phase was longer than the experiment duration, i.e., there was no visible growth at the end of the incubation period, μ was not estimated. However, the latency phase was not always satisfactorily estimated; this could impact the secondary modeling estimations. For these reasons, only the radial growth rate values were used for the secondary modeling.

3.2. Determination of the active forms of carbonic acid that impact radial growth rate (μ)

To determine which form of carbonic acid had an impact on the growth rate, we compared the growth rate ratios obtained at pH 4.7 and pH 7.0 or 7.3 for i) no carbonic acid or ii) a given concentration of the carbonic acid form (undissociated H₂CO₃, dissociated HCO₃⁻, or total) corresponding to a gas mixture including either 50% or 30% of CO₂. Several ratios were calculated and are reported in Table 2.

The ratios obtained for dissociated carbonic acid are not reported because the values were very high compared with the undissociated and total carbonic acid ratios. The dissociated form alone could not explain the growth inhibition. Figure 1 shows the results for some strains to illustrate how the carbonic acid form was selected. For *Geotrichum candidum*, the R ratio at 0% of CO₂ was closer to the R ratio at 50% of CO₂ for the undissociated carbonic acid form than with the total carbonic acid form (Table 2 and Figure 1 a to c). For this strain, the undissociated form of carbonic acid impacted radial growth so CO₂ was active in the aqueous form that why undissociated carbonic acid was selected for the modeling. In *Penicillium solitum*, on the contrary, the R ratio at 0% of CO₂ was closer to the R ratio at 30% of CO₂ for total carbonic acid than with the undissociated carbonic acid (Table 2 and Figure 1 d to f). For this strain, the total carbonic acid impacted radial growth and it was not possible to conclude if CO₂ was active in gaseous or aqueous form so modeling were not performed as a function of total carbonic acid concentration but with CO₂ percentage. The same method was used to determine the active form of carbonic acid for each of the strains. The selected form of carbonic acid for each strain is given in Table 2.

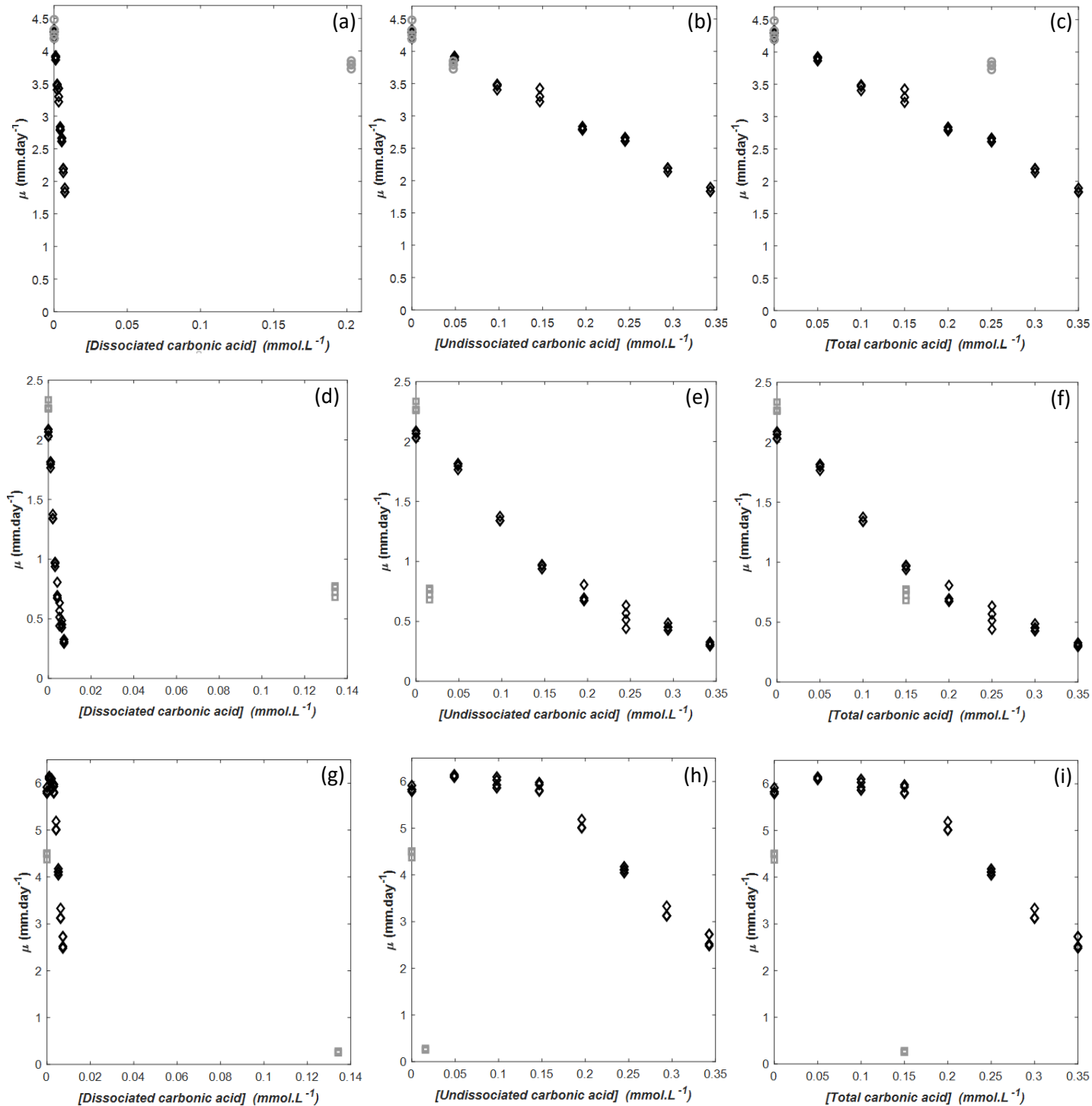


Figure 1. Influence of carbonic acid concentrations on the radial growth rate (μ_{max}) of *G. candidum* (a, b, c), *P. solitum* (d, e, f) and *P. niveus* (g, h, i) incubated at 25°C, on PDA medium adjusted at two pHs: 4.7 (\diamond) and 7.0 (\circ) or 7.3 (\square). The growth rate was represented as a function of dissociated acid concentration (a, d, g), undissociated acid concentration (b, e, h) or total carbonic acid concentration (c, f, i).

Table 2. Results of R ratios to determine what form of carbonic acid impacted fungal growth.

Fungal species	R = $\frac{\text{mean } \mu \text{ at pH } 4.7}{\text{mean } \mu \text{ at pH } 7.0 \text{ or } 7.3 \text{ (depended on the strain)}}$			Form selected for modelling
	Without carbonic acid	Undissociated carbonic acid	Total carbonic acid concentration	
<i>A. flavus</i>	0.97	3.05	1.48	Total carbonic acid
<i>B. domesticum</i>	0.48	1.39	0.40	Total carbonic acid
<i>C. herbarum</i>	0.95	2.05	0.85	Total carbonic acid
<i>G. candidum</i>	0.99	1.03	0.70	Undissociated carbonic acid
<i>M. circinelloides</i>	1.12	0.90	0.59	Undissociated carbonic acid
<i>M. lanceolatus</i>	0.66	0.61	0.59	Not possible to conclude
<i>P. niveus</i>	1.31	22.27	22.42	Not possible to conclude
<i>P. bialowiezense</i>	0.73	2.81	1.21	Total carbonic acid
<i>P. expansum</i>	0.76	2.07	1.04	Total carbonic acid
<i>P. fuscoglaucum</i>	0.97	2.52	1.42	Total carbonic acid
<i>P. nalgiovense</i>	0.85	1.40	0.76	Total carbonic acid
<i>P. roqueforti</i>	0.90	2.00	1.51	Total carbonic acid
<i>P. solitum</i>	0.90	2.79	1.31	Total carbonic acid
<i>S. asperula</i>	Only one pH (7.0) was tested			Not possible to conclude

For *Paecilomyces niveus*, pH had a significant impact and it was, therefore, difficult to determine the carbonic acid active form (Table 2 and Figure 1 g to i). A similar phenomenon was observed for *Mucor lanceolatus*. In addition, it was not possible to acquire data at pH 4.7 for *Scopulariopsis asperula* because this pH value reduced the growth rate by more than 50% and sporulation was completely inhibited. For this strain, the data acquisition for the modeling was only performed at pH 7.0. Given the wide diversity of strains studied in this work, it was difficult to select one single pH that was optimal for all strains. Consequently, for the three strains mentioned above (*P. niveus*, *M. lanceolatus* and *S. asperula*), it was decided to keep the CO₂ percentage for the modeling.

These experiments allowed us to classify the different strains into four groups depending on their response and the active form of carbonic acid: 1) strains moderately sensitive to total carbonic acid, 2) strains the most sensitive to total carbonic acid, i.e., with observation of a growth limit in the experimental range of tested values, 3) strains for which it was not possible to conclude what carbonic acid form was active, and 4) strains sensitive to undissociated carbonic acid.

3.3. Effect of CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration on radial growth rate (μ)

Six strains (*Aspergillus flavus*, *Penicillium fuscoglaucum*, *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium solitum*, *Penicillium expansum* and *Penicillium roqueforti*) were moderately sensitive to the total carbonic acid so CO₂ percentage was used for modeling. The CO₂₅₀ corresponding to the CO₂ percentage which reduces the growth rate by 50% was estimated above 24% for all strains of this group (Table 3). Data fitting was performed using the CMP1 model without an optimal CO₂ percentage for four strains and using the CMP2 model with an optimal CO₂ percentage for two strains (see Table 3 and Figure 2). For *A. flavus*, modification of the CO₂ percentage had the same effect irrespective of the tested range, and the shape parameter α was estimated to be close to 1 (Table 3 and Figure 2 a). For *P. fuscoglaucum*, *P. nalgiovense* and *P. solitum*, an increasing CO₂ percentage had a higher effect at a low concentration, and the estimated shape parameter α was under 0.75 (Table 3 and Figure 2 b to d). For *P. expansum* and *P. roqueforti*, an optimal CO₂ percentage value was observed for growth, the data fitting was performed with the CMP2 model for both strains (Table 3 and Figure 2 e and f). For *P. expansum*, the

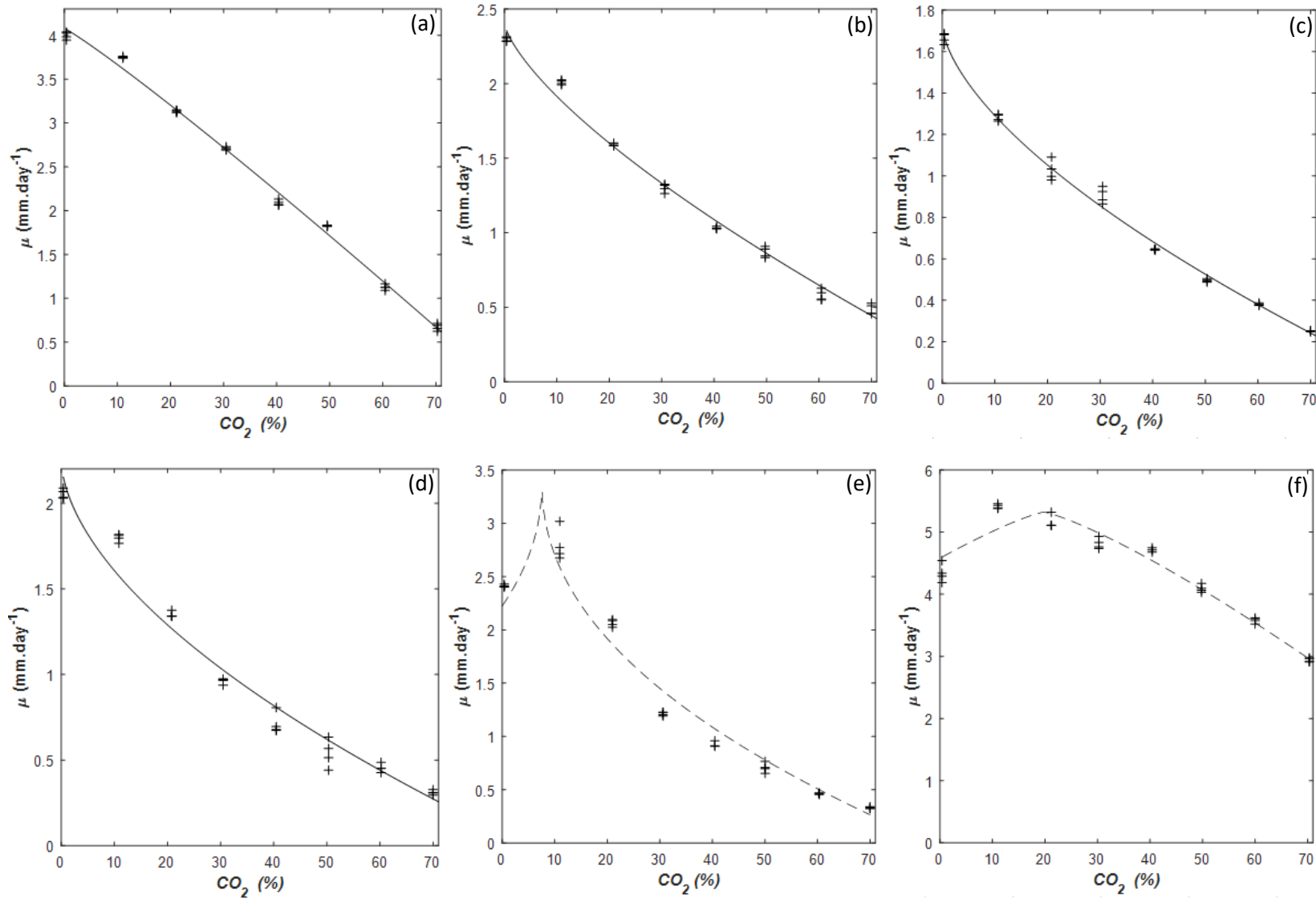
shape parameter α was estimated to be 0.46 ± 0.02 . This value was low and, therefore, meant that μ_{opt} was overestimated. This phenomenon was probably due to the limited number of data under the optimal value. Consequently, the μ_{opt} of *P. expansum* was fixed at $3.40 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$ so that the data could be fit with the CMP2 model. Without this constraint, convergence was not possible. *Penicillium fuscoglaucum*, *P. nalgiovense* and *P. solitum* grew less well than the other strains with an estimated μ_{opt} under $2.50 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$. *Penicillium roqueforti* grew faster than the other strains with an estimated μ_{opt} above $5 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$. In addition, it was the least sensitive strain of this group to CO_2 percentage with an estimated $\text{CO}_{2\ 50}$ percentage that reduces the growth rate by 50% of $75.38 \pm 1.79 \%$, whereas for the five other strains, this value was estimated under 45% of CO_2 .

Bisfusarium domesticum, *Cladosporium herbarum* and *Penicillium bialowiezense* were the most sensitive strains to total carbonic acid with an observed growth limit so CO_2 percentage was used for modeling. The MIC was under or equal to 70% CO_2 (Figure 2, Table 3) and no optimal CO_2 percentage was observed, the data were fit with the CMP1 model. These strains had a low growth potential with an estimated μ_{opt} value under $1 \text{ mm}\cdot\text{day}^{-1}$. *Penicillium bialowiezense* was the most sensitive of the three strains with no growth observed at 50% of CO_2 after 70 days. For this strain, the shape parameter α was estimated above 1 that why the curve had a concave form (Table 3, Figure 2 i). By contrast, *B. domesticum* and *C. herbarum* were more sensitive to a low CO_2 partial pressure, with a shape parameter α estimated to be under 0.70 and a curve with a convex form (Table 3, Figure 2 g and h). For *B. domesticum* and *C. herbarum*, no growth was observed only at 70% of CO_2 after 70 days. The $\text{CO}_{2\ 50}$ was estimated to be $12.56 \pm 3.67 \%$ for *B. domesticum* and above 20% of CO_2 for both others strains with the values of 22.60 ± 2.65 and 29.53 ± 0.88 for *C. herbarum* and *P. bialowiezense* respectively.

It was not possible to determine the active form of carbonic acid for three strains: *Mucor lanceolatus*, *Paecilomyces niveus* and *Scopulariopsis asperula* (Table 3). Data acquisition for *S. asperula* was not performed at pH 4.7 because the growth rate was reduced by more than 50% at pH 5.3 (classical PDA medium). Therefore, data was only acquired at pH 7.0 for this strain. As discussed above, the impact of pH on the growth of the three strains was significant and as a result, it was not possible to draw a

conclusion. Consequently, we proposed to keep the CO₂ percentage to fit the data of these strains. Regardless of the range of the CO₂ percentage, the same amount of CO₂ reduced the growth rate of both *M. lanceolatus* and *S. asperula* by the same amount (CMP1 model with a shape parameter α close to 1 (Table 3 and Figure 2 j and l). The CMP2 model was used for to model *P. niveus*; an optimum was observed for this strain. Moreover, this strain was sensitive to a high CO₂ percentage given that the shape parameter α was estimated to be 1.31 ± 0.12 (Table 3 and Figure 2 k). The growth of both *P. niveus* and *M. lanceolatus* was quite high ($\mu_{opt} = 6.34 \pm 0.12$ mm.day⁻¹ and 3.78 ± 0.07 mm.day⁻¹, respectively), compared to the growth of *S. asperula* ($\mu_{opt} = 1.50 \pm 0.02$ mm.day⁻¹). Among these three strains, *M. lanceolatus* was the least sensitive to the CO₂ percentage. CO₂ 50 was estimated to be 138.25 ± 21.35 %. This value was more than three times and two times higher than those estimated for *S. asperula* and *P. niveus*, respectively.

Geotrichum candidum and *M. circinelloides* were sensitive to undissociated carbonic acid so CO₂ was active in aqueous form. No optimum was observed (data were fitted with the CMP1 model) and the effect of the increase in the undissociated carbonic acid concentration was still the same irrespective of the range for the carbonic acid concentration (shape parameter α close to 1, see Table 3 Figure 2 m and n). *Mucor circinelloides* grew faster than *G. candidum*, the μ_{opt} values were estimated to be 11.27 ± 0.27 and 4.26 ± 0.05 mm.day⁻¹, respectively. [Undissociated carbonic acid] 50 corresponding to the concentration of undissociated carbonic acid which reduces radial growth by 50% was estimated at 0.27 ± 0.01 and 0.30 ± 0.00 mmol.L⁻¹ for *M. circinelloides* and *G. candidum*, respectively.



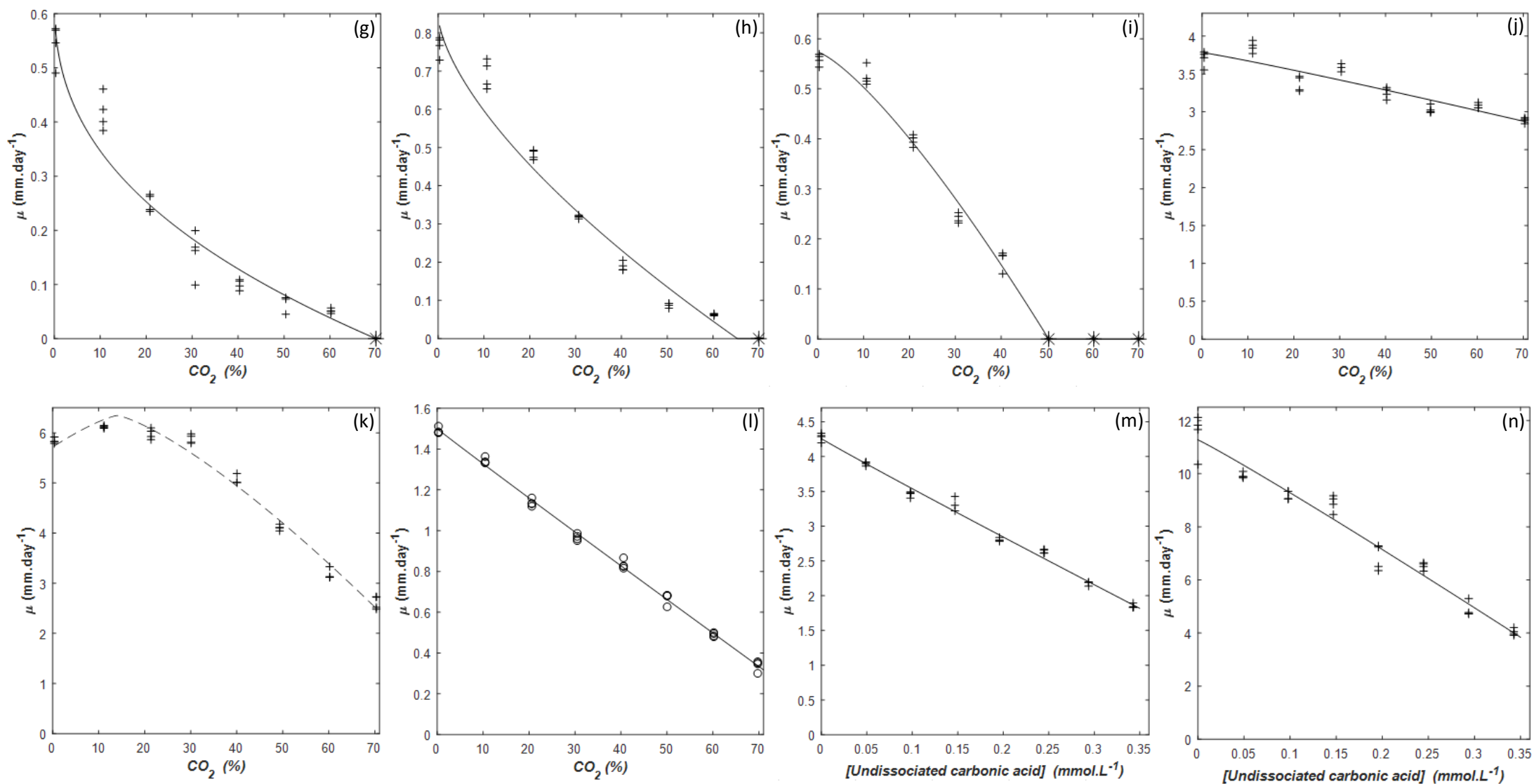


Figure 2. Influence of CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration on the growth rate of of *A. flavus* (a), *P. fuscoglaucum* (b), *P. nalgiovense* (c), *P. solitum* (d), *P. expansum* (e) and *P. roqueforti* (f), *B. domesticum* (g), *C. herbarum* (h), *P. bialowiezense* (i), *M. lanceolatus* (j), *P. niveus* (k), *S. asperula* (l), *G. candidum* (m) and *M. circinelloides* (n) incubated at 25°C on PDA medium adjusted at pH 4.7 (+) or pH 7.0 (O) for *S. asperula*. The fitted values are presented by line for CMP1 model (—) or dotted line for CMP2 model (---).

Table 3. Estimation of secondary model parameters (and confidence intervals, $\alpha = 0.05$) obtained by fitting CMP1 (Eq. (4)) or CMP2 (Eq. (5)) models to radial growth rate (μ_{max}) of *A. flavus*, *P. fuscoglaucum*, *P. nalgiovense*, *P. solitum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *B. domesticum*, *C. herbarum*, *P. bialowiezense*, *M. lanceolatus*, *P. niveus*, *S. asperula*, *G. candidum* and *M. circinelloides* at 25°C as a function of CO₂ percentage or undissociated carbonic acid concentration in PDA medium (pH 4.7 or pH 7.0 for *S. asperula*) at 25°C. The accuracy of models was evaluated by using the RMSE. (-) : parameter not estimated.

Species	Carbonic acid form which impacted radial growth	Chemical species used for modeling	Group	Model	CO ₂ 50 (%) or [undissociated carbonic acid] ₅₀ (mmol.L ⁻¹)	α	μ_{opt} (mm.day ⁻¹)	CO ₂ opt (%)	RMSE
<i>A. flavus</i>	Total	CO ₂	1	CMP1	43.60 ± 0.74	1.08 ± 0.04	4.08 ± 0.05	-	0.0260
<i>P. fuscoglaucum</i>				CMP1	35.13 ± 1.51	0.71 ± 0.04	2.41 ± 0.06	-	0.0288
<i>P. nalgiovense</i>				CMP1	29.61 ± 1.15	0.63 ± 0.03	1.73 ± 0.03	-	0.0185
<i>P. solitum</i>				CMP1	26.24 ± 2.85	0.57 ± 0.06	2.25 ± 0.11	-	0.0522
<i>P. expansum</i>				CMP2	24.28 ± 0.96	0.46 ± 0.02	Fixed at 3.40	7.56 ± 0.81	0.0652
<i>P. roqueforti</i>				CMP2	75.38 ± 1.79	1.24 ± 0.17	5.32 ± 0.12	19.79 ± 1.20	0.0452
<i>B. domesticum</i>			2	CMP1	12.56 ± 3.67	0.40 ± 0.07	0.64 ± 0.06	-	0.0414
<i>C. herbarum</i>				CMP1	22.60 ± 2.65	0.65 ± 0.08	0.84 ± 0.05	-	0.0432
<i>P. bialowiezense</i>				CMP1	29.53 ± 0.88	1.30 ± 0.11	0.57 ± 0.01	-	0.0179
<i>M. lanceolatus</i>			Not possible to conclude (Total)		3	CMP1	138.25 ± 21.35	1.08 ± 0.24	3.78 ± 0.07
<i>P. niveus</i>	CMP2	62.57 ± 1.00				1.31 ± 0.12	6.34 ± 0.12	14.04 ± 1.15	0.0430
<i>S. asperula</i>	CMP1	44.70 ± 0.66				0.98 ± 0.03	1.50 ± 0.02	-	0.0124
<i>G. candidum</i>	Undissociated	Undissociated carbonic acid	4	CMP1	0.30 ± 0.00	0.97 ± 0.05	4.26 ± 0.05	-	0.0219
<i>M. circinelloides</i>				CMP1	0.27 ± 0.01	1.05 ± 0.10	11.27 ± 0.27	-	0.0808

4. Discussion

The aim of this study was to compare the physiological responses of filamentous fungi found in the dairy industry to the CO₂ and, more specifically, to carbonic acid. Before this work, only a few data were available regarding experiments performed with the CO₂ to determine its impact on fungal growth compared to other abiotic factors such as temperature, pH and water activity (Abellana et al., 2000). This phenomenon is related to the high experimental constraints of these studies which required taking fungal respiration and the gas permeability of the experimental apparatus into account. As discussed in a previous study, it is difficult to compare the results obtained from different studies because the differing experimental conditions may have an impact on the estimations (growth limits, estimation of cardinal values) (Valle et al., 2022). In the current case, the incubation temperature and pH of the culture medium could impact the CO₂ dissolution and, subsequently, the carbonic acid concentration. However, some results were in accordance with the observations that have already been reported. Several studies have indicated that an increase in the CO₂ leads to an increase in latency and a decrease in the radial growth rate (Abellana et al., 2000; Guynot et al., 2003; Taniwaki et al., 2001; Yang and Lucas, 1970). The present study shows that there are contrasting fungal responses to carbonic acid among taxa; this phenomenon had already been reported in a study that evaluated the impact of water activity on the radial growth rate in a high diversity of fungal strains (Valle et al., 2022). It was previously estimated that the CO₂ percentage needed to reduce the growth rate of numerous species, including *C. herbarum* and *P. roqueforti*, by 50% was above 15% (maximum CO₂ percentage tested) in a study performed in wheat extract agar at 0.98 a_w and 23°C (Magan & Lacey, 1984). This result is in agreement with the present study, the CO₂₅₀ was estimated above 20% of CO₂ for all strains except *B. domesticum* for which the lower CO₂ percentage needed to reduce the fungal growth rate by 50% was estimated to be 12.56% of CO₂. In the present study, *M. lanceolatus* was the least sensitive strain to CO₂. It appears that over 100% CO₂ is needed to reduce the growth rate by 50%. Our study estimates this value to be $138.25 \pm 21.35\%$. It was not surprising that a *Mucor* strain was found to be tolerant to CO₂ as it has already been shown that several *Mucor* strains belonging to different species

(including *Mucor rouxii* and *Mucor subtilissimus*) are able to grow in atmospheres with 100% CO₂, but generally these had a yeast-like form (Bartnicki-Garcia & Nickerson, 1962b). It was also reported that two strains of *A. flavus* and one strain of *B. nivea* (the teleomorph form of *P. niveus*) are able to grow in 100% of CO₂ (Mahbobinejad et al., 2019; Yates et al., 1967).

For most strains, no optimal growth was visible in the presence of CO₂. For *A. flavus* and *C. herbarum*, these results are in agreement with a previous study indicating that they grow faster in air than in an atmosphere with 10% of CO₂ or higher (Yang & Lucas, 1970). Optimal growth in the presence of CO₂ was observed for only three strains: *P. niveus*, *P. expansum* and *P. roqueforti*. This phenomenon has already been observed: a low concentration of CO₂ (5 or 10% CO₂) was found to improve the growth of *P. roqueforti*, *Epicoccum nigrum* and *Fusarium roseum* (Magan & Lacey, 1984; Wells & Uota, 1969). It was also shown that the growth of *B. nivea* (the teleomorph form of *P. niveus*) was not affected by an atmosphere containing 20% CO₂ and 5% O₂ (Taniwaki et al., 2001); a similar result was obtained in the present study. Likewise, it was reported that the growth of *P. roqueforti* was unchanged by an increase of CO₂ from 20% to 40% in the presence of 5% O₂, whereas a small decrease in growth of about 9% was observed for the strain used in the current study (Taniwaki et al., 2001). The difference between these results could be explained by the different experimental conditions or intraspecific variability. For example, a study performed on 29 *P. roqueforti* strains showed that the strains do not have the same behavior or estimated cardinal values (Nguyen Van Long et al., 2021).

As described above, μ_{opt} for *P. expansum* must be set to an arbitrary value to be able to fit the data and estimate the other parameters. Given that there are a limited number of experimental data close to the optimum, this means that it was not possible to have model convergence without setting this parameter. If more data close to the optimum were acquired (e.g. future studies could test 5 and 15% of CO₂), it could be possible to better describe the optimum and data fitting with the CMP2 model (maybe it was not necessary to set μ_{opt}). For *M. lanceolatus*, *P. niveus* and *S. asperula*, it was not possible to know which form of carbonic acid impacts the growth rate due to significant impact of the pH. More

data should be acquired at another pH to determine the active form of carbonic acid (total or undissociated carbonic acid). A pH of 6 could be used for these three strains since this pH value had less of an impact than a pH of 7 (data not shown). For *M. circinelloides* and *G. candidum*, CO₂ was active in the aqueous form (modeled with undissociated carbonic acid). By contrast, it was not possible to determine the active form of CO₂ (gaseous or aqueous) for the other strains (modeling with CO₂ percentage). Future studies could be performed at pH 4.7 and another temperature (e.g., 15°C) to change the ratio between gaseous CO₂ and aqueous CO₂ (temperature dependent) and to determine whether CO₂ was active in a gaseous or aqueous form. If CO₂ was active in gaseous form, the inhibition could be at the interface between headspace and thallus (notably respiration could be impacted). By contrast, if CO₂ was active in aqueous form, the inhibition could be at the interface between thallus and culture media. Future studies could be performed in food matrices to validate the growth rate predictions obtained in culture media. It could also be interesting to evaluate the impact of CO₂ on sporulation and mycotoxin production. The spores produced could be dispersed mainly by air and water, and could then settle on numerous surfaces (ingredients, utensils, work surfaces) with the result that they contaminate these surfaces (Bernardi et al., 2019; Kure & Skaar, 2019). Mycotoxins may be dangerous for human health (Hymery et al., 2014). A previous study reported that an atmosphere with 20% O₂ and 80% CO₂ did not totally inhibit the sporulation and mycotoxin production of several filamentous fungi including *P. roqueforti* (Taniwaki et al., 2010).

It was reported that the effects of CO₂ on fungal cells could be positive or negative, depending on the concentrations of CO₂ and its derivatives (carbonic acid, bicarbonates ions). The active form of CO₂ (gaseous or aqueous form, dissociated or undissociated acid form) involved in the cellular modifications was not always identified. For this reason and in this discussion section, the term "CO₂" corresponds to the overall effects of CO₂ (including its derivatives) if the active form was not specified. Concerning the positive effects of CO₂, studies that have previously been performed on *S. cerevisiae* with a radioactive carbon isotope have shown the ability of cells to fix carbon from CO₂ through the citric acid cycle (Wendell Davis et al., 1956) yielding amino acids for protein synthesis (notably aspartic acid

and glutamic acid which contained radioactive carbon). It was also shown that CO₂ increased the amount of lipid and fatty acids suggesting that CO₂ was involved in both protein and lipid metabolism in *S. cerevisiae*. A similar phenomenon was observed in *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium digitatum* (Gitterman and Knight, 1952; Noble et al., 1958). Either or both of the phenomena described above could be the reason for the improvement in growth of the three strains in the current study (*P. niveus*, *P. expansum* and *P. roqueforti*) for which an optimal growth was observed in the presence of CO₂.

With regards to negative effects, it was suggested that the passive diffusion of CO₂ disrupts the plasma membrane integrity and the molecular flows through them (Caleb et al., 2013; Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Stretton and Goodman, 1998). It also seemed that CO₂ could be carried into the cell by a membrane transporter (aquaporin, Rhesus protein) (Bahn et al., 2007; Cummins et al., 2014). After its entry into the cells, CO₂ could be dissolved in the aqueous phase of the cellular cytoplasm and then be hydrated thereby leading to the formation of carbonic acid. The dissociation of carbonic acid would then result in the formation of bicarbonate ions (HCO₃⁻) and protons (H⁺). It was also reported that carbonic anhydrases are enzymes involved in the hydration of CO₂ and the release of bicarbonate ions and protons (Martin et al., 2017; Supuran and Capasso, 2021). The release of protons was responsible for the decrease in the intracellular pH and, therefore, modifications in the activity and structure of fungal enzymes (Caleb et al., 2013; Daniels et al., 1985; Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez et al., 2007). In addition, it was indicated that CO₂ penetrated into cells faster than O₂; this phenomenon could favor the displacement of O₂ by CO₂ (Daniels et al., 1985; Hocking, 1990; Yu and Chen, 2019). It is likely that an increase of CO₂ could inhibit a reaction that produce CO₂ (respiration, decarboxylation) to avoid a chemical imbalance related to the strong presence of CO₂. Moreover, it was reported that bicarbonate ions seemed to be involved in virulence factors in yeasts (*Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*) (Bahn et al., 2007; Bahn and Mühlischlegel, 2006; Mitchell, 2005) and the dimorphism of certain *Mucor* species, especially *M. circinelloides* (Homa et al., 2022), by favoring an increase in cAMP which will then activate downstream targets. For *Mucor rouxii*, when the

atmosphere contained at least 90% of CO₂ (in aerobic conditions), a yeast-like development was observed (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962b; Sypherd et al., 1979). Its cells contained higher amounts of proteins and mannose when it developed as a yeast-like form rather than a filamentous form. It was shown that other yeast cell walls were also composed of a protein-mannan complex (rich in aspartic acid) (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962c). *Mucor rouxii* seemed to be able to fix carbon from CO₂ via a citric acid cycle and it became possible to incorporate amino acids (notably aspartic acid) into proteins to form a thick cell wall in the yeast-like form (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962a). It was reported that the cell wall of *M. rouxii* represents between 5 and 10% of the cellular volume in the filamentous form versus between 30 and 40% in the yeast-like form (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962c). These results suggested that numerous physiological processes could be impacted by CO₂ (including respiration, cell division and dimorphism).

To conclude, this study helps to estimate the development of a large diversity of starter and spoilage fungi encountered in the dairy environment as a function of an increase in the CO₂ in the atmosphere through the use of using predictive mycology tools. The co-existence of a negative or positive effect, depending on the CO₂ percentage, is challenging for predictive mycology and requires adapted mathematical models along with thorough datasets on various fungal species. The results of the present study suggest that the high CO₂ percentage in MAP could help to reduce fungal growth in order to increase the shelf life of dairy products. Modified atmosphere packaging with a high CO₂ percentage seemed to be a good alternative method to preserve foods without addition of preservatives, but it could have an even greater effect if combined with a low O₂ concentration and other abiotic factors such as water activity, temperature and pH, as has already been shown in agar culture media (Haasum and Nielsen, 1998; Van Den Tempel and Nielsen, 2000) and a sponge cake analogue (Abellana et al., 2000; Guynot et al., 2003).

Acknowledgements

The authors would like to thank their partners who support the PHYMIA 2 project: Bba Milk Valley, the *Conseils Régionaux de Bretagne et Pays de la Loire*, and the French Association for Research and Technology (ANRT) (CIFRE 2018/1395).

We would like to thank Dr. Jeanne Ropars and Pr. Henry-Eric Spinnler for the discussions and their expertise about this subject.

References

- Abellana, M., Ramos, A.J., Sanchis, V., Nielsen, P. V., 2000. Effect of modified atmosphere packaging and water activity on growth of *E. amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *Journal of Applied Microbiology* 88, 606–616. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00999.x>
- Bachmann, H., Fuerst, M.S., 2003. Sticky cheese smear and natural white mould. *Milk Science International* 58, 117–232.
- Bachmann, H.P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M.G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.T., Fürst, M., 2005. Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias Anticollanti on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology* 38, 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Bahn, Y.S., Mühlischlegel, F.A., 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current Opinion in Microbiology* 9, 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.09.003>
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2007. Sensing the environment: Lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology* 5, 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, J., 1962a. Assimilation of carbon dioxide and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 548–551.
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W.J., 1962b. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of bacteriology* 84, 829–840. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.829-840.1962>
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W.J., 1962c. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 58, 102–119. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90822-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90822-3)
- Bernardi, A.O., Garcia, M.V., Copetti, M.V., 2019. Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science* 29, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Caleb, O.J., Mahajan, P. V., Al-Said, F.A.J., Opara, U.L., 2013. Modified Atmosphere Packaging Technology of Fresh and Fresh-cut Produce and the Microbial Consequences-A Review. *Food and Bioprocess Technology* 6, 303–329. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0932-4>
- Couvert, O., Guégan, S., Hézard, B., Huchet, V., Lintz, A., Thuault, D., Stahl, V., 2017. Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. *Food Microbiology* 68, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.003>
- Cummins, E.P., Selfridge, A.C., Sporn, P.H., Sznajder, J.I., Taylor, C.T., 2014. Carbon dioxide-sensing in organisms and its implications for human disease Eoin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014 71, 831–845. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1470-6>.Carbon

- Dagnas, S.P., Membré, J.M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection* 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., Syed, S.H., 1985. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *Journal of Food Protection* 48, 532–537. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.6.532>
- Dixon, N.M., Kell, D.B., 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 109–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03387.x>
- Dupont, J., Dequin, S., Giraud, T., Le Tacon, F., Marsit, S., Ropars, J., Richard, F., Selosse, M.-A., 2017. Fungi as a Source of Food. *Microbiology Spectrum* 5. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0030-2016>
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology* 117, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018>
- Garnier, L., Valence, F., Mounier, J., 2017a. Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: An update. *Microorganisms* 5, 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., 2017b. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N., 2008. Effect of aw and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology* 122, 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.051>
- Gitterman, C.O., Knight, S.G., 1952. Carbon dioxide fixation into amino acids of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of bacteriology* 64, 223–231. <https://doi.org/10.1128/jb.64.2.223-231.1952>
- Gorman, A., 1973. pH and the Henderson-Hasselbalch Equation. *The American Journal of Medicine* 55, 131–133.
- Guynot, M.E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2003. Modified Atmosphere Packaging for Prevention of Mold Spoilage of Bakery Products with Different pH and Water Activity Levels. *Journal of Food Protection* 66, 1864–1872. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.10.1864>
- Haasum, I., Nielsen, P.V., 1998. Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. *Journal of Applied Microbiology* 84, 451–460.
- Hocking, A.D., 1990. Responses of fungi to modified atmospheres. Fumigation and controlled atmosphere storage of grain: proceedings of an international conference, Singapore, 14-18 February 1989. *ACIAR Proceedings No. 25*. 70–82.
- Homa, M., Ibragimova, S., Szebenyi, C., Nagy, G., Zsindely, N., Bodai, L., Vágvölgyi, C., Nagy, G., Papp, T., 2022. Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Fungi* 8. <https://doi.org/10.3390/jof8040404>
- Hoogerwerf, S.W., Kets, E.P.W., Dijksterhuis, J., 2002. High-oxygen and high-carbon dioxide containing atmospheres inhibit growth of food associated moulds. *Letters in Applied Microbiology* 35, 419–422. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2002.01211.x>

- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.L., Barbier, G., Coton, E., 2014. Filamentous fungi and mycotoxins in Cheese: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- Khoshgozaran, S., Azizi, M.H., Bagheripoor-Fallah, N., 2012. Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: A review. *Dairy Science and Technology* 92, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0044-3>
- Kirtil, E., Kilercioglu, M., Oztop, M.H., 2016. Modified Atmosphere Packaging of Foods. Reference Module in Food Science 1–6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03218-2>
- Kure, C.F., Skaar, I., 2019. The fungal problem in cheese industry. *Current Opinion in Food Science* 29, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.003>
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effects of gas composition and water activity on growth of field and storage fungi and their interactions. *Transactions of the British Mycological Society* 82, 305–314. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(84\)80074-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(84)80074-1)
- Martin, R., Pohlers, S., Mühlischlegel, F.A., Kurzai, O., 2017. CO₂ sensing in fungi : at the heart of metabolic signaling. *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0700-0>
- Mitchell, A.P., 2005. Fungal CO₂ Sensing: A Breath of Fresh Air. *Current Biology* 15, 934–936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.058>
- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science* 79, 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017a. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology* 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K., Mounier, J., 2017b. Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of fungi from dairy foods. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02109>
- Noble, E.P., Reed, D.R., Wang, C.H., 1958. Utilization of acetate, pyruvate, and CO₂ by *Penicillium digitatum*. *Canadian journal of microbiology* 4, 469–476. <https://doi.org/10.1139/m58-050>
- Phillips, C.A., 1996. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology* 31, 463–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1997. Modelling the Growth Rate of. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2355–2360.
- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y., Bennetot, B., Giraud, T., 2020. *Comptes Rendus Biologies*.
- Savary, O., Coton, M., Jc, F., Nodet, P., Ropars, J., Coton, E., J-I, J., 2021. Unexpected *Nectriaceae* species diversity in cheese , description of *Bisifusarium allantoides* sp . nov ., *Bisifusarium penicilloides* sp . nov ., *Longinectria* gen . nov . *lagenoides* sp . nov . and *Longinectria* 12, 1077–1100. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/13>
- Sengun, I., Yaman, D., Gonul, S., 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin Journal* 1, 291–298. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x041>
- Spinnler, H.E., 2004. Surface Mould-ripened Cheeses.

- Stretton, S., Goodman, A.E., 1998. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 73, 79–85. <https://doi.org/10.1023/A:1000610225458>
- Supuran, C.T., Capasso, C., 2021. A highlight on the inhibition of fungal carbonic anhydrases as drug targets for the antifungal armamentarium. *International Journal of Molecular Sciences* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22094324>
- Sypherd, P.S., Borgia, P.T., Paznokas, J.L., 1979. Biochemistry of Dimorphism in the Fungus *Mucor*. *Advances in Microbial Physiology* 18, 67–104. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60415-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60415-4)
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology* 143, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.030>
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>
- Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 68, 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00487-1)
- Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J.L., Bregier, T., Pawtowski, A., Barbier, G., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., Coroller, L., 2022. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment. *Food Research* 157.
- Van Den Tempel, T., Nielsen, M.S., 2000. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology* 57, 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00263-4)
- Wagner, L., Stielow, J.B., de Hoog, G.S., Bensch, K., Schwartz, V.U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., Walther, G., 2020. A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 44, 67–97. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2020.44.03>
- Wendell Davis, J., Vernon, H., Bert E., C.H., 1956. Carbon dioxide fixation and biosynthesis of amino acids in yeast. *Biochimica and Biophysica acta* 21, 101–105.
- Yang, H., Lucas, G.B., 1970. Effects of N₂-O₂ and CO₂-O₂ tensions on growth of fungi isolated from damaged flue-cured tobacco. *Applied microbiology* 19, 271–277. <https://doi.org/10.1128/aem.19.2.271-277.1970>
- Yu, T., Chen, Y., 2019. Effects of elevated carbon dioxide on environmental microbes and its mechanisms: A review. *Science of the Total Environment* 655, 865–879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.301>
- Zwietering, M.H., Wiltzes, T., De Wit, J.C., Riet, K.V.T., 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection* 55, 973–979. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.973>

Supplementary Table 1. Summary of all experiments performed to 1) model the impact of carbonic acid on fungal growth rate at pH 4.7 and 2) determine the impact of different form of carbonic acid (total, undissociated, dissociated) and so what is the active form of carbonic acid with experiments performed at pH 7.0 or 7.3 depended on the strain.

	pH 4.7			pH 7.0			pH 7.3		
	Carbonic acid form (mmol.L ⁻¹)			Carbonic acid form (mmol.L ⁻¹)			Carbonic acid form (mmol.L ⁻¹)		
CO ₂ (%)	Total	Undissociated	Dissociated	Total	Undissociated	Dissociated	Total	Undissociated	Dissociated
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0	0	0.000
10	0.050	0.049	0.001	0.050	0.009	0.041	-	-	-
20	0.100	0.098	0.002	0.100	0.019	0.081	-	-	-
30	0.150	0.147	0.003	0.150	0.028	0.122	0.150	0.016	0.134
40	0.200	0.196	0.004	0.200	0.038	0.162	-	-	-
50	0.250	0.245	0.005	0.250	0.048	0.203	-	-	-
60	0.300	0.294	0.006	0.300	0.057	0.243	-	-	-
70	0.350	0.343	0.007	0.350	0.066	0.284	-	-	-
Percentage of each carbonic acid form	100	98	2	100	19	81	100	11	89
Data acquisition	<ul style="list-style-type: none"> 0 to 70% CO₂ for all strains except for <i>S. asperula</i> 			<ul style="list-style-type: none"> 0 to 70% CO₂ for <i>S. asperula</i> (for modelling) 0 and 50% for <i>A. flavus</i>, <i>G. candidum</i>, <i>M. circinelloides</i> and <i>P. roqueforti</i> 			<ul style="list-style-type: none"> 0 and 30% CO₂ for <i>B. domesticum</i>, <i>C. herbarum</i>, <i>M. lanceolatus</i>, <i>P. niveus</i>, <i>P. bialowiezense</i>, <i>P. expansum</i>, <i>P. solitum</i>, <i>P. fuscoglaucum</i> and <i>P. nalgiovense</i> 		

III. Mise au point du dispositif expérimental

1. Critères du dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour acquérir les données de croissance radiale des moisissures doit répondre à plusieurs critères. Déjà évoqué précédemment, le mélange gazeux doit être stable tout au long de l'expérience dans le cas d'une étude monofactorielle. Par conséquent, il est nécessaire de renouveler régulièrement le mélange gazeux à l'intérieur du dispositif expérimental afin que la perméabilité aux gaz et la respiration des moisissures soient négligeables. Il est également nécessaire de pouvoir mesurer régulièrement la composition gazeuse du dispositif expérimental afin de s'assurer que le mélange gazeux est bien stable et qu'il n'y a pas de problème (fuite).

Le CO₂ entraîne une acidification du milieu de culture. Par conséquent, il est nécessaire d'ajuster le pH du milieu de culture et de le contrôler régulièrement. Le dispositif expérimental doit contenir de l'eau en continu pour maintenir une humidité relative stable et ainsi empêcher le dessèchement du milieu de culture.

Un dispositif expérimental original répondant à tous ces critères a été développé. Afin de réduire le temps d'acquisition des données, deux dispositifs ont été développés et utilisés en parallèle.

A. Développement d'une enceinte sous atmosphère modifiée adaptées aux expériences

Un dessiccateur (F42074-1002, Bel-Art™, Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis) contenant deux événements a été utilisé comme enceinte sous atmosphère modifiée. Ce dernier a été modifié afin de répondre aux critères cités ci-dessus. Un joint en silicone a été ajouté entre la partie supérieure et la partie inférieure afin de limiter les échanges gazeux avec l'extérieur. Un trou a été percé et une aiguille a été collée à l'aide de colle époxy pour effectuer régulièrement des mesures de gaz à l'intérieur de l'enceinte sous atmosphère modifiée. Une pointe en métal a été découpée pour boucher l'aiguille et limiter les échanges de gaz avec l'extérieur. Les boîtes de pétri inoculées avec les spores de moisissures sont enfermées dans l'enceinte sous atmosphère modifiée qui est placée dans l'incubateur (Figure 38).

Une électrovanne (370-0078, RS Components SAS, Beauvais, France) a été connectée à l'entrée et à la sortie de l'enceinte sous atmosphère modifiée (Figure 38). Les électrovannes sont reliées à un système électronique qui permet de renouveler régulièrement le mélange gazeux afin de le maintenir stable dans l'enceinte sous atmosphère modifiée. La perméabilité de l'enceinte sous atmosphère modifiée et la respiration des moisissures sont compensées par des apports réguliers de gaz, ces phénomènes deviennent négligeables.

L'enceinte sous atmosphère modifiée est reliée à une bouteille de plongée contenant le mélange gazeux d'intérêt (Figure 1). Un détendeur (Tek Plongée, Malville, France) est connecté à la bouteille de plongée, une électrovanne est placée sur ce dernier pour réguler le flux du mélange gazeux qui est injecté dans l'enceinte sous atmosphère modifiée.



Figure 38. Photographies du dispositif expérimental.

B. Développement du système de renouvellement du mélange gazeux dans l'enceinte sous atmosphère modifiée

Un adaptateur (DSP30-24, TDK LAMBDA, Farnell, Limonest, France) est relié à une prise électrique, il permet de passer du 220V au 12V nécessaire pour alimenter les électrovannes. Ensuite, un relais (70S2-01-A-05-S, Schneider Electric, RS Components, Beauvais, France) a été installé, il permet de passer du 12V au 5V nécessaire pour alimenter la carte Arduino (506-7187, RS Components, Beauvais, France). La carte Arduino a été programmée (Logiciel gratuit Arduino, version 1.8.13) afin d'ouvrir les trois électrovannes (deux sur l'enceinte sous atmosphère modifiée et une sur la bouteille de plongée) simultanément toutes les heures pendant environ 30 secondes pour que 18 litres de gaz soient injectés dans l'enceinte sous atmosphère modifiée (Figure 39).

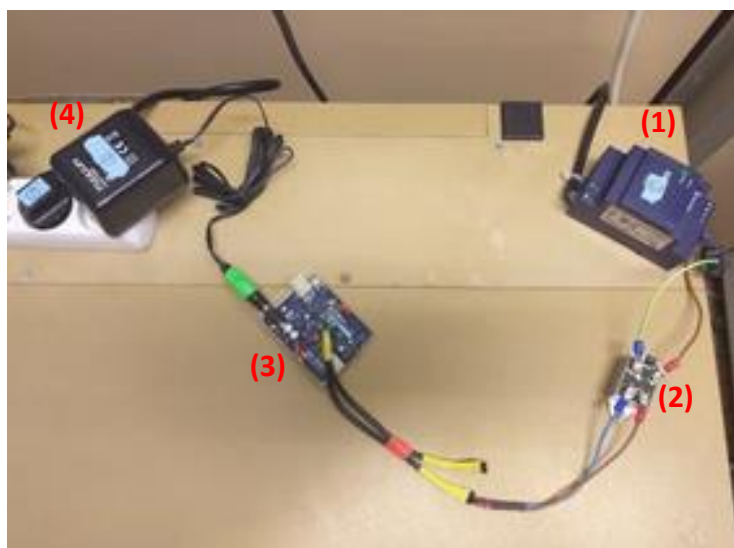


Figure 39. Photographie du système électronique mis en place pour renouveler régulièrement le mélange gazeux contenu dans l'enceinte sous atmosphère modifiée : adaptateur pour passer du 220V au 12V relié aux électrovannes (1), relais pour passer du 12V au 5V (2), carte Arduino programmée (3) et alimentation de la carte Arduino (4).

C. Préparation du mélange gazeux dans les bouteilles de plongée

Huit pourcentages de CO₂ ont été testés allant de 0 à 70% (avec un pas de 10% entre chaque niveau testé) avec 5% d'O₂ et le complément est effectué avec du N₂. Une étude réalisée précédemment a montré qu'une atmosphère contenant 5% d'O₂ n'avait pas d'impact sur la germination des spores de moisissures, c'est pourquoi nous avons conservé ce pourcentage pour préparer les mélanges gazeux dans la présente étude (Nguyen Van Long *et al.*, 2017).

Les mélanges gazeux sont effectués dans des bouteilles de plongée (18 litres et 230 bars, ARI-MAIR, Plougastel-Daoulas, France). De l'air comprimé est ajouté dans la bouteille de plongée à l'aide d'un compresseur (Mecafer 50L, Castorama, Lille, France) (Figure 40). Ensuite, le CO₂ (I5100M14R0A000, Air Liquide, Paris, France) et le N₂ (I4001M20R2A000, Air Liquide, Paris, France) sont ajoutés dans les proportions définies lors de pré-essais afin d'atteindre le mélange gazeux désiré (environ 40 bars dans la bouteille de plongée au total) (Figure 40). La bouteille de plongée est agitée doucement pour obtenir un mélange gazeux homogène. La composition gazeuse de la bouteille de plongée est ensuite vérifiée grâce à un analyseur de gaz (Vigaz canal 120-II, VISCIANO, Saint Genis Pouilly, France).



Figure 40. Photographies de la préparation d'un mélange gazeux.

D. Lecture de la croissance radiale des moisissures

Afin de procéder à la lecture de la croissance radiale des moisissures, l'enceinte sous atmosphère modifiée est déconnectée du système électronique puis sortie de l'incubateur pour être placée dans une boîte à gants transportable Captair Pyramid (Erlab, Val-de-Reuil, France) (Figure 41). La boîte à gants est rincée trois fois avec environ deux bars du mélange gazeux étudié (soit environ 36 litres de gaz) avant l'ouverture de la porte de l'enceinte sous atmosphère modifiée. Ensuite, les mesures de croissance radiale sont effectuées grâce à un double décimètre (Figure 41). Une fois que les mesures sont terminées, l'enceinte sous atmosphère modifiée est replacée dans l'incubateur puis reconnectée au système électronique.

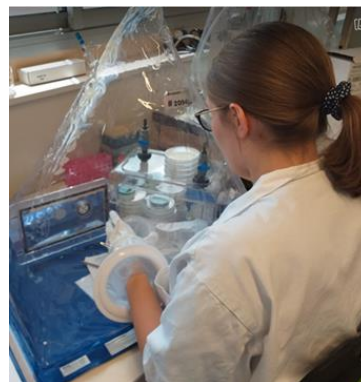
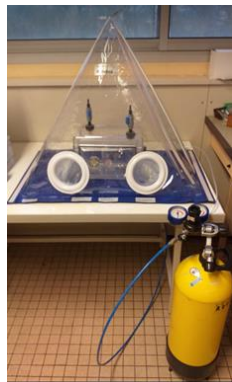


Figure 41. Photographies de la boîte à gants transportable Captair Pyramid.

2. Vérifications des conditions expérimentales sélectionnées

A. Impact du pH

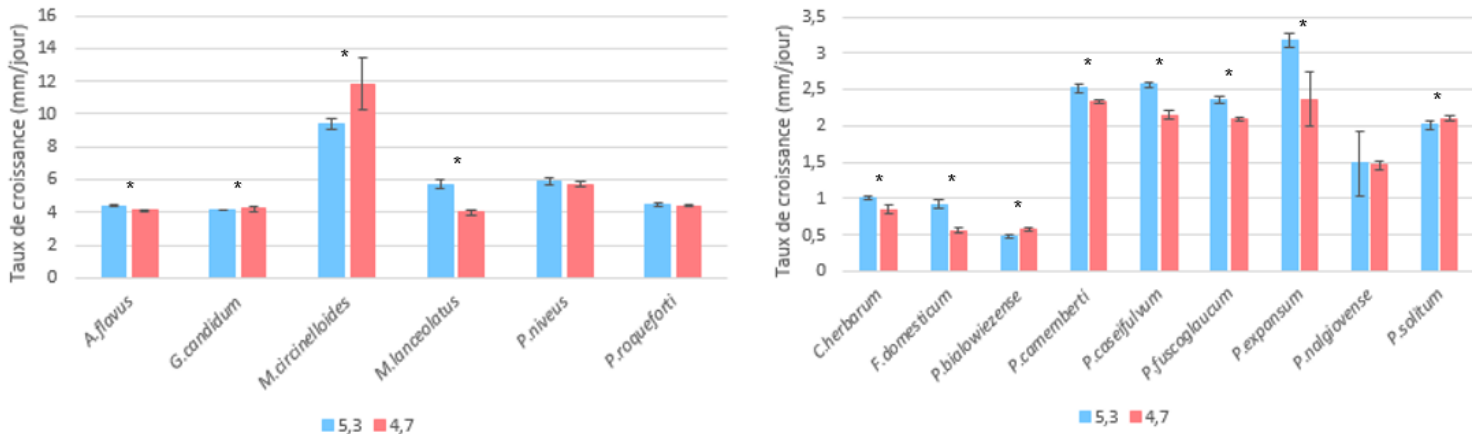


Figure 42. Histogrammes représentant le taux de croissance (en mm/jour) en fonction du pH du milieu de culture (pH PDA classique de référence : 5,3) pour chaque souche. Les barres représentent les écarts-types. Lorsque la différence entre les deux pH est significative, le symbole (*) a été ajouté.

Pour la majorité des souches étudiées, l'impact d'un pH de 4,7 est faible (Figure 42). Si d'un point de vue statistiques les différences sont significatives, elles sont jugées comme acceptables d'un point de vue biologique. En effet, il n'est pas rare de réaliser plusieurs fois la même expérience et de ne pas obtenir exactement le même taux de croissance. Ce phénomène est dû au fait que les organismes étudiés sont vivants et qu'il peut exister une certaine variabilité. Au vu de la diversité des souches étudiées, il est difficile de trouver une valeur de pH qui soit optimale pour toutes les souches étudiées.

B. Impact de l'O₂

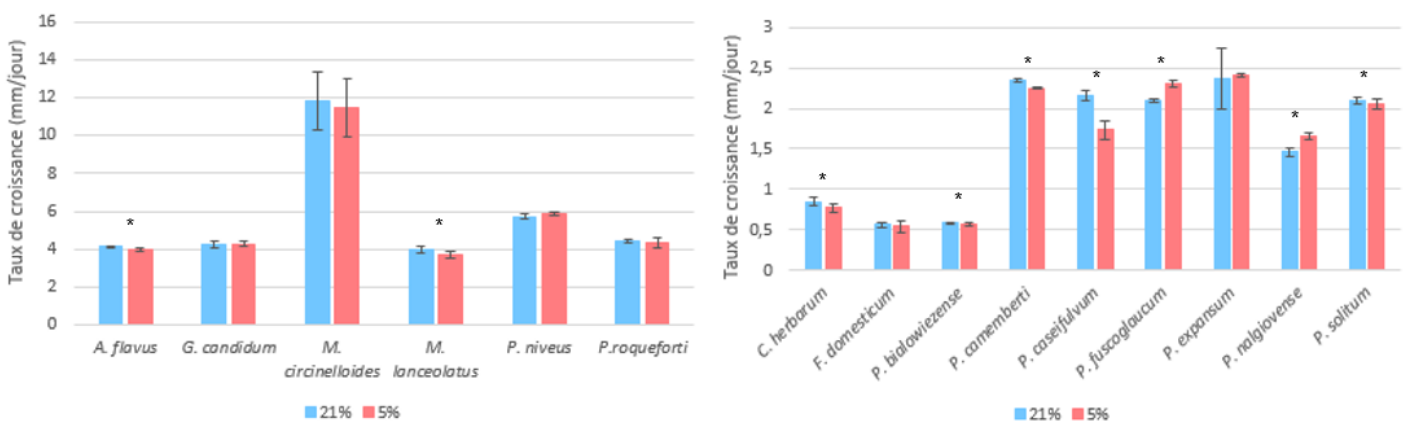


Figure 43. Histogrammes représentant le taux de croissance (en mm/jour) en fonction du pourcentage d'O₂ (référence : 21%) pour chaque souche. Les barres représentent les écarts-types. Lorsque la différence entre les deux pH est significative, le symbole (*) a été ajouté.

Pour la majorité des souches étudiées, l'impact d'un pourcentage d'O₂ de 5% est faible (Figure 43). Déjà évoqué précédemment, si d'un point de vue statistiques les différences sont significatives, elles sont jugées comme acceptables d'un point de vue biologique.

3. Vérifications du bon fonctionnement du dispositif expérimental

A. Vérification de la stabilité du mélange gazeux

Afin de vérifier le bon fonctionnement du système, des contrôles sont effectués régulièrement. Lorsqu'un mélange gazeux est préparé dans une bouteille de plongée, une mesure est effectuée pour vérifier la composition du mélange gazeux avant de connecter la bouteille de plongée à la chambre sous atmosphère modifiée (Figures 44 et 45). Globalement, le mélange gazeux est stable au cours du temps même si quelques points sont légèrement en dehors de l'intervalle de confiance. Ce phénomène est lié au fait qu'il est très difficile de réaliser des mélanges gazeux à la main avec des pourcentages en gaz identiques pour toutes les préparations. Par exemple, pour la manipulation à 30% de CO₂ et 5% d'O₂, un mélange contenant entre 31 et 33% de CO₂ et entre 4,2 et 4,6% d'O₂ est jugé comme acceptable. Lorsqu'une mesure de croissance radiale est effectuée, une mesure de la composition gazeuse est effectuée avant et après l'ouverture de l'enceinte sous atmosphère modifiée.

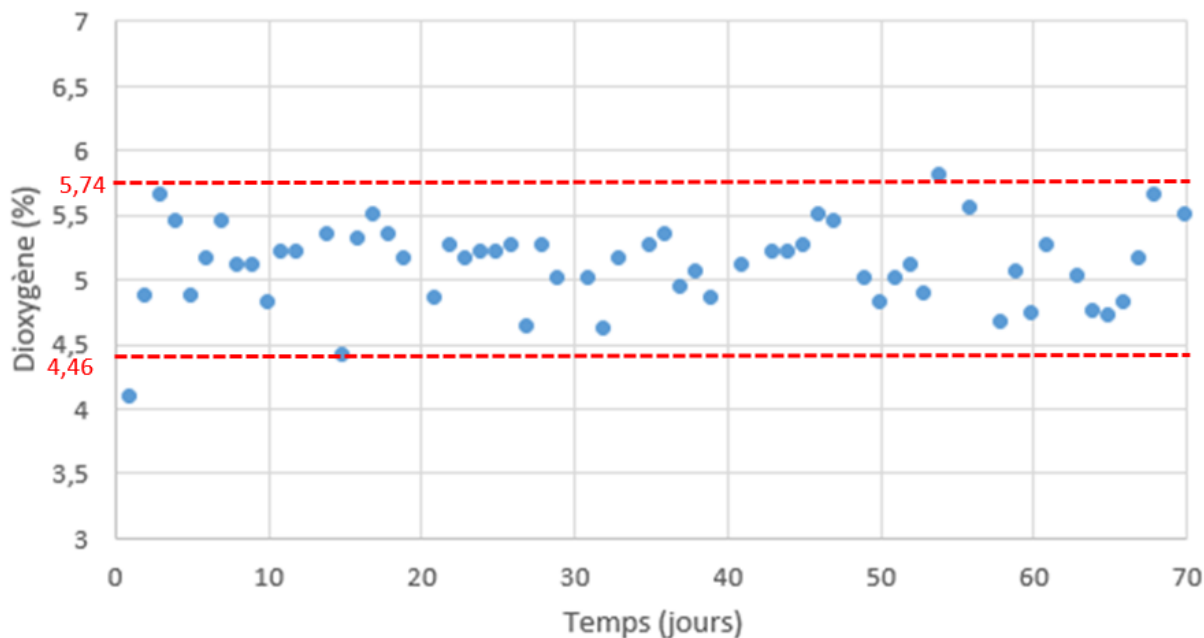


Figure 44. Graphique représentant le suivi quotidien du pourcentage d'O₂ (en %) dans l'enceinte sous atmosphère modifiée en fonction du temps (en jours) lorsque le mélange testé contenait 30% de CO₂ et 5% d'O₂, l'intervalle de confiance est représenté en rouge.

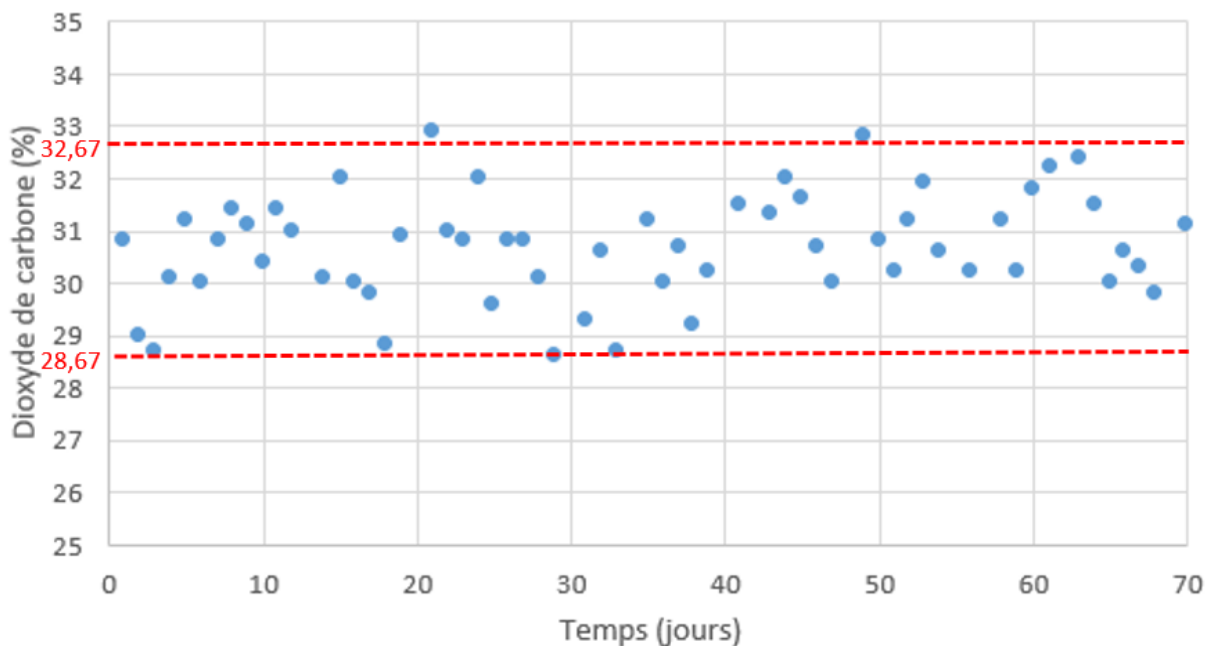


Figure 45. Graphique représentant le suivi quotidien du pourcentage de CO₂ (en %) dans l'enceinte sous atmosphère modifiée en fonction du temps (en jours) lorsque le mélange testé contenait 30% de CO₂ et 5% d'O₂, l'intervalle de confiance est représenté en rouge.

B. Vérification de la stabilité du pH au cours du temps

Le CO₂ peut se dissoudre dans une phase aqueuse comme le milieu de culture (cette dissolution est dépendante du pH et de la température) puis s'hydrater pour former de l'acide carbonique (H₂CO₃) avant de se dissocier pour former des ions bicarbonates (HCO₃⁻) et des protons (H⁺). Les protons vont entraîner une acidification du milieu de culture (baisse du pH). Le pH du milieu de culture a été ajusté pour chaque pourcentage de CO₂ testé de façon à obtenir une valeur de pH de 4,7 après exposition au CO₂. La méthode utilisée pour ajuster le pH du milieu de culture est détaillée dans l'article scientifique.

Un indicateur coloré a été ajouté dans quelques boîtes de milieu de culture afin de vérifier visuellement si le pH du milieu de culture est stable au cours du temps. Le vert de bromocrésol a été sélectionné car ses zones de virages sont intéressantes et cet indicateur coloré est déjà utilisé dans un milieu de culture pour dénombrer les levures et moisissures dans les fermentations brassicoles et industrielles (gélose nutritive WL, 0,022 g/L de vert de bromocrésol). Entre 0 et 3,8, le milieu de culture est jaune, entre 3,9 et 5,2, le milieu de culture est vert et à partir de 5,3 le milieu de culture est bleu (Figure 46). Pour rappel, le pH est fixé à 4,7 après exposition au CO₂ dans l'étude présente. Trois boîtes de milieu de culture contenant l'indicateur coloré (non inoculées avec des spores de moisissures) ont été placées dans l'enceinte sous atmosphère modifiée. La couleur du milieu de culture est vérifiée quotidiennement.

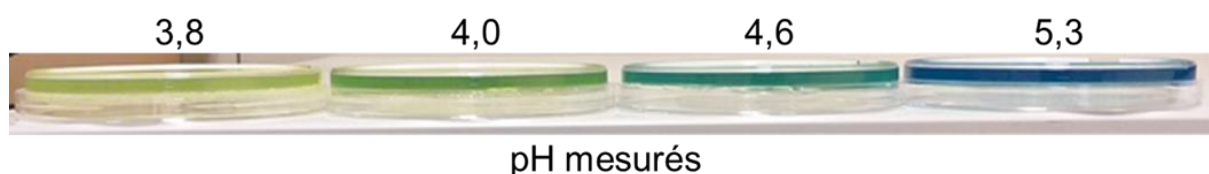


Figure 46. Photographie représentant la couleur du milieu de culture avec le vert de bromocrésol en fonction du pH mesuré.

Six autres boîtes de milieu de culture (non inoculées avec des spores de moisissures) ont été placées dans l'enceinte sous atmosphère modifiée. Le pH de trois boîtes est mesuré après 48h d'exposition au mélange gazeux et le pH des trois autres boîtes est mesuré à la fin de l'expérience afin de vérifier que le pH du milieu de culture est resté stable tout au long de la manipulation.

Dans l'enceinte sous atmosphère modifiée, nous avons également ajouté de l'eau dans des récipients afin de saturer l'air en eau et ainsi limiter la déshydratation des milieux de culture.

C. Données de mélanges gazeux et de pH obtenues lors des expériences

Les valeurs moyennes de la composition des mélanges gazeux mesurés dans la chambre sous atmosphère modifiée sont présentées dans le Tableau 19. La condition témoin (0% de CO₂ et 5% d'O₂) a permis de vérifier que la respiration des moisissures était négligeable dans le système expérimental qui a été développé. Les pourcentages de CO₂ et d'O₂ mesurés sur la totalité de la condition témoin étaient respectivement de 0,31 et 5,58%.

Tableau 18. Récapitulatif des conditions expérimentales (valeurs moyennes avec intervalles de confiance pour l'O₂ et le CO₂) pour chaque pourcentage de CO₂.

CO ₂ testé (%)	Durée de l'expérience (jours)	Mesure O ₂ (%)	Mesure CO ₂ (%)
0	33	5,58 ± 1,68	0,31 ± 0,50
10	44	5,34 ± 0,72	10,65 ± 1,20
20	56	5,29 ± 0,86	20,81 ± 1,34
30	70	5,10 ± 0,64	30,67 ± 2,00
40	69	5,26 ± 0,62	40,32 ± 1,94
50	69	5,31 ± 0,68	50,37 ± 2,60
60	69	5,39 ± 0,78	60,20 ± 2,82
70	70	5,11 ± 0,94	69,98 ± 4,30

Les valeurs moyennes de pH du milieu de culture (trois mesures) après quelques jours d'exposition au mélange gazeux et à la fin de l'expérience sont présentées dans le Tableau 20. L'acquisition des données a été réalisée à pH 4,7 pour toutes les souches à l'exception de *Scopulariopsis asperula* (acquisition des données à pH 7,0). Globalement, le pH du milieu de culture est stable au cours du

temps. Au vu des données pH acquises dans le cadre du projet PHYMIA 1 (Coroller *et al.*, 2014), une variation de pH inférieure à 0,5 unité pH par rapport à la valeur de pH cible est jugée comme acceptable. A titre d'information, la quantité d'acide carbonique dissous est plus importante à pH 7,0 qu'à 4,7, il est donc plus difficile d'ajuster le pH à 7,0 qu'à 4,7.

Tableau 19. Récapitulatif des valeurs moyennes de pH (valeurs moyennes sur trois mesures avec intervalles de confiance) du milieu de culture après quelques jours d'exposition au mélange gazeux et à la fin de l'expérience.

CO ₂ testé (%)	Mesure pH 4,7		Mesure pH 7,0	
	après quelques jours d'exposition	à la fin de l'expérience	après quelques jours d'exposition	à la fin de l'expérience
0	4,63 ± 0,06	-	7,03 ± 0,12	-
10	4,65 ± 0,04	4,59 ± 0,04	7,15 ± 0,08	7,19 ± 0,08
20	4,67 ± 0,06	4,68 ± 0,02	6,89 ± 0,10	6,84 ± 0,08
30	4,62 ± 0,04	4,72 ± 0,06	6,84 ± 0,12	6,86 ± 0,06
40	4,70 ± 0,04	4,67 ± 0,10	6,75 ± 0,08	6,87 ± 0,10
50	4,68 ± 0,02	4,63 ± 0,02	7,03 ± 0,18	7,03 ± 0,08
60	4,74 ± 0,06	4,61 ± 0,00	6,93 ± 0,10	7,05 ± 0,06
70	4,72 ± 0,08	4,69 ± 0,02	6,95 ± 0,10	7,32 ± 0,12

IV. Références

- Abellana, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Nielsen, P. V. (2000). Effect of modified atmosphere packaging and water activity on growth of *E. amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* on a sponge cake analogue. *Journal of Applied Microbiology*, *88*(4), 606–616. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00999.x>
- Coroller, L., Rigalma, K., & Dantigny, P. (2014). Projet PHYMIA.01 Modélisation prédictive de la germination et de la croissance par l'étude éco-physiologique de moisissures et de levures d'intérêt alimentaire.
- Doyon, G., Gagnon, J., Lafontaine, D., Desilets, C., & Champagne, C. P. (1997). The effect of carbon dioxide on the growth of *Penicillium camemberti*. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, *15*, 291–297.
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966a). " *Scopulariopsis brevicaslis* " bainier, ou mieux " *Scopulariopsis fusca* " zach, agent des taches superficielles brun violettes des fromages à pâte molle. *Le Lait*, *46*(455–456), 241–253. <https://doi.org/10.1051/lait:1966455-45612>
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966b). *Cladosporium herbarum* link, agent tardif de "bleu" sur les fromages à pâte molle, et spécialement le Camembert. *Le Lait*, *458*.
- Jacquet, J., & Desfleurs, M. (1966c). Etude d'un nouvel accident de "bleu" en fromagerie de Camembert. *Le Lait*, *46*(459–460), 599–610. <https://doi.org/10.1051/lait:1966459-46024>
- Khoshgozaran, S., Azizi, M. H., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: A review. *Dairy Science and Technology*, *92*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0044-3>
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J. D., & Brugère, H. (1999). Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Medecine Veterinaire*, *150*(5), 413–430.
- Nguyen Van Long, N., & Dantigny, P. (2016). *Fungal Contamination in Packaged Foods* (pp. 45–63). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00004-8>
- Nguyen Van Long, Nicolas, Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K., & Mounier, J. (2017). Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of fungi from dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02109>
- Phillips, C. A. (1996). Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, *31*(6), 463–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, *68*(1–2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00487-1)
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, *132*(2–3), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>

Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2010). Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology*, *143*(3), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.030>

Chapitre 4 : Impact du chlorure de sodium et du dioxyde de carbone sur la germination des spores et la croissance radiale de *Penicillium camemberti*

I. Introduction

Penicillium camemberti est une flore d'intérêt technologique utilisée pour affiner les fromages à pâte molle et croûte fleurie. Cette espèce contribue aux propriétés organoleptiques des fromages par la production de composés volatils (arômes) issus de ses activités protéolytique et lipolytique (Molimard and Spinnler, 1996; Spinnler, 2004). Une étude récente a montré qu'il existait deux variétés au sein de l'espèce *Penicillium camemberti*. La variété *camemberti* est retrouvée sur le Camembert et le Brie tandis que la variété *caseifulvum* est retrouvée sur d'autres fromages comme le Saint-Marcellin et la Rigotte de Condrieu (Ropars *et al.*, 2020b, 2020a). De plus, les souches de la variété *camemberti* forment des thalles de couleur blanche et sont capables de produire de l'acide cyclopiazonique tandis que les souches de la variété *caseifulvum* forment des thalles de couleur verte / grise et ne sont pas capables de produire de l'acide cyclopiazonique.

La germination des spores est une étape clé dans le développement des moisissures car elle précède l'apparition d'un mycélium visible (Dantigny *et al.*, 2006, 2005, 2003). Malgré son importance, cette étape est beaucoup moins étudiée que la prolifération mycélienne car l'acquisition des données est davantage consommatrice en temps et énergie. Pourtant, l'étude de cette réponse biologique est nécessaire car elle pourrait permettre de mieux contrôler le développement de *Penicillium camemberti* et ainsi favoriser un recouvrement rapide de la surface des fromages. Dans ce cas, le risque de contamination et d'implantation de microorganismes indésirables à la surface des fromages comme les espèces appartenant au genre *Mucor* responsables du phénomène « poil de chat » serait réduit (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999).

L'objectif de cette étude est de répondre à la question : « Quel est l'impact du chlorure de sodium et du dioxyde de carbone sur la germination des spores et la croissance radiale de *Penicillium camemberti* ? ». Cette étude a été divisée en trois étapes qui ont consisté à : (i) acquérir des données de germination de spores et de croissance radiale pour deux souches de *Penicillium camemberti* sur milieu solide en présence de chlorure de sodium (NaCl) et de dioxyde de carbone (CO₂), (ii) utiliser des modèles mathématiques pour décrire la réponse des moisissures à la diminution de l' a_w et à l'augmentation de la pression partielle du CO₂ et (iii) réaliser des analyses statistiques pour voir si les deux souches qui appartiennent à la même espèce mais qui sont génétiquement distantes présentent les mêmes réponses aux variations des conditions environnementales. Cette dernière étape permettra de voir s'il existe une variabilité intra-spécifique au sein de l'espèce *Penicillium camemberti*. Des études précédentes ont mis en évidence l'existence d'une variabilité intra-spécifique notamment chez *Penicillium roqueforti* et *Penicillium nalgiovense* (Ludemann *et al.*, 2004; Nguyen Van Long *et al.*, 2021). Toutes les souches étudiées ne présentant pas la même valeur minimale d' a_w nécessaire à la prolifé-

ration mycélienne (valeur observée ou estimée). Dans le cadre de cette étude, les deux processus biologiques impliqués dans le développement des moisissures (germination des spores et croissance radiale) ont été étudiés.

II. Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti*

Article soumis au journal *Food Microbiology*.

Valle Marion ^{a,b}, Nguyen Van Long Nicolas ^b, Jany Jean-Luc ^c, Koullen Loona ^a, Rigalma Karim ^c, Vasseur Valérie ^c, Huchet Véronique ^b, Coroller Louis ^a

^a Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

^c Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29280 Plouzané, France

***Corresponding authors**

Mailing Address: Louis Coroller, Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

E-mail: louis.coroller@univ-brest.fr

Highlights

- No conidial germination or fungal growth was observed at a rate of water activity (a_w) of 0.84
- 100% of conidia germinated at 70% CO₂ (= 0.35 mM carbonic acid)
- Around 40% CO₂ (= 0.20 mM carbonic acid) reduced fungal growth by 50%
- Intraspecific variability of both strains of *Penicillium camemberti* was small
- A bacterial model was used to describe the impact of carbonic acid on $1/\tau$ and μ

Abstract

Penicillium camemberti is a domesticated species adapted to the dairy environment, which is used as adjunct cultures to ripen soft cheeses. A recent population genomics analysis on *P. camemberti* revealed that *P. camemberti* is a clonal lineage with two varieties almost identical genetically but with contrasting phenotypes in terms of growth, color, mycotoxin production and inhibition of contaminants. The variety *camemberti* isolated from Camembert and Brie cheeses, and variety *caseifulvum*, mainly encountered on other cheeses like Saint-Marcellin and Rigotte de Condrieu. This study aimed to evaluate the impact of water activity (a_w) reduced by sodium chloride (NaCl) and the increase of carbon dioxide (CO₂) partial pressure, on conidial germination and fungal growth of two strains of *P. camemberti*, one strain pertaining to each variety. Mathematical models were used to describe the responses of *P. camemberti* strains to both abiotic factors. The results showed that these genetically distant strains had similar responses to increase in NaCl and CO₂ partial pressure. The estimated cardinal values were similar between the strains. Likelihood ratio tests were performed and showed that all estimated cardinal values were significantly different for radial growth. These results suggest that intraspecific variability could be more exacerbated during fungal growth compared with conidial germination, especially in terms of macroscopic morphology. Indeed, var. *caseifulvum* seemed to be more sensitive to an increase of CO₂ partial pressure, as shown by the fungal morphology, with the occurrence of irregular outgrowths, while the morphology of var. *camemberti* remains circular. These data could make it possible to improve the control of fungal development as a function of salt and modified atmosphere packaging. These abiotic factors could serve as technological barriers to prevent spoilage and increase the shelf life of cheeses. The present data will allow more precise predictions of fungal proliferation as a function of salt and modified atmosphere packaging, which are significant technological hurdles in cheese production.

Keywords

cheese, intraspecific variability, water activity, modified atmospheres, predictive mycology

1. Introduction

In the dairy industry, *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* are used as adjunct cultures to produce soft cheeses such as Camembert. A recent study on *P. camemberti* showed that a first domestication event led to the emergence of *Penicillium bifforme*, also occurring in the cheese environment (on Tommes or fresh goat cheeses), which diverged from the wild species *Penicillium fuscoglaucum*, and that a second and more recent domestication event led to the emergence of the *P. camemberti* lineage from *P. bifforme* (Ropars et al., 2020a, 2020b). Ropars et al. (2020b) identified two differentiated genetic groups corresponding to two varieties of *P. camemberti*: (i) var. *camemberti* and (ii) var. *caseifulvum*. *Penicillium camemberti* var. *camemberti* isolates have been mainly obtained from Camembert and Brie and are able to produce cyclopiazonic acid. *Penicillium camemberti* var. *caseifulvum* has mainly been isolated from other types of cheeses such as Saint Marcellin or Rigotte de Condrieu. Its thallus is gray-green in color and was reported to be unable to produce cyclopiazonic acid (Ropars et al., 2020b).

Penicillium camemberti produces several enzymes such as lipases, proteinases, and peptidases, which catabolize fatty acids, proteins, peptides, or amino acids. These lipolytic and proteolytic activities contribute to the organoleptic properties (flavor, odor, taste) of cheeses through the production of aromatic volatile compounds such as methyl ketones, lactones, alcohols, aldehydes, and amines (McSweeney, 2004; Molimard and Spinnler, 1996; Spinnler, 2004). The volatile flavor production by *P. caseifulvum* was studied and compared with the one of *P. camemberti* in a previous study, which suggested that *P. caseifulvum* could be used as a new starter culture in dairy industry (Larsen, 1999). However, several taste defects related to *P. camemberti* have also been reported (Le Bars-Bailly et al., 1999). Bitterness and rancidness can occur due to excessive acid protease activity and lipolytic activity, respectively. Other defects can arise linked to the production of styrene and 1-octen-3-ol. In addition, *P. caseifulvum* was identified as a blue cheese spoiler (Van Den Tempel and Nielsen, 2000), notably with the production of yellow metabolites at low pH (Suhr et al., 2002). These phenomena suggest that the selection of specific and suitable strains for traits beneficial to cheese production is important

and necessary to control *P. camemberti* development in cheeses.

Controlling the development of filamentous fungi by abiotic factors allows one to standardize cheese making. Therefore, it can maintain homogeneous organoleptic properties between different production days and might also contribute to prolonging the shelf life by preventing spoilage by undesired fungi. Water activity (a_w) is recognized as the most important factor affecting mold growth, followed by temperature (Dagnas and Membré, 2013). Numerous types of cheese production include a salting step with sodium chloride (NaCl) during the making process. Salt contributes to the organoleptic properties of cheeses and could also help to protect the cheese against undesirable microorganisms by decreasing the a_w of the cheese surface (Guinee and Fox, 2017). One previous study showed the impact of a_w reduction with glycerol as the solute on conidial germination of *P. camemberti*, while no data were available for NaCl as an a_w depressor (Kalai et al., 2017). Furthermore, only a few data are available on the impact of a_w reduction with glycerol and NaCl on the radial growth of *P. camemberti* (Casquete et al., 2018; Kalai et al., 2017; Leggieri et al., 2018, 2016), while mold-ripened cheeses like Camembert and Brie undergo a salting step to reach an a_w close to 0.97 a_w (Guinee and Fox, 2017).

Cheeses can be stored in modified atmosphere packaging (MAP) that contains nitrogen (N_2) and high levels of carbon dioxide (CO_2) (Khoshgozaran et al., 2012; Phillips, 1996; Rodriguez-Aguilera et al., 2011). Regarding gas mixtures, only one study has been performed on *P. camemberti* growth (Doyon et al., 1997), while it was reported that the atmospheric composition of the ripening room could affect *P. camemberti* physiology (respiration, proteolysis) and cheese color (Leclercq-Perlat et al., 2006; Picque et al., 2006). The current study assessed the effect of NaCl and CO_2 partial pressure on conidial germination and radial growth of two strains of *P. camemberti* species belonging to *camemberti* and *caseifulvum* varieties. The objective was to determine whether the two strains, pertaining to two varieties of the same species, showed the same responses to variations in environmental factors. For this, a predictive mycology approach was used to estimate cardinal values for conidial germination and fungal growth of the two strains and to compare their fungal morphology.

2. Material and methods

2.1. Fungal strains

Two strains of *P. camemberti* were selected for this study: *P. camemberti* var. *camemberti* UBOCC-A-113011, isolated from soft cheese and provided by the Université de Bretagne Occidentale Culture Collection (UBOCC; University of Western Brittany, Plouzané, France), and *P. camemberti* var. *caseifulvum* ESE 00019, isolated from raw goat milk cheese (“Sein de nounou”) and provided by the Ecology, Systematics and Evolution laboratory in Orsay. Both strains were stored on potato dextrose agar (PDA, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA, pH 5.6, 0.995 a_w) medium at 8°C after growth.

2.2. Conidia production

Conidia were harvested from cultures obtained on PDA after a 7-day incubation at 25°C in the dark. Conidial concentrations were estimated using a hemocytometer (Malassez, Preciss, Paris, France). For all NaCl experiments, fresh conidia were collected by flooding cultures with a sterile solution containing 0.01% (v/v) Tween 80 and NaCl to reach the a_w of the agar medium to be inoculated. For the experiments on the effects of CO₂ partial pressure, fresh and frozen conidia were used for germination and radial growth experiments, respectively. For the *P. camemberti* var. *camemberti* strain, a preliminary comparison showed no differences between fresh and frozen inoculum in optimal or suboptimal growth conditions (data not shown). Fresh conidia were collected by flooding cultures with a sterile solution containing Tween 80 at 0.01% (v/v). For growth experiments, 15% glycerol was added to the suspensions prior to storage at -80°C.

2.3. Germination and growth media

Germination experiments were performed on potato dextrose broth (PDB, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA) and agar (Biomérieux, Marcy-l’Etoile, France).

For all NaCl experiments, the methods used to adjust the a_w and make culture media with pH at 5.3 were similar to those described in a previous study (Valle et al., 2022). NaCl (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) was added to the media to reach the desired a_w according to the Stokes-Robinson equation for conversion of NaCl percentage into a_w (Robinson and Stokes, 1965). Eleven a_w levels were obtained, ranging from 0.840 to 0.995 a_w (0.840, 0.862, 0.883, 0.902, 0.919, 0.935, 0.950,

0.964, 0.977, 0.988, and 0.995 a_w).

For all CO₂ partial pressure experiments, the dissociation of carbonic acid was taken into account because it decreases the pH of the culture medium. This phenomenon depends on pH and temperature, and dissolution of CO₂ in water has been reported to be favored at low temperature and high pH (Couvert et al., 2017). The impact of pH on radial growth of the selected strains was previously studied (data not shown), but a pH of 4.7 did not seem to have a significant impact on radial growth of the selected strains. Therefore, culture media were adjusted with HCl solution (0.1 M) to obtain pH 4.7 when exposed to the modified atmosphere, using a method described in a previous study (Couvert et al., 2017). The experimental conditions (pH 4.7 and temperature of 25°C) were selected to limit the dissolution of CO₂ and they kept stable during all experiment duration. Eight partial pressures of CO₂ (I5100M14R0A000, carbon dioxide, Air Liquide S.A. Paris, France) were tested: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70% with O₂ partial pressure kept at 5% by completing the mixture with N₂ (I4001M20R2A000, azote, Air Liquide S.A. Paris, France). All gas mixtures were made in scuba tanks (18 L, 230 bars, Aqualung, Carros, France).

For germination experiments, 55 mm Petri dishes were filled to the brim with culture medium to facilitate microscopic examination as described in previous studies (Nguyen Van Long et al., 2017a, 2017b). For radial growth experiments, 90 mm Petri dishes filled with 22 mL of culture medium were used.

2.4. Medium inoculation and experimental setup for germination and growth

For germination experiments, fresh conidia suspension was diluted to 10⁵ conidia / mL, then 36 µL of the conidia suspension were spread on the surface of culture medium (3 technical replicates by level of NaCl and CO₂ partial pressure) corresponding to approximately 1 conidium / mm². For radial growth experiments, conidia suspension was diluted to 10⁶ conidia / mL, then 10 µL of the conidia suspension were deposited on the centers of Petri dishes (4 technical replicates by tested level).

For all NaCl experiments, the Petri dishes were incubated at 25°C in plastic boxes (34 x 25 x 12 cm) containing 200 mL of a solution at the same a_w as the tested medium in order to avoid desiccation of

the agar plate, as described in a previous study (Valle et al., 2022). All Petri dishes were sealed with parafilm.

For the CO₂ partial pressure experiments, the parafilm used to seal the Petri dishes was perforated to improve gas diffusion whilst limiting spore dispersion outside the Petri dishes.

For the germination experiments with CO₂ partial pressure, the Petri dishes were placed inside stainless steel anaerobic jars (3.6 liters) with two gas ports (3 Petri dishes per anaerobic jar).

The anaerobic jars were flushed twice with 90 L of gas mixture, with 5 minutes between the two flushes. The anaerobic jars were then placed into an incubator at 25°C. The gas composition of each anaerobic jar was measured with a gas analyzer (Vigaz canal 120-II, VISCIANO, Saint Genis Pouilly, France) before opening to count the germinated spores on the Petri dishes.

For the radial growth experiments with CO₂ partial pressure, the Petri dishes were placed in a desiccator that was used as a hermetic enclosure (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), connected to a scuba tank containing the gas mixture tested. An electronic system (Arduino card) (506-7187, RS Components SAS, Beauvais, France) connected to solenoid valves (370-0078, RS Components SAS, Beauvais, France) was developed to regularly renew the gas mixture in the modified atmosphere cabinet by injecting 18 liters of gas mixture each hour. The gas mixture in the modified atmosphere chamber was monitored daily using the gas analyzer. A box containing water was placed in the modified atmosphere cabinet to keep the relative humidity stable and limit the desiccation of the agar plates.

2.5. Conidial germination and radial growth assessment

Germination experiments were performed using the method previously described in Nguyen Van Long et al. (2017a, 2017b). The evaluation of conidial germination (with a minimum of 100 counted conidia) was performed with inverted microscope (Olympus IX73) at 10X magnitude without opening the Petri dishes. Conidia were considered germinated when the length of the germ tube was greater than or equal to the diameter of the swollen conidia (Dantigny et al., 2006). For the NaCl experiments, germination was assessed repeatedly on the same Petri dish during the time of incubation, considering

one plate of each replicate (Nguyen Van Long et al., 2017a). For the CO₂ partial pressure experiments, one jar containing the three replicated plates was opened at each sampling time to avoid an impact of atmospheric variation on spore germination.

Radial growth in the NaCl experiments was assessed by measuring thallus diameters in two directions with a decimeter over a 70-day maximum storage period, as previously described in Valle et al. (2022).

For CO₂ partial pressure experiments, the enclosure was removed from the incubator and placed in a Captair Pyramid portable glove bag (Erlab, Val-de-Reuil, France). The Captair Pyramid was flushed three times with the tested gas mixture (36 liters of gas mixture by flush) before opening the enclosure and measuring the thallus diameters in two directions using a precision decimeter.

2.6. Determination of total carbonic acid concentration

The total concentration of carbonic acid was determined as the difference in HCl concentration between the control (0% CO₂ partial pressure) and the treatment tested (for example, 10% CO₂ partial pressure).

First, Equation 1 was used:

$$C_a V_a = C_b V_b \quad (1)$$

where C_a corresponds to the concentration of the HCl solution (= 0.1 M), V_a corresponds to the volume of HCl solution added to reach pH 4.7 after exposure to the gas mixture, and C_b corresponds to the concentration of HCl per liter (= V_b) of culture medium.

For 0% CO₂ partial pressure, $C_b = (9.10^{-3} * 0.1) / 1 = 0.9$ mM HCl.

For 10% CO₂ partial pressure, $C_b = (8.510^{-3} * 0.1) / 1 = 0.85$ mM HCl.

Then, the difference between the two levels was calculated to find the total concentration of carbonic acid:

0.9 mM HCl - 0.85 mM HCl = 0.05 mM HCl = 0.05 mM of total carbonic acid.

For 10% CO₂ partial pressure, the total carbonic acid concentration was, therefore, 0.05 mM.

2.7. Data treatment and statistical analyses

2.7.1. Conidial germination and radial growth modeling

Conidial germination was expressed as the percentage of germinated conidia $P_{(t)}$ (%) as a function of incubation time t (h) and was modeled using a primary model (Equation 2) (Dantigny et al., 2011; Nguyen Van Long et al., 2017a,2017b) to estimate the primary parameters:

$$P_{(t)} = P_{max} \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau}\right)^d} \right) + \varepsilon_i \quad (2)$$

where $P_{(t)}$ is the percentage of germinated conidia (%), t is the incubation time (hours), P_{max} is the maximum percentage of germinated conidia (%), τ is the time when P is equal to half of P_{max} , corresponding to the median germination time (hours), d is a shape parameter (without unity), and ε_i is the residual error.

Radial growth was expressed as the size of thallus radius $r_{(t)}$ (mm) as a function of incubation time t (days) and was modeled using a primary model (Equation 3) (Dagnas & Membré, 2013; Nguyen Van Long et al., 2017a; Valle et al., 2022) to estimate the primary parameters:

$$r_{(t)} = \begin{cases} r_{(0)} + \varepsilon_i & \text{if } t \leq \lambda \\ r_{(0)} + \mu \cdot (t - \lambda) + \varepsilon_i & \text{if } t > \lambda \end{cases} \quad (3)$$

where $r_{(t)}$ is the thallus radius (mm), t is the incubation time (days), λ is the latency (days), μ is the radial growth rate (mm.day⁻¹), and ε_i is the residual error. In this study, the radius $r_{(0)}$ was fixed at 3 mm, corresponding to the size of the drop deposited.

2.7.2. Modeling the effect of water activity and carbon dioxide on primary parameters

For the NaCl experiments, data were fitted with two models (data not shown) described in a previous study (Valle et al., 2022). Data fitting was compared using the Akaike information criterion (AIC). The most suitable model, indicated by the lowest AIC value, was used for the present modeling.

The reciprocal of the median germination time (τ^{-1} , h⁻¹) corresponding to the time required for germination of 50% of viable conidia able to germinate was modeled as a function of water activity

(a_w), using a model developed to demonstrate the effect of a_w on mold growth (Equation 4) (Nguyen Van Long et al., 2017a; Rosso & Robinson, 2001):

$$\sqrt{\frac{1}{\tau}} = \sqrt{\frac{1}{\tau_{opt}} \cdot CMR_n(a_w)} + \varepsilon_{ii} \quad (4)$$

$$CMR_n(a_w) = \begin{cases} 0 & a_w \leq a_{wmin} \\ \frac{(a_w - a_{wmin})^n \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{wmin})^{n-1} \cdot \{(a_w - a_{wmin}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot [(n-1) \cdot a_{wopt} + a_{wmin} - n \cdot a_w]\}} & a_{wmin} < a_w < a_{wmax} \\ 0 & a_w > a_{wmax} \end{cases}$$

where a_{wmin} , a_{wopt} , and a_{wmax} are the cardinal a_w values corresponding to the minimum, optimum, and maximum a_w values, respectively. In this study, the a_{wmax} parameter was fixed at 1.000, τ_{opt} is the value of τ when a_w is equal to a_{wopt} , n (without units) is a shape parameter, equal to 2 in our case, and ε_{ii} is the residual error.

The radial growth rate (μ , mm.day⁻¹) was also modeled as a function of a_w , using Equation 4 in which τ^{-1} was substituted by μ . In this case, μ_{opt} is the value of μ when a_w is equal to a_{wopt} .

For the CO₂ partial pressure experiments, data were fitted with two models (data not shown) described in previous studies (Nguyen Van Longet al., 2017b; Presser et al., 1997). Data fitting were compared by using AIC. The most suitable model, indicated by the lowest AIC value, was used for the present modeling.

The reciprocal of the median germination time (τ^{-1} , h⁻¹) was modeled as a function of carbon dioxide partial pressure with a model developed to demonstrate the effect of organic acid on bacterial growth (Equation 5) (Presser et al., 1997):

$$\sqrt{\frac{1}{\tau}} = \sqrt{\frac{1}{\tau_{opt}} \cdot CMP_n(CO_2)} + \varepsilon_{ii} \quad (5)$$

$$CMP_n(CO_2) = \left(1 - \frac{CO_2}{MIC}\right)^\alpha \text{ with } CO_{2\ 50} = MIC \cdot \left(\frac{1}{2}\right)^{1/\alpha}$$

where $CO_{2\ 50}$ is carbon dioxide partial pressure (%) where $\tau = \tau_{opt} * 2$, α is the shape parameter (without unit), MIC is the minimum inhibitory carbon dioxide partial pressure (%) for germination, and ε_{ii} is the residual error.

The radial growth rate (μ , mm.day⁻¹) was also modeled as a function of carbon dioxide partial pressure with Equation 5 in which τ^{-1} was substituted by μ . In this case, $CO_{2\ 50}$ is the carbon dioxide partial pressure (%) where μ was equal to half of μ_{opt} , and MIC is the minimum inhibitory carbon dioxide partial pressure (%) for fungal growth.

The maximum percentage of germinated conidia (P_{max} , %) was modeled as a function of a_w , using a model described in a previous study (Equation 6) (Nguyen Van Long et al., 2017a):

$$P_{max(a_w)} = 1 - \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{a_w}{a_{w50}} \right)^k} \right) + \varepsilon_{ii} \quad (6)$$

where P_{max} is the maximum percentage of germinated conidia (%) estimated with Equation 1, $a_{w\ 50}$ is the a_w value at which only 50% of the conidial population was able to germinate, k (without unity) is a shape parameter, and ε_{ii} is the residual error.

2.7.3. Statistical analysis

The models were fitted by minimizing the sums of squares of the residuals (MATLAB *lsqcurvefit* function, MATLAB 2018, The Mathworks Inc., USA). Linear approximations and calculations were performed to estimate the confidence intervals with a risk $\alpha = 0.05$ (MATLAB *nlparci* function). The fitting performances of models were evaluated based on root mean square error (RMSE).

The secondary model parameters estimated for the two strains were compared using likelihood ratio tests (LRT) as described in previous studies (Nguyen Van Long et al., 2017a; Trunet et al., 2015). First, the models were independently fitted to estimate secondary parameters corresponding to an unconstrained model (called U). Then, models were fitted for the case in which one parameter was fixed for both strains, corresponding to a constrained model (called C). Finally, the fitting of U and C models was compared using the SL statistic, as defined in Equation 7:

$$SL = n \cdot \ln \left(\frac{RSSC}{RSSU} \right) \quad (7)$$

where n corresponds to the number of data and $RSSC$ and $RSSU$ correspond to the residual sum of squares of the C and U models, respectively. When the fit quality of the C model increases, SL

increases, and when n tends to infinity, the limiting distribution of SL is a Chi-square test (Chi²) distributed with degrees of freedom equal to the number of constrained parameters. If SL is lower than the value in the Chi² table ($\alpha = 0.05$), the difference in the fitting of the models is not considered significant. Consequently, the parameter studied is not significantly different from the constrained value.

3. Results

3.1. Impact of water activity reduction on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti*

3.1.1. Impact of the reduction of water activity on conidial germination

Some conidial germination was observed at all NaCl concentrations except the lowest a_w level tested (i.e., $0.840 a_w$), for which no germination was observed after 70 days (Figure 1 a). In general, a decrease in a_w led to an increase in median germination time.

The $a_{w\ min}$ was estimated at $0.839 \pm 0.002 a_w$ for the var. *camemberti* strain and at $0.827 \pm 0.003 a_w$ the var. *caseifulvum* strain. The $a_{w\ opt}$ was estimated to be close to $0.985 a_w$ for both strains (Table 1). The $1/\tau_{opt}$ was estimated at $0.099 \pm 0.002 h^{-1}$, corresponding to a minimal median germination time of 10.1 h for the var. *camemberti* strain and $0.098 \pm 0.002 h^{-1}$ corresponding to 10.2 h for the var. *caseifulvum* strain (Table 1).

P_{max} was equal to 100% when the whole conidia population had germinated. At $0.862 a_w$ (the lowest a_w level with observed germination), the percentage of germinated conidia was between 81% and 86% for the var. *camemberti* strain after 36 days, whereas it was between 90% and 94% for the var. *caseifulvum* strain after 17 days (Figure 1 b). It was not possible to assess germination after these periods because the germ tubes extended into hyphae and hid non germinated conidia. The $a_{w\ 50}$, corresponding to the a_w level for which only 50% of conidia were able to germinate, was similar for the two strains, with estimated values between 0.855 and $0.856 a_w$ (Table 1). The shape parameter k is an indicator of heterogeneity within a conidial population. A high value of k corresponded to a high slope and a low dispersion of conidial germination. In the current case, the dispersion was low, suggesting that the time between the first and the last conidial germination was low and that the

conidia were able to germinate in a short time.

Statistical analyses (LRT) showed that the difference between the estimated $a_{w\ min}$ of the two strains was significant (despite a 0.012 a_w unit difference), while those for $a_{w\ opt}$, $1/\tau_{opt}$, $aw\ 50$ and k were not significant.

3.1.2. Impact of water activity reduction on radial fungal growth

No growth was observed after 70 days at the lowest a_w level tested (0.840 a_w) (Figure 1 d). For all the other NaCl conditions, a latency was followed by a linear growth of visible thallus. The duration of latency (λ) increased (Figure 1 c) and the radial growth rate (μ) decreased as the aw decreased (Figure 1 d). When the duration of latency was longer than the duration of the experiments (i.e., no visible growth at the end of the incubation period), the radial growth rate was not estimated. Latency was not always satisfactorily estimated; thus, it was represented but not modeled. The secondary modeling was performed only on radial growth rate values.

In the current study, $MINa_w$ corresponded to the minimal a_w for which growth was observed. The $MINa_w$ of both strains was 0.862 a_w , meaning that the minimum a_w required for growth was between 0.862 and 0.840 a_w . The estimations of cardinal values were similar for the two strains (Table 1). The estimated $a_{w\ min}$ values were slightly lower than the $MINa_w$ value. The aw_{opt} values were estimated to be above 0.980 a_w and the μ_{opt} values were estimated to be above 2.70 mm.day⁻¹ for both strains. Although all the estimated cardinal values of the two strains were very similar, statistical analyses (LRT) showed that all parameters were significantly different.

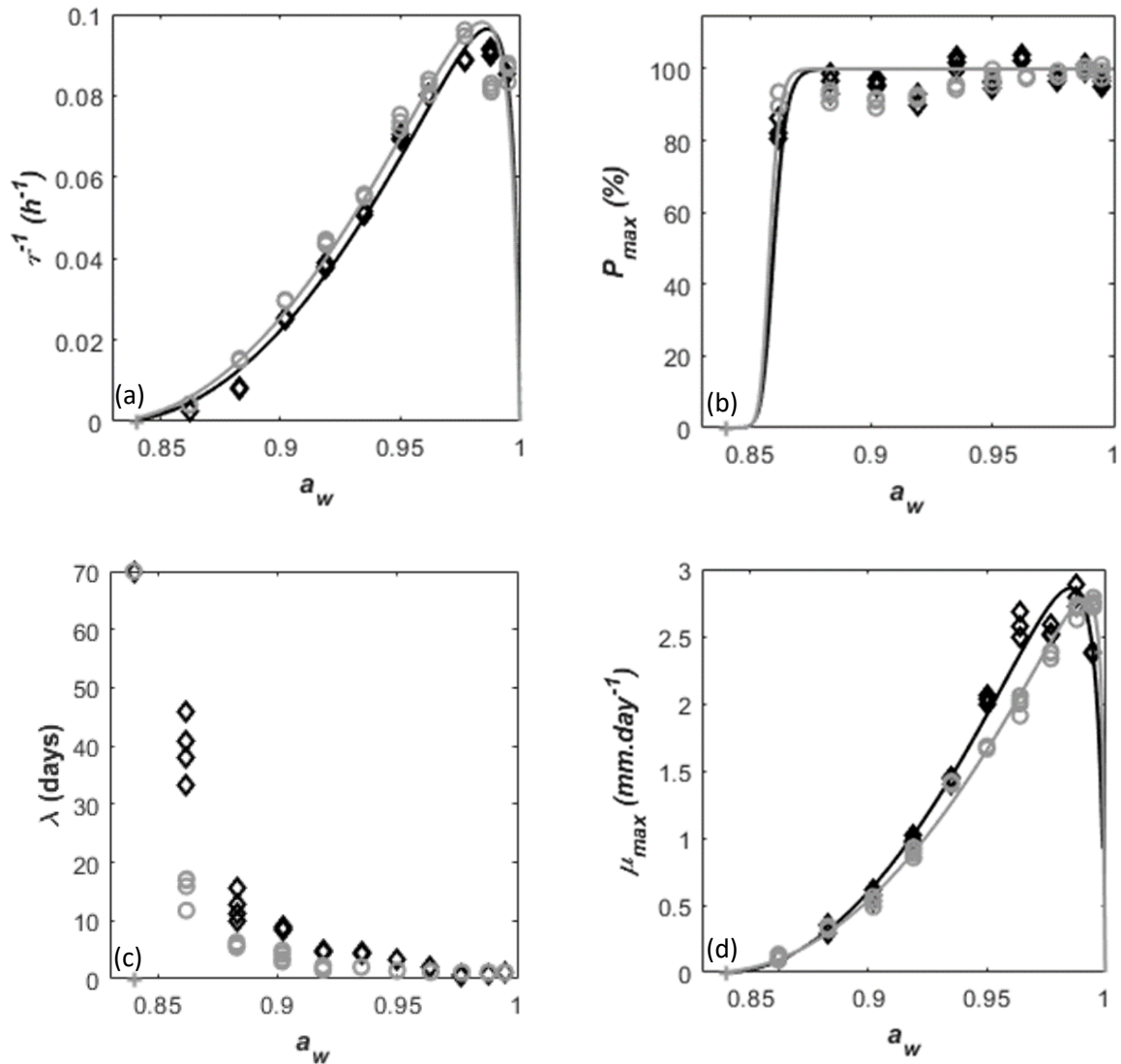


Figure 1. Influence of a_w reduction, obtained using NaCl in PDA medium at 25°C, on the reciprocal of the time required for germination of 50% of conidia able to germinate (a), the maximum percentage of germinated conidia (b), the latency (c), and the radial growth rate (d) of *P. camemberti* var. *camemberti* (\diamond) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (\circ). No germination or growth observed for either strain after 70 days (+). Data fitted with Equation 4 (a and d) and Equation 6 (b) for *P. camemberti* var. *camemberti* (—) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (—).

Table 1. Estimation of secondary model parameters (and confidence intervals, $\alpha = 0.05$) obtained by fitting equations to the reciprocal of the time required for germination of 50% of conidia able to germinate ($1/\tau$), the maximum percentage of germinated conidia (P_{max}), or the radial growth rate (μ_{max}) of two varieties of *P. camemberti* at 25°C in PDA medium. The accuracy of the model was evaluated using the room mean square error (RMSE). Results of the likelihood ratio test (LRT): (*) = significant, (NS) = non-significant.

Abiotic factor	Biological phenomenon	Figure	Equation	Parameter	<i>P. camemberti</i> var. <i>camemberti</i>	<i>P. camemberti</i> var. <i>caseifulvum</i>	LRT
NaCl	Conidial germination	1	4	$a_{w\ min}$	0.839 ± 0.002	0.827 ± 0.003	*
				$a_{w\ opt}$	0.985 ± 0.001	0.984 ± 0.001	NS
				$1/\tau_{opt} (h^{-1})$	0.099 ± 0.002	0.098 ± 0.002	NS
				RMSE	0.009	0.011	-
	Conidial germination	2	6	$a_{w\ 50}$	0.857 ± 0.006	0.856 ± 0.019	NS
				k	291 ± 372	364 ± 1203	NS
				RMSE	0.041	0.049	-
	Radial growth	4	4	$a_{w\ min}$	0.839 ± 0.001	0.834 ± 0.001	*
				$a_{w\ opt}$	0.985 ± 0.001	0.992 ± 0.001	*
				μ_{opt}	2.86 ± 0.03	2.78 ± 0.04	*
RMSE				0.0366	0.0352	-	
CO ₂	Conidial germination	5	5	CO ₂ 50 (%)	60.75 ± 1.52	65.08 ± 1.82	NS
				α	0.73 ± 0.04	0.87 ± 0.07	NS
				$1/\tau_{opt} (h^{-1})$	0.069 ± 0.001	0.074 ± 0.001	*
				RMSE	0.0030	0.0042	-
	Radial growth	8	5	CO ₂ 50 (%)	45.46 ± 1.19	36.92 ± 3.95	*
				α	1.20 ± 0.07	0.71 ± 0.11	*
				μ_{opt}	2.30 ± 0.05	1.83 ± 0.11	*
				RMSE	0.0333	0.0624	-

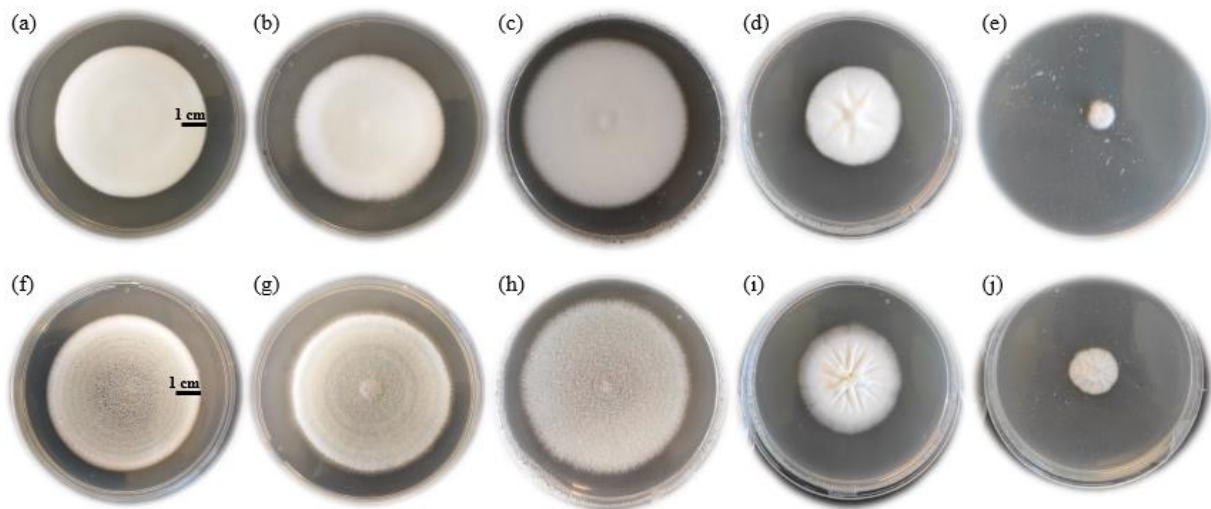


Figure 2. Impact of a_w reduction, obtained using NaCl in PDA medium at 25°C and pH 5.3, on the radial growth of *P. camemberti* var. *camemberti* (a to e) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (f to j). The levels represented are: 0% NaCl, corresponding to 0.995 a_w (a and f); 4% NaCl, corresponding to 0.977 a_w (b and g); 10% NaCl, corresponding to 0.935 a_w (c and h); 16% NaCl, corresponding to 0.883 a_w (d and i); and 18% NaCl, corresponding to 0.860 a_w (e and j). The black bar represents the scale (1 cm for all pictures).

3.2. Impact of carbonic acid concentration on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti*

3.2.1. Impact of carbonic acid on conidial germination

Regardless of the CO₂ partial pressure, a conidial germination was observed (Figure 3 a). An increase in CO₂ partial pressure led to an increase in the median germination time, corresponding to the time when 50% of the conidia had germinated. The estimations of cardinal values were similar for the two strains. The CO₂ 50, corresponding to the CO₂ partial pressure where $\tau = \tau_{opt} * 2$, was estimated above 60%. The shape parameter α was estimated at 0.73 and 0.87 for *camemberti* and *caseifulvum* varieties respectively, which is why the curves had a concave form (Table 1). The $1/\tau_{opt}$ was estimated at $0.069 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, corresponding to $\tau_{opt} = 14.5 \text{ h}$ for the var. *camemberti* strain, and $0.074 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$, corresponding for $\tau_{opt} = 13.5 \text{ h}$ for the var. *caseifulvum* strain (Table 1).

All conidia were able to germinate at the highest tested carbonic acid concentration (i.e., 70% CO₂ partial pressure), which is why the evolution of P_{max} is represented but not modeled (Figure 3 b).

Statistical analyses (LRT) showed that only $1/\tau_{opt}$ was significantly different between the strains.

3.2.2. Impact of carbonic acid on fungal growth

For all CO₂ partial pressure, a latency was followed by linear growth of the visible thallus. The duration of latency (λ) increased and the radial growth rate (μ) decreased when CO₂ partial pressure increased. The latency was not always satisfactorily estimated, so it was represented but not modeled (Figure 3 c). The secondary modeling was performed only on radial growth rate values. As for germination data, growth data were represented and modeled as a function of CO₂ partial pressure (Figure 3 d).

Regarding the estimations of cardinal values, CO_{2 50} corresponding to the CO₂ partial pressure where μ_{opt} was reduced by 50%, was estimated at 45.46 ± 1.19 % and 36.92 ± 3.95 % for *camemberti* and *caseifulvum* varieties respectively (Table 1). The shape parameter α was estimated at 1.20 ± 0.07 for var. *camemberti*, reflecting the concave curve shape and the higher impact of CO₂ partial pressure at high levels, while it was estimated at 0.71 ± 0.11 for var. *caseifulvum* due to the convex shape, which means there was a greater impact of CO₂ partial pressure at low levels (Table 1). The μ_{opt} was estimated above 2 mm.day⁻¹, with a value of 2.30 ± 0.05 mm.day⁻¹ for var. *camemberti* while it was estimated under 2 mm.day⁻¹ with a value of 1.83 ± 0.11 mm.day⁻¹ for var. *caseifulvum* (Table 1). Statistical analyses (LRT) showed that all estimated cardinal values were significantly different between strains.

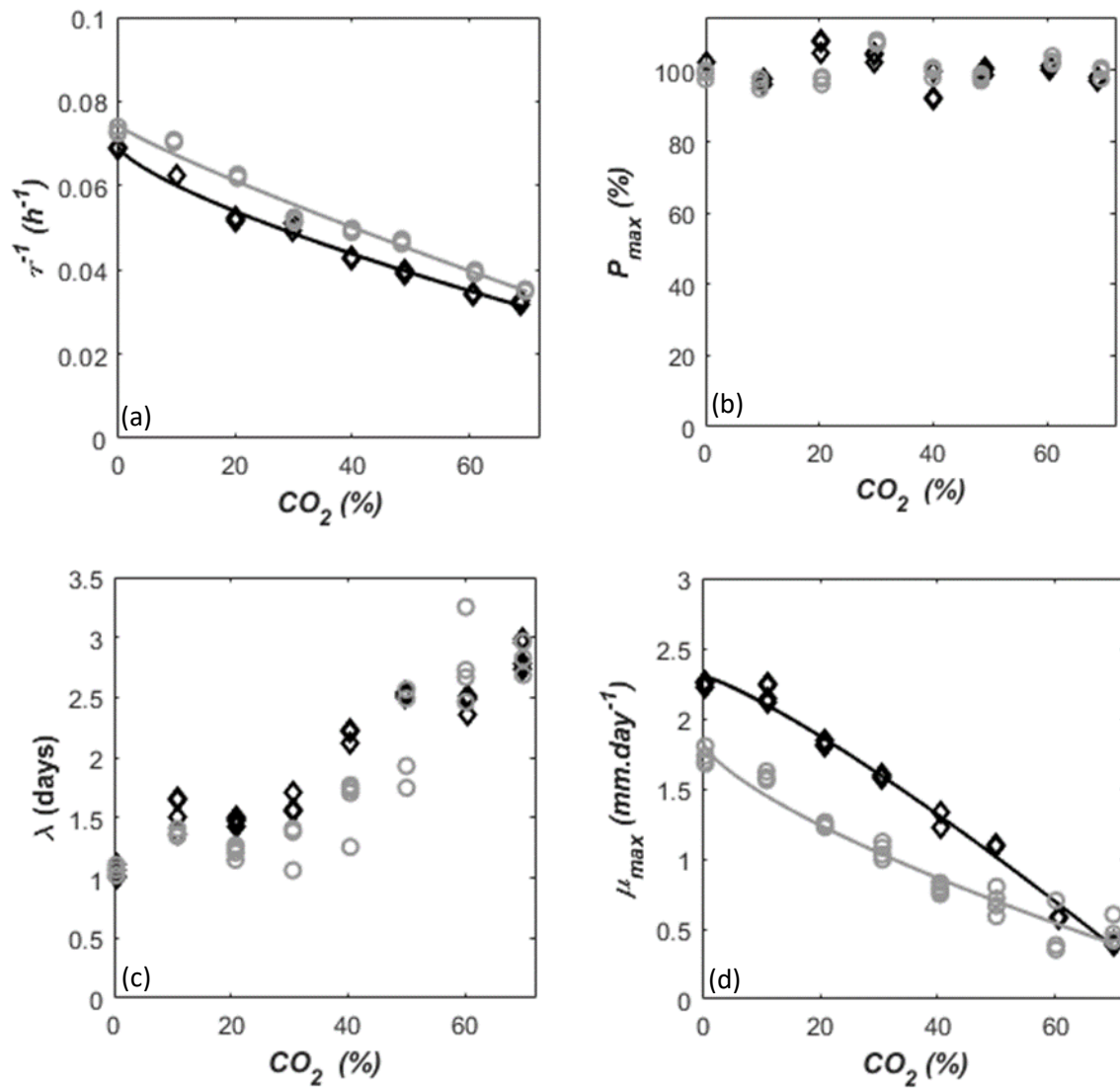


Figure 3. Influence of CO₂ partial pressure in PDA medium at 25°C on the reciprocal of the time required for germination of 50% of conidia able to germinate (a), the maximum percentage of germinated conidia (b), the latency (c), and the radial growth rate (d) of *P. camemberti* var. *camemberti* (◇) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (○). Data fitted with Equation 5 (a and d) for *P. camemberti* var. *camemberti* (—) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (---).

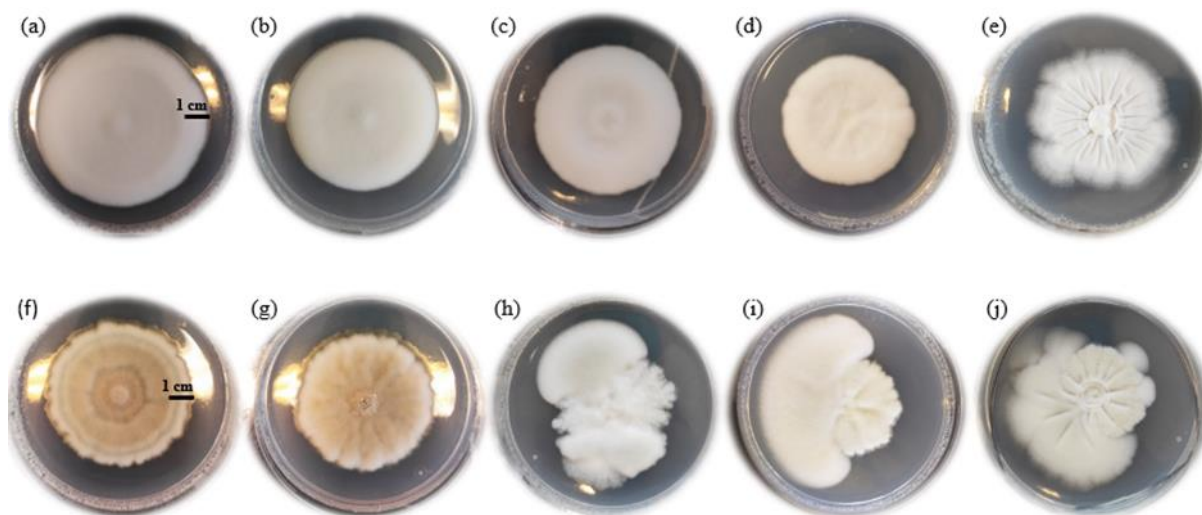


Figure 4. Impact of CO₂ partial pressure in PDA medium at 25°C and pH 4.7 on the radial growth of *P. camemberti* var. *camemberti* (a to e) and *P. camemberti* var. *caseifulvum* (f to j). The levels represented are 0% CO₂ (a and f); 10% CO₂ (b and g); 40% CO₂ (c and h); 50% CO₂ (d and i); and 70% CO₂ (e and j). The black bar represents the scale (1 cm for all pictures).

4. Discussion

The responses to a_w reduction with NaCl were equivalent for the two strains in terms of both conidial germination and fungal growth rate, as illustrated by the superposed curves in Figure 1 and corresponding phenotypes shown in Figure 2. The cardinal values for both strains were consistent with those of a previous study on the impact of a_w reduction with glycerol on conidial germination in the same strain of *P. camemberti* var. *camemberti* (Kalai et al., 2017), suggesting that the nature of the solute (ionic or non-ionic) does not impact the conidial germination of *P. camemberti*. Similarly, for fungal growth, the present NaCl cardinal values are consistent with the conclusions of a previous study on the effects of a_w (Valle et al., 2022).

Other previous studies determined the impact of NaCl on the growth of *P. camemberti* strain CBS 122399 (Leggieri et al., 2016, 2018) and highlight that experimental conditions could impact the results, thus hindering comparison among different experiments. Two studies were carried out at 20°C with different culture media: on malt extract autolysate agar medium, growth was observed at 0.83 a_w after 10 days, while no growth was observed on Czapek yeast agar medium at 0.87 a_w after 56 days (Leggieri et al., 2018, 2016). Similar observations were made with glycerol. One study showed that

fungal growth of *P. camemberti* on potato dextrose agar medium at 25°C could be observed for the lowest a_w tested (0.820 a_w) (Valle et al., 2022) while another study performed on cheese agar medium at 25°C showed that *P. camemberti* was able to grow at 0.900 a_w but not at 0.850 a_w (Casquete et al., 2018).

In the current study, the mean time of germination increased as a_w decreased. This phenomenon is commonly observed for several fungal species and is generally explained by the limitation of available water needed for conidia activation. As a consequence, conidia hydration and swelling would be slower at reduced a_w levels (Kalai et al., 2017; Nguyen Van Long et al., 2017a). Concerning the lowest a_w level for which germination was observed (i.e., 0.862 a_w), the percentage of conidia germinated was not equal to 100%. This phenomenon had already been observed for *Penicillium expansum* and *Penicillium roqueforti* at the lowest level of a_w with observed germination (Nguyen Van Long et al., 2017a) and highlights a limitation of the method used to follow conidial germination. Indeed, the experiments at 0.862 a_w did not last 70 days because the extension of germ tube hindered the observation of non-germinated conidia. In this case, the P_{max} parameter could have been overestimated.

For var. *camemberti*, the estimations of $a_{w\ min}$ were similar for conidial germination and fungal growth, with values of 0.839 a_w for both. This was previously observed for *P. roqueforti* for which the minimal a_w required for conidial germination and fungal growth was 0.83 a_w (Magan and Lacey, 1984). For var. *caseifulvum*, the estimation of $a_{w\ min}$ was lower for conidial germination than fungal growth, with estimated values of 0.827 and 0.834 a_w for conidial germination and fungal growth, respectively. This phenomenon could be explained by the fact that when the minimal a_w was close to the minimal a_w required for conidial germination; germination could occur, but it was not always followed by fungal growth. For example, *Penicillium brevicompactum* was able to germinate at 0.80 a_w , while the lowest a_w level with observed fungal growth was 0.82 a_w (Magan & Lacey, 1984) and *Penicillium verrucosum* was able to germinate at 0.80 a_w , while the lowest a_w level with observed fungal growth was 0.85 a_w (Pardo et al., 2006).

Several strategies have been described that help species resist a_w reduction. *Penicillium digitatum* and *Penicillium janczewkii* were reported to be able to accumulate glycerol, which is considered the most common compatible solute under salt stress (Hocking, 1986) and *Penicillium chrysogenum* was able to accumulate a cocktail of compatible solutes, including glycerol, glucose, erythritol, and arabitol after a hyperosmotic shock (Luard, 1982). In *Aspergillus sydowii*, the gene transcriptions involved in cell wall and plasma membrane remodeling were modified, suggesting they underwent composition changes under salt stress (Jiménez-Gómez et al., 2020). It was also reported that an increase of salinity induced oxidative stress in *A. sydowii* and that the expression of genes involved in defense mechanisms against oxidation increased under salt stress (Jiménez-Gómez et al., 2020). Further studies could be performed to determine which adaptive strategies are used by *P. camemberti*. Biochemistry and molecular biology methods could be used to determine the amount of compatible solutes accumulated in fungal cells and to determine whether genes involved in modification of cell structure (plasma membrane and cell wall) or in defense mechanisms against oxidation are overexpressed.

For CO₂ partial pressure experiments, the differences between the two strains were more marked than with NaCl. The μ_{opt} of var. *camemberti* was estimated above 2 mm.day⁻¹ while those of var. *caseifulvum* were estimated under 2 mm.day⁻¹. In addition, the growth curve of var. *camemberti* had a concave form, while that of var. *caseifulvum* had a convex form (Figure 3 d) and morphological differences were observed between the two strains (Figure 4). The diameter of the thallus of var. *camemberti* was circular while that of var. *caseifulvum* was not and showed outgrowths. These results suggest that a pH of 4.7 impacted the growth of var. *caseifulvum* more strongly than var. *camemberti*. Both varieties had a radial growth rate closed to 2.55 mm.day⁻¹ in PDA at pH 5.3. A decrease of pH 5.3 to 4.7 reduced the radial growth rate by 7% and 16% for var. *camemberti* and var. *caseifulvum* respectively (data not showed). It also seemed that var. *caseifulvum* was more sensitive to CO₂ partial pressure than var. *camemberti*.

Some observations on cheeses indicate that CO₂ partial pressure could impact *P. camemberti*

physiology (respiration, proteolysis) and ripened cheese appearance, sometimes causing cheese browning (Leclercq-Perlat et al., 2006; Picque et al., 2006). All conidia were able to germinate at the maximum percentage of CO₂ partial pressure (i.e. 70% CO₂ partial pressure), as observed in a previous study (Nguyen Van Long et al., 2017b). Furthermore, fungal growth was observed at the maximum percentage of CO₂ partial pressure (i.e. 70% CO₂ partial pressure). Only one study previously conducted on growth of *P. camemberti* showed that, after 19 days incubated at 10°C and 20% O₂, the growth of two *P. camemberti* strains was decreased by more than 50% at 30% CO₂ compared with control conditions at 0% CO₂ (Doyon et al., 1997). It was also reported that *Penicillium commune* (ancestor of *P. camemberti*) (Ropars et al., 2020a, 2020b) was able to grow not only in an atmosphere of 80% CO₂ and 20% O₂, but also in ones containing 20 or 40% CO₂ and 1 or 5% O₂ (Taniwaki et al., 2010, 2009, 2001). The production of cyclopiazonic acid was also observed to decrease in these atmospheres, but was not completely inhibited (Taniwaki et al., 2001).

Penicillium chrysogenum and *Penicillium digitatum* were reported to fix carbon from CO₂ through the citric acid cycle (Gitterman and Knight, 1952; Noble et al., 1958), the intermediates formed as a result of carbon fixing could be then used to synthesis of macromolecules. It has also been suggested that CO₂ could negatively impact several cellular mechanisms such as respiration, enzymatic reactions, cellular division and molecular flows (Daniels et al., 1985; Dixon and Kell, 1989; Doyon et al., 1997; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Stretton and Goodman, 1998). Indeed, CO₂ was able to penetrate more faster than O₂ into cells, this phenomenon could promote O₂ displacement by CO₂ (Daniels et al., 1985). Passive diffusion of CO₂ could also destabilize biological membranes when CO₂ interacts with membrane lipids and disrupt molecular flows through membranes. In addition, CO₂ induces a decrease of intracellular pH by its spontaneous hydration followed by its dissociation to form bicarbonate ions (HCO₃⁻) and protons (H⁺). It was recently suggested that bicarbonate ions from CO₂ were involved in *Mucor* dimorphism (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962a, 1962b, 1962c; Homa et al., 2022) and the increase of yeast virulence (Bahn et al., 2007; Bahn and Mühlischlegel, 2006; Granger et al., 1985; Mitchell, 2005; Sims, 1986). These compounds could impact the synthesis, structure, and activity of

fungus enzymes. Further studies could be performed with radioactive carbon to determine the mechanism(s) in which CO₂ is involved.

In the present experimental conditions, CO₂ partial pressure had a far greater impact than NaCl on conidial germination and radial growth. For both strains, τ_{opt} was estimated at around 10 hours for NaCl experiments, while it was estimated at around 14 hours for CO₂ partial pressure. Similarly, the μ_{opt} of both strains was estimated above 2.7 mm.day⁻¹ for the NaCl, while it was estimated at 2.30 ± 0.05 mm.day⁻¹ and 1.83 ± 0.11 mm.day⁻¹ for *camemberti* and *caseifulvum* varieties, respectively, for CO₂ partial pressure. These results suggest that the decrease in pH (5.3 for NaCl versus 4.7 for CO₂ partial pressure) could have an impact on both germination and growth. In addition, var. *caseifulvum* seemed to be more affected by CO₂ partial pressure than var. *camemberti*.

It would be interesting to perform experiments by combining several abiotic factors, as done previously by Haasum and Nielsen (1998) on several species of *Penicillium* including *Penicillium nalgiovense* and *Penicillium expansum*. For both these species, the factors with the greatest influence were a_w and CO₂, with fungal growth inhibition observed due to decreased a_w and increased CO₂. Another study showed that the growth of *P. caseifulvum* could be reduced by combining a_w and CO₂. After 14 days on cheese agar incubated at 10°C and 21% O₂, radial growth was 40.7 mm for 0% NaCl and 0% CO₂ but was 8.7 mm for 4% NaCl and 25% CO₂ (Van Den Tempel and Nielsen, 2000).

In conclusion, the present study contributes to improving predictive mycology tools by suggesting a suitable new model from a predictive microbiology model used to describe bacterial growth to assess the fungal response as a function of CO₂ partial pressure. In addition, our results showed that the responses to NaCl and CO₂ partial pressure were equivalent for these two genetically distant varieties of *P. camemberti*. To confirm this conclusion regarding intraspecific variability of *P. camemberti* growth response to NaCl and CO₂ partial pressure would, however, require further studies to be made with a larger number of strains in a similar manner to those performed on 10 to 29 strains to highlight the intraspecific variability of *P. nalgiovense* or *P. roqueforti* in relation to a_w (Ludemann et al., 2004; Nguyen Van Long et al., 2021).

Acknowledgements

The authors would like to thank their partners who support the PHYMIA 2 project: Bba Milk Valley, the *Conseils Régionaux de Bretagne et Pays de la Loire*, and the French Association for Research and Technology (ANRT) (CIFRE 2018/1395).

We would like to thank Dr. Jeanne Ropars and Pr. Henry-Eric Spinnler for the discussions and their expertise about this subject.

References

- Bahn, Y.S., Mühlischlegel, F.A., 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current Opinion in Microbiology* 9, 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.09.003>
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., Cardenas, M.E., 2007. Sensing the environment: Lessons from fungi. *Nature Reviews Microbiology* 5, 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1578>
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, J., 1962a. Assimilation of carbon dioxide and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 548–551.
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W.J., 1962b. Isolation, composition, and structure of cell walls of filamentous and yeast-like forms of *Mucor rouxii*. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 58, 102–119. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90822-3](https://doi.org/10.1016/0006-3002(62)90822-3)
- Bartnicki-Garcia, S., Nickerson, W.J., 1962c. Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of bacteriology* 84, 829–840. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.829-840.1962>
- Casquete, R., Benito, M.J., Córdoba, M. de G., Ruiz-Moyano, S., Galván, A.I., Martín, A., 2018. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. *Lwt* 89, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.053>
- Couvert, O., Guégan, S., Hézard, B., Huchet, V., Lintz, A., Thuault, D., Stahl, V., 2017. Modeling carbon dioxide effect in a controlled atmosphere and its interactions with temperature and pH on the growth of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. *Food Microbiology* 68, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.003>
- Dagnas, S.P., Membré, J.M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection* 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Daniels, J.A., Krishnamurthi, R., Syed, S.H., 1985. A Review of Effects of Carbon Dioxide on Microbial Growth and Food Quality. *Journal of Food Protection* 48, 532–537. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-48.6.532>
- Dantigny, P., Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., Roussos, S., 2006. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology* 108, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>

- Dantigny, P., Nanguy, S.P.M., Judet-Correia, D., Bensoussan, M., 2011. A new model for germination of fungi. *International Journal of Food Microbiology* 146, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.022>
- Dixon, N.M., Kell, D.B., 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 67, 109–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb03387.x>
- Doyon, G., Gagnon, J., Lafontaine, D., Desilets, C., Champagne, C.P., 1997. The effect of carbon dioxide on the growth of *Penicillium camemberti*. *Microbiologie - Aliments - Nutrition* 15, 291–297.
- Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F., Devlieghere, F., 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: The past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology* 117, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.018>
- Gitterman, C.O., Knight, S.G., 1952. Carbon dioxide fixation into amino acids of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of bacteriology* 64, 223–231. <https://doi.org/10.1128/jb.64.2.223-231.1952>
- Granger, D.L., Perfect, J.R., Durack, D.T., 1985. Virulence of *Cryptococcus neoformans*: Regulation of capsule synthesis by carbon dioxide. *Journal of Clinical Investigation* 76, 508–516. <https://doi.org/10.1172/JCI112000>
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. *Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Haasum, I., Nielsen, P.V., 1998. Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. *Journal of Applied Microbiology* 84, 451–460.
- Hocking, A.D., 1986. Effects of water activity and culture age on the glycerol accumulation patterns of five fungi. *Journal of General Microbiology* 132, 269–275. <https://doi.org/10.1099/00221287-132-2-269>
- Homa, M., Ibragimova, S., Szebenyi, C., Nagy, G., Zsindely, N., Bodai, L., Vágvölgyi, C., Nagy, G., Papp, T., 2022. Differential Gene Expression of *Mucor lusitanicus* under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Journal of Fungi* 8. <https://doi.org/10.3390/jof8040404>
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R.R., Sánchez-Carbente, M.D.R., Folch-Mallol, J.L., Pérez-Llano, Y., Gunde-Cimerman, N., Sánchez, N.D.C., Batista-García, R.A., 2020. Haloadaptative responses of *Aspergillus sydowii* to extreme water deprivation: Morphology, compatible solutes, and oxidative stress at nacl saturation. *Journal of Fungi* 6, 1–20. <https://doi.org/10.3390/jof6040316>
- Kalai, S., Anzala, L., Bensoussan, M., Dantigny, P., 2017. Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. *International Journal of Food Microbiology* 240, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.024>

- Khoshgozaran, S., Azizi, M.H., Bagheripoor-Fallah, N., 2012. Evaluating the effect of modified atmosphere packaging on cheese characteristics: A review. *Dairy Science and Technology* 92, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0044-3>
- Larsen, T.O., 1999. Volatile Flavour Production by *Penicillium caseifulvum*. *International Dairy journal*, 883–887. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00010-2)
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D., Brugère, H., 1999. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Medecine Veterinaire* 150, 413–430.
- Leclercq-Perlat, M.N., Picque, D., Riahi, H., Corrieu, G., 2006. Microbiological and biochemical aspects of Camembert-type cheeses depend on atmospheric composition in the ripening chamber. *Journal of Dairy Science* 89, 3260–3273. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72601-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72601-7)
- Leggieri, M.C., Decontardi, S., Battilani, P., 2018. Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology* 278, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023>
- Leggieri, M.C., Decontardi, S., Bertuzzi, T., Pietri, A., Battilani, P., 2016. Modeling growth and toxin production of toxigenic fungi signaled in cheese under different temperature and water activity regimes. *Toxins* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3390/toxins9010004>
- Luard, E.J., 1982. Accumulation of intracellular solutes by two filamentous fungi in response to growth at low steady state osmotic potential. *Journal of General Microbiology* 128, 2563–2574. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-11-2563>
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M.L., Segura, J., 2004. Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology* 96, 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003>
- Magan, N., Lacey, J., 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Transactions - British Mycological Society* 82, 71–81. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80213-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80213-2)
- McSweeney, P.L.H., 2004. Biochemistry of cheese ripening 57, 127–144.
- Mitchell, A.P., 2005. Fungal CO₂ Sensing: A Breath of Fresh Air. *Current Biology* 15, 934–936. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.058>
- Molimard, P., Spinnler, H.E., 1996. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science* 79, 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017a. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology* 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J.L., Mounier, J., Vasseur, V., 2021. Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International* 148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>

Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K., Mounier, J., 2017b. Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of fungi from dairy foods. *Frontiers in Microbiology* 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02109>

Noble, E.P., Reed, D.R., Wang, C.H., 1958. Utilization of acetate, pyruvate, and CO₂ by *Penicillium digitatum*. *Canadian journal of microbiology* 4, 469–476. <https://doi.org/10.1139/m58-050>

Pardo, E., Malet, M., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2006. Effects of water activity and temperature on germination and growth profiles of ochratoxigenic *Penicillium verrucosum* isolates on barley meal extract agar. *International Journal of Food Microbiology* 106, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.002>

Phillips, C.A., 1996. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology* 31, 463–479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>

Picque, D., Leclercq-Perlat, M.N., Corrieu, G., 2006. Effects of atmospheric composition on respiratory behavior, weight loss, and appearance of Camembert-type cheeses during chamber ripening. *Journal of Dairy Science* 89, 3250–3259. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72600-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72600-5)

Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 1997. Modelling the Growth Rate of *Escherichia coli* as a Function of pH and Lactic Acid Concentration. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2355–2360.

Robinson, R.A., Stokes, R.H., 1965. *Electrolyte Solutions* 2d ed. Butterworth and Co., Ltd, London.

Rodriguez-Aguilera, R., Oliveira, J.C., Montanez, J.C., Mahajan, P. V., 2011. Effect of modified atmosphere packaging on quality factors and shelf-life of surface mould ripened cheese: Part I constant temperature. *LWT - Food Science and Technology* 44, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.015>

Ropars, J., Caron, T., Lo, Y., Bennetot, B., Giraud, T., 2020a. *Comptes Rendus Biologies*.

Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., Giraud, T., 2020b. Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology* 30, 4441–4453.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>

Rosso, L., Robinson, T.P., 2001. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology* 63, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00469-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4)

Sims, W., 1986. Effect of carbon dioxide on the growth and form of *Candida albicans*. *Journal of Medical Microbiology* 22, 203–208. <https://doi.org/10.1099/00222615-22-3-203>

Spinnler, H.E., 2004. *Surface Mould-ripened Cheeses*.

Stretton, S., Goodman, A.E., 1998. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 73, 79–85.

<https://doi.org/10.1023/A:1000610225458>

Suhr, K.I., Haasum, I., Steenstrup, L.D., Larsen, T.O., 2002. Factors affecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science* 85, 2786–2794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74365-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74365-8)

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2010. Growth and mycotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *International Journal of Food Microbiology* 143, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.030>

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2009. Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 132, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>

Taniwaki, M.H., Hocking, A.D., Pitt, J.I., Fleet, G.H., 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 68, 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00487-1)

Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A.G., Postollec, F., Leguerinel, I., Sohier, D., Couvert, O., Carlin, F., Coroller, L., 2015. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 562–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-14>

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J.L., Bregier, T., Pawtowski, A., Barbier, G., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., Coroller, L., 2022. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment. *Food Research International* 157.

Van Den Tempel, T., Nielsen, M.S., 2000. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *International Journal of Food Microbiology* 57, 193–199. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00263-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00263-4)

III. Données supplémentaires

L'impact de la pression partielle de l'O₂ sur la germination des spores de *Penicillium camemberti* variété *camemberti* a également été étudié. Déjà évoquée précédemment, l'acquisition des données de germination est consommatrice en temps et énergie. Par conséquent, les données ont été acquises pour une seule souche.

1. Matériel et méthodes

Le protocole suivi pour l'acquisition des données (production de spores, préparation du milieu de culture à pH 4,7, inoculation des spores, incubation en jars, lecture de germination) est identique à celui suivi pour les données de germination en fonction de la pression partielle du CO₂ (voir paragraphe « II. Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti* »).

Les mélanges gazeux ont été effectués de la même façon que pour la pression partielle du CO₂. De l'air comprimé est injecté dans la bouteille de plongée à l'aide d'un compresseur puis du diazote (N₂) (I4001M20R2A000, diazote, Air Liquide S.A. Paris, France) est ajouté jusqu'à atteindre la pression partielle d'O₂ désirée. Au total, huit pressions partielles en O₂ ont été testés : 0 ; 0,25 ; 0,58 ; 0,76 ; 1,04 ; 5,04 ; 9,74 et 20,25% d'O₂, ces valeurs correspondent à la moyenne des valeurs mesurées dans l'ensemble des jars utilisées pour le suivi de la germination des spores.

La démarche et le modèle utilisé pour réaliser la modélisation primaire sont identiques à ceux utilisés pour les données de germination en fonction de la pression partielle du CO₂. Pour la modélisation secondaire, un modèle différent de ceux présentés dans le paragraphe « II. Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti* » a été utilisé pour ajuster les données. Ce modèle a été utilisé dans une étude précédente afin de décrire l'impact de la pression partielle de l'O₂ sur le temps médian de germination des spores (Nguyen Van Long *et al.*, 2017). Le pourcentage maximal de spores germées n'a pas été modélisé car il est proche de 100% pour la plus faible pression partielle d'O₂ testé (0,25% d'O₂).

Le temps médian de germination (τ , h) a été modélisé en fonction de la pression partielle de l'O₂ avec un modèle utilisé dans une étude précédente (Nguyen Van Long *et al.*, 2017) (Equation 10) :

$$\tau = \tau_{atm} \cdot \left(1 + \frac{O_{2\ 50}}{O_2}\right) + \varepsilon_{ii} \quad (10)$$

Équation 10. Modèle secondaire permettant de décrire le temps médian de germination en fonction de la pression partielle de l'O₂ où τ_{atm} correspond au τ dans les conditions atmosphériques (environ 21% d'O₂ et 0% de CO₂), $O_{2\ 50}$ correspond au pourcentage d'O₂ pour lequel $\tau = 2 * \tau_{atm}$ et ε_{ii} est l'erreur résiduelle.

2. Résultats

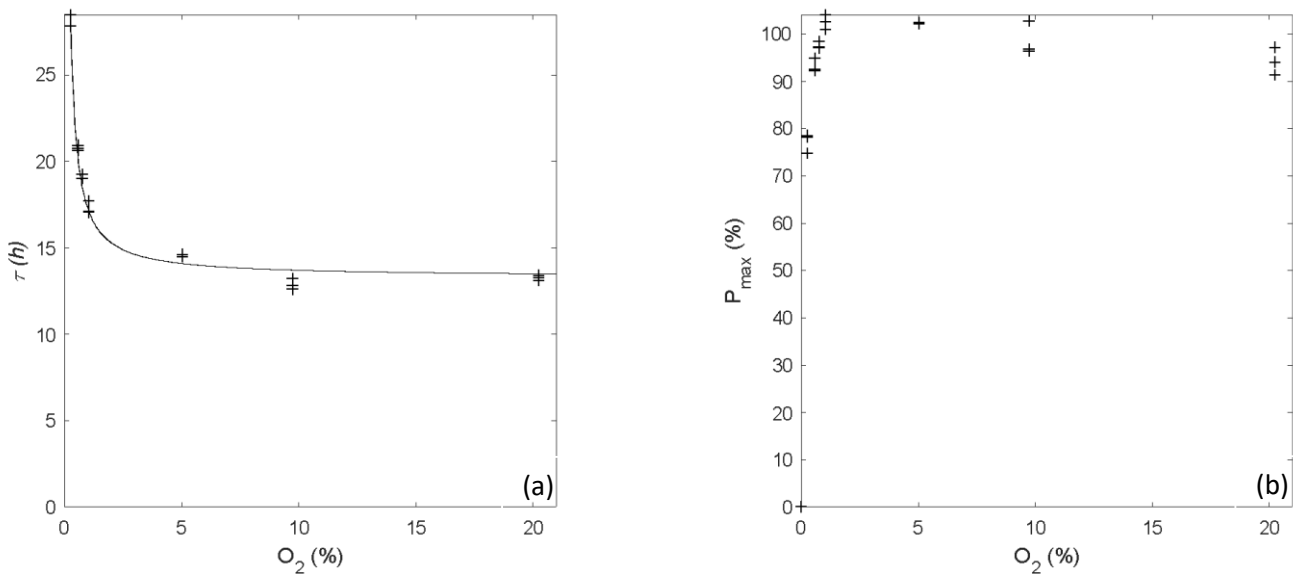


Figure 47. Influence de la pression partielle de l' O_2 (%) sur (a) le temps médian de germination τ (h) et (b) le pourcentage maximal de spores germées P_{max} (%) de *Penicillium camemberti* variété *camemberti* sur milieu PDA à 25°C.

L'ensemble des spores sont capables de germer ($P_{max}=100\%$) jusqu'à 0,58% d' O_2 . A 0,25% d' O_2 , le P_{max} observé était d'environ 80% pour la lecture de la dernière jar après environ 39 heures d'incubation. Lors d'un essai préliminaire, le P_{max} observé était très proche de 100% après 24h d'incubation. Ces résultats suggèrent qu'en conditions très stressantes la variabilité du temps de germination entre les spores devient plus importante. Toutefois, il est fort probable que le P_{max} ait atteint une valeur très proche de 100%, nous n'avons pas pu le vérifier car nous n'avions plus de jars pour poursuivre le suivi de cette germination. Aucune germination n'a été observée à 0% d' O_2 après une semaine d'incubation. Ce résultat montre que *Penicillium camemberti* n'est pas capable de se développer en absence totale d' O_2 après une courte période d'incubation.

La modélisation secondaire a permis d'estimer les paramètres secondaires (et les intervalles de confiance avec un risque $\alpha = 0,05$) pour *Penicillium camemberti* variété *camemberti* à 25°C sur milieu PDA (Figure 47 a). Le temps médian de germination en conditions atmosphériques (τ_{atm} , pour 20,25% d' O_2 et 0,0% de CO_2) a été estimé à $13,31 \pm 0,19$ heures et τ_{atm} est doublé si la concentration en O_2 est diminuée à $0,30 \pm 0,01\%$. La qualité d'ajustement du modèle a été évaluée en utilisant la RMSE (voir paragraphe « II. Impact of sodium chloride and carbon dioxide on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti* »), cette dernière est égale à 0,075.

3. Discussion

Dans le cadre de cette étude, aucune germination n'a été observée en absence d'O₂ après une semaine d'incubation. Ce phénomène avait déjà été observé pour cinq espèces fongiques dans une étude précédente (Nguyen Van Long *et al.*, 2017). Pour ces espèces, l'absence d'O₂ inhibe la germination des spores. En revanche, il semblerait que certaines espèces soient capables de se développer en absence d'O₂. Il a été rapporté que plusieurs espèces appartenant au genre *Mucor* et une souche de *Byssochlamys nivea* sont capables de se développer en anaérobiose et 100% de CO₂ (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962; Yates *et al.*, 1967).

Le temps médian de germination en conditions atmosphériques (τ_{atm} , environ 20,25% d'O₂, 0,0% de CO₂) est estimé à 13,3 heures. Ce dernier était estimé à 14,4 heures pour les expériences réalisées avec le CO₂ (5,00% d'O₂ et 0,0% de CO₂). Ces résultats montrent qu'une diminution de l'O₂ de 21% à 5% induit une augmentation significative du temps médian de germination. Le temps médian de germination estimé dans cette étude est proche de celui de *Penicillium expansum*, ce dernier avait été estimé à 11,7 heures dans une étude précédente (Nguyen Van Long *et al.*, 2017). En revanche, dans cette même étude, *Penicillium brevicompactum* et *Penicillium roqueforti* présentaient des temps médians de germination plus élevés avec une estimation proche de 17 heures.

La pression partielle de l'O₂ pour laquelle τ_{atm} est doublé est estimé à 0,30% d'O₂. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus pour cinq espèces fongiques pour lesquelles ce dernier a été estimé entre 0,03 et 0,75% d'O₂ (Nguyen Van Long *et al.*, 2017).

Déjà évoqué précédemment, le P_{max} observé pour 0,25% d'O₂ est d'environ 80% après 39h d'incubation alors que lors d'un premier essai 100% des spores étaient germées après 24h d'incubation. Il est fort probable que le P_{max} du second essai ait atteint 100% même si nous n'avons pas pu le vérifier car nous avons utilisé toutes les jars à notre disposition. Une étude précédente a montré qu'à 0,36% d'O₂, le P_{max} de *Paecilomyces niveus*, *Mucor lanceolatus* et *Penicillium expansum* était proche de 100% comme c'est probablement le cas pour *Penicillium camemberti* (Nguyen Van Long *et al.*, 2017). Ces résultats semblent suggérer que les espèces citées précédemment sont peu sensibles à la diminution de l'O₂ et que la germination est un phénomène de « tout ou rien », soit la totalité des spores sont capables de germer soit aucune spore ne germe. La différence obtenue entre l'essai 1 et l'essai 2 suggère qu'en conditions très stressantes, il y a une augmentation de la variabilité au niveau de la germination des spores. Ce phénomène a déjà été mis en évidence lors d'une étude précédente réalisée sur *Penicillium corylophilum* (conditions stressantes : 15°C et 0,94 a_w), il pouvait y avoir deux jours de différence entre la première spore germée et la dernière spore germée de la population étudiée (Dagnas *et al.*, 2017).

Une étude réalisée sur *Penicillium camemberti* a montré qu'une atmosphère avec 10% d'O₂ n'a pas d'impact sur sa croissance mycélienne (Doyon *et al.*, 1997). Il a également été rapporté que *Penicillium commune* (ancêtre de *Penicillium camemberti*) (Ropars *et al.*, 2020a, 2020b) était capable de se développer dans une atmosphère contenant 20% ou 40% de CO₂ et 1 ou 5% d'O₂ (Taniwaki *et al.*, 2001). En revanche, *Penicillium commune* n'était pas capable de se développer dans une atmosphère contenant 20% de CO₂ et moins de 0,5% d'O₂ (Taniwaki *et al.*, 2009). Il semblerait donc que *Penicillium camemberti* soit une espèce peut sensible à la réduction de l'O₂. Pour ralentir ou inhiber de manière efficace sa germination des spores ou sa croissance mycélienne, l'atmosphère doit contenir moins de 0,5% d'O₂.

IV. Références

- Bartnicki-Garcia, S., & Nickerson, W. J. (1962). Induction of yeast-like development in *Mucor* by carbon dioxide. *Journal of Bacteriology*, *84*, 829–840. <https://doi.org/10.1128/jb.84.4.829-840.1962>
- Dagnas, S., Gougouli, M., Onno, B., Koutsoumanis, K. P., & Membré, J. M. (2017). Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, *240*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.013>
- Dantigny, P., Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2003). Predictive mycology: Some definitions. *Cryptogamie, Mycologie*, *24*(4), 377–383.
- Dantigny, Philippe, Bensoussan, M., Vasseur, V., Lebrihi, A., Buchet, C., Ismaili-Alaoui, M., Devlieghere, F., & Roussos, S. (2006). Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. *International Journal of Food Microbiology*, *108*(2), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.005>
- Dantigny, Philippe, Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, *100*(1–3), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>
- Doyon, G., Gagnon, J., Lafontaine, D., Desilets, C., & Champagne, C. P. (1997). The effect of carbon dioxide on the growth of *Penicillium camemberti*. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, *15*, 291–297.
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J. D., & Brugère, H. (1999). Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Médecine Veterinaire*, *150*(5), 413–430.
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M. L., & Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, *96*(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003>
- Molimard, P., & Spinnler, H. E. (1996). Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*, *79*(2), 169–184. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76348-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8)
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J. L., Mounier, J., & Vasseur, V. (2021). Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International*, *148*(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>
- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K., & Mounier, J. (2017). Modeling the effect of modified atmospheres on conidial germination of fungi from dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, *8*(OCT), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02109>
- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y., Bennetot, B., & Giraud, T. (2020). *Comptes Rendus Biologies*.
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R. C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., & Giraud, T. (2020). Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology*, *30*(22), 4441–4453.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>
- Spinnler, H. E. (2004). *Surface Mould-ripened Cheeses*.
- Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2001). Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, *68*(1–2), 125–133. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00487-1)

Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I., & Fleet, G. H. (2009). Growth and mycotoxin production by food spoilage fungi under high carbon dioxide and low oxygen atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2–3), 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.005>

Yates, A. R., Seaman, A., & Woodbine, M. (1967). Growth of *Byssochlamyces nivea* in various carbon dioxide atmospheres. *Canadian Journal of Microbiology*, 13(52), 1120–1123.

Chapitre 5 : Origine du
« jaunissement / brunissement »
des fromages à pâte molle et
croûte fleurie

I. Introduction

Les propriétés sensorielles du fromage sont essentielles car elles déterminent le choix et les préférences des consommateurs. En effet, un défaut visuel peut induire un rejet du produit par le consommateur même si la qualité sanitaire du fromage en elle-même n'est pas affectée. Le « jaunissement » ou « brunissement » est un défaut commun à plusieurs variétés de fromages telles que le Cheddar (Goshi *et al.*, 2017), le Parmesan (Aubrey, 2020), la Mozzarella (Johnson and Olson, 1985), le fromage à pâte persillée (Suhr *et al.*, 2002), le fromage portugais au lait cru de brebis (Carreira *et al.*, 1998) ou encore le Camembert (Carreira *et al.*, 2002). Il existe plusieurs défauts de couleur qui peuvent avoir des origines diverses (Daly *et al.*, 2012).

Le brunissement des fromages à pâtes dures (exemples : Cheddar, Parmesan) peut être lié à la réaction de Maillard lorsque les groupes amines réagissent avec les groupes carbonyles des sucres réducteurs. Le galactose est particulièrement impliqué dans le brunissement du Cheddar, du Parmesan mais aussi de la Mozzarella (Goshi *et al.*, 2017; Johnson and Olson, 1985; Kotomi *et al.*, 2020). Dans ce cas, l'utilisation de ferments qui ne relarguent pas de galactose ou de ferments capables de métaboliser le galactose accumulé pourrait permettre de réduire le brunissement de ces fromages (Arai *et al.*, 2020; Hutkins *et al.*, 1986; Johnson and Olson, 1985). Il a également été rapporté que certaines souches de *Lactobacillus* sont également capables de produire du méthylglyoxal qui peut réagir avec des groupements amines des protéines et acides aminés et ainsi entraîner la formation de pigments bruns (Divine and Rankin, 2013; Gandhi *et al.*, 2019, 2018).

Le brunissement des fromages à pâte molle et croûte fleurie peut être lié à la présence de nitrites (Rammell and Joerin, 1972) mais aussi à la présence et l'activité de certains microorganismes. Des bactéries appartenant aux genres *Brevibacterium* et *Pseudomonas* sont responsables du brunissement de certains fromages à pâte molle et croûte fleurie (Tabla *et al.*, 2015). Une étude réalisée sur une souche de *Pseudomonas putida* isolé d'une croûte de fromage de chèvre dans une industrie laitière portugaise a montré que cette souche était capable de produire des pigments bruns. Ces pigments bruns sont des dérivés de la tyrosine et forment un type de mélanine appelée l'eumélanine (Ferraz *et al.*, 2021). La levure *Yarrowia lipolytica* a également été identifiée comme étant responsable du brunissement de fromages de brebis (Carreira *et al.*, 1998).

Concernant les souchesensemencées volontairement pour affiner les fromages à pâte molle et croûte fleurie, une étude a montré que la fermentation du citrate par une souche de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *deacetylactis* entraîne la formation de métabolites secondaires dont l'acétaldéhyde (Lange *et al.*, 1994). Cette molécule peut réagir avec les acides aminés des protéines et entraîner l'apparition d'une coloration brune. *Penicillium camemberti* seul ne provoque pas le brunissement de

ces fromages cependant il semblerait qu'il joue un rôle dans l'apparition de la coloration. Son rôle n'a pas été clairement élucidé, il a été suggéré que *Penicillium camemberti* pourrait fournir des substrats à la souche de *Lactococcus lactis* qui seraient ensuite convertis en acétaldéhyde (Lange *et al.*, 1994).

Penicillium camemberti et *Geotrichum candidum* sont deux espèces fongiques utilisées pour affiner les fromages à pâte molle et croûte fleurie (exemples : Camembert, Brie). Dans la littérature, plusieurs hypothèses en lien avec la physiologie de *Penicillium camemberti* ont été émises pour expliquer l'origine du « jaunissement / brunissement » des fromages à pâte molle et croûte fleurie. Ce phénomène pourrait être dû à un mauvais état physiologique de *Penicillium camemberti* entraînant une lyse du mycélium (Spinnler and Leclercq-Perlat, 2007; Spinnler, 2004), les phénomènes pouvant conduire à l'apparition d'un état physiologique dégradé restent inconnus à ce jour. Néanmoins, il existe différentes hypothèses. Un mauvais état physiologique pourrait entraîner le relargage d'enzymes de type polyphénols oxydases, ces enzymes oxydent des composés phénoliques tels que la tyrosine et ses dérivés puis les composés oxydés sont polymérisés et forment des pigments bruns (O'Connell and Fox, 2001; Spinnler and Leclercq-Perlat, 2007). Toutefois, une étude réalisée sur l'état physiologique de *Penicillium camemberti* pendant 42 jours d'affinage n'a pas permis de mettre en évidence d'autres stress que ceux liés à un vieillissement normal du mycélium (Labonte *et al.*, 2012). Il aurait été intéressant de réaliser cette étude sur une longue période car il peut parfois s'écouler deux mois entre la fabrication et la consommation de ces fromages et le brunissement pourrait apparaître plus tardivement.

La composition ou encore le processus de fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie peuvent impacter l'état physiologique et / ou le métabolisme de la flore d'affinage : a_w , NaCl, pH, potentiel redox, substrats (exemples : lactose, lactates, lipides, acides aminés), substances antimicrobiennes (exemples : acides organiques, bactériocines), compétition avec d'autres microorganismes, température, humidité relative de la chambre d'affinage, composition gazeuse atmosphérique, ... (Leclercq-Perlat *et al.*, 2015, 2012, 2006; Monnet *et al.*, 2015). Il a été montré qu'un caillé dit « lactique » favorise l'apparition d'une couleur brune (Batty *et al.*, 2019b). Une autre étude a montré que lorsque des fromages subissent un traitement à haute pression (550 MPa, 10 min à 25°C) pour éliminer *Listeria monocytogenes*, ils deviennent jaunes car le traitement entraîne une destruction du mycélium qui recouvre la surface des fromages (Batty *et al.*, 2019a).

Les conditions environnementales lors de l'affinage peuvent également avoir un impact sur l'état physiologique et / ou le métabolisme de la flore d'affinage des fromages à pâte molle et croûte fleurie. Il a été rapporté qu'une humidité relative de 98% et une température de 16°C dans la chambre d'affinage entraîne l'apparition d'une odeur d'ammoniac et une couleur marron foncée à la surface

des fromages (Leclercq-Perlat *et al.*, 2015). D'autres études ont montré que le développement de *Penicillium camemberti* est meilleur lorsque la concentration en CO₂ de la chambre d'affinage est de 2% (avec 17 à 18% d'O₂). Une concentration en CO₂ supérieure à 2% influence négativement l'apparence des fromages et lorsque la concentration en CO₂ est supérieure à 4%, l'équilibre entre la levure *Geotrichum candidum* et la moisissure *Penicillium camemberti* est rompu en faveur de la levure (Leclercq-Perlat *et al.*, 2006; Picque *et al.*, 2006). Dans ce cas, la couleur du fromage (apparition d'une couleur brune) et le développement du mycélium de *Penicillium camemberti* sont dégradés. Une présence de CO₂ au début de l'affinage à un niveau constant de 2% entraîne une augmentation de la respiration des microorganismes d'affinage, de la consommation d'O₂, de la production de CO₂ et de la protéolyse (Picque *et al.*, 2006).

Le défaut de « jaunissement / brunissement » pourrait être lié à l'activité protéolytique de *Penicillium camemberti*. En effet, une étude a montré que *Penicillium camemberti* est capable de synthétiser un pigment brun lorsqu'il présente une forte activité protéolytique entraînant une libération de tyrosine libre dans des fromages de type Camembert (Carreira *et al.*, 2002). Dans les deux hypothèses décrites précédemment, la tyrosine est impliquée comme précurseur de la synthèse de pigments bruns.

D'autres espèces fongiques ont été décrites pour leurs capacités à synthétiser des pigments bruns. Les mélanines, qui peuvent être de différentes natures (exemples : eumélanine, pyomélanine), sont des polymères hétérogènes de composés phénoliques qui protègent et favorisent la survie des moisissures en conditions défavorables : stress nutritif, stress hydrique, molécules oxydantes, températures extrêmes, UV, agents antifongiques, métaux lourds, ... (Toledo *et al.*, 2017). *Penicillium chrysogenum* synthétise de la pyomélanine en réponse à un stress nutritif et hydrique (Vasanthakumar *et al.*, 2015). *Aspergillus fumigatus* est capable de synthétiser plusieurs types de mélanines impliqués dans la virulence dont la pyomélanine qui le protégerait des intermédiaires réactifs de l'oxygène (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009). La levure *Yarrowia lipolytica* est aussi capable de synthétiser de la pyomélanine (Carreira *et al.*, 2001a, 2001b). Ces trois espèces synthétisent ce pigment brun à partir du catabolisme de la tyrosine. La synthèse de pyomélanine peut être stimulée par plusieurs facteurs liés à la composition du milieu (Mn²⁺, L-tyrosine) ou à celle de l'environnement (O₂).

A partir de ces données bibliographiques, nous avons émis l'hypothèse que *Penicillium camemberti* serait capable de synthétiser des pigments bruns à partir de la tyrosine (Figure 48). Le catabolisme de la tyrosine pourrait être la voie métabolique impliquée dans la production de pigments bruns. Une augmentation de l'activité protéolytique de *Penicillium camemberti* pourrait entraîner une augmentation de la concentration en tyrosine libre qui servirait de précurseur à la formation de pyomélanine.

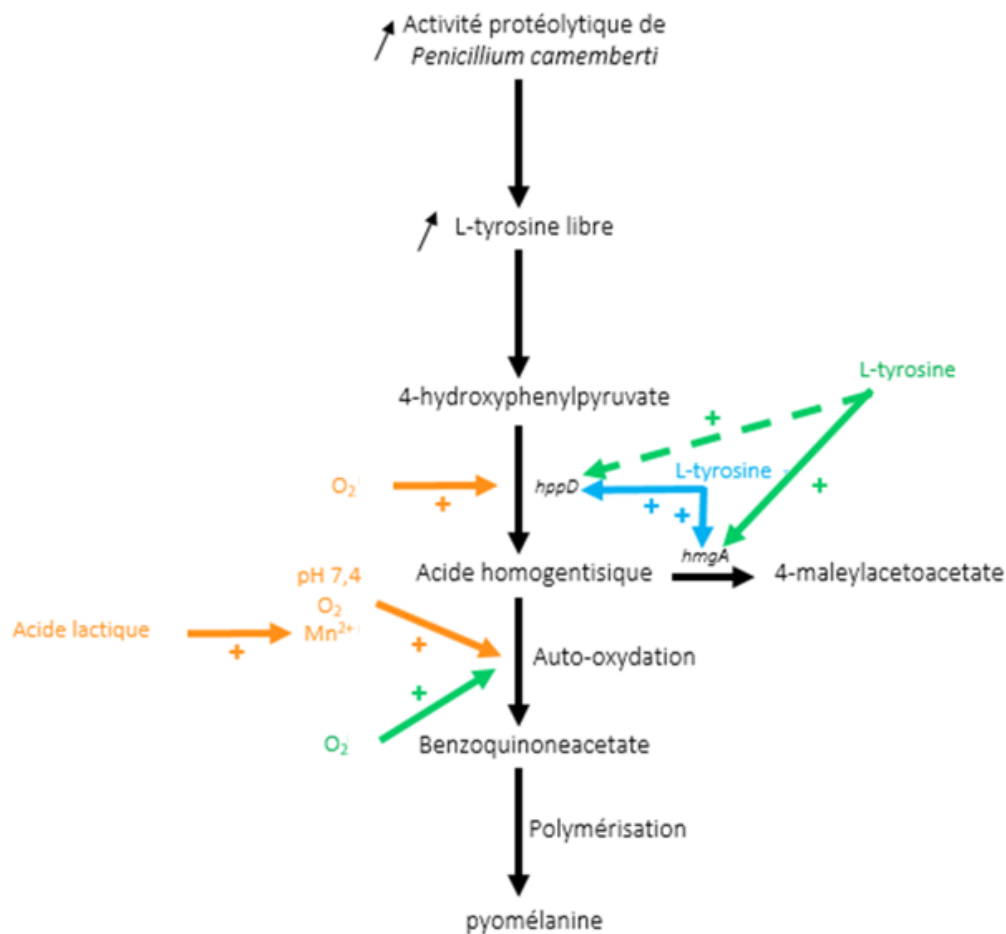


Figure 48. Schéma de l'hypothèse émise concernant la production de pyomélanine par *Penicillium camemberti* par la voie catabolique de la tyrosine. La flèche noire orientée vers le haut (↗) représente une augmentation. Les facteurs qui favorisent la synthèse de pyomélanine sont représentés par une flèche orange pour *Yarrowia lipolytica*, une flèche bleu pour *Aspergillus fumigatus* et une flèche verte pour *Penicillium chrysogenum*. Le gène *hppD* code pour l'enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygénase et le gène *hmgA* code pour l'enzyme homogentisate dioxygénase.

Le défaut pourrait aussi être lié à d'autres facteurs que la tyrosine tels que le pH de la matrice. Une étude a montré que deux souches de *Penicillium caseifulvum* (récemment renommé en *Penicillium camemberti* variété *caseifulvum* (Ropars *et al.*, 2020a, 2020b)) sont à l'origine d'une couleur jaune sur des fromages de type Bleu suite à la production de métabolites colorés (Suhr *et al.*, 2002). Ces métabolites sont de couleur jaune mais ils n'ont pas été identifiés. Plus le pH est faible (pH 4.0), plus la quantité de métabolites jaunes produite est importante et plus la couleur jaune est prononcée.

L'objectif de cette étude est donc de répondre à la question : « Quelle est l'origine du jaunissement / brunissement des fromages à pâte molle et croûte fleurie ? », phénomène qui apparaît de façon aléatoire à la surface des fromages. Plusieurs hypothèses citées précédemment suggèrent que ce défaut pourrait être d'origine fongique et notamment en lien avec *Penicillium camemberti*, espèce

qui a été étudiée dans les chapitres précédents. Cette étude a été divisée en trois étapes afin de vérifier l'hypothèse évoquée ci-dessous. Les étapes ont consisté à : (i) analyser des fromages témoins et des fromages présentant des défauts de couleur, (ii) réaliser des analyses statistiques pour déterminer quels facteurs sont impliqués dans les défauts de couleur et (iii) établir des recommandations et mettre en place des moyens de maîtrise afin de contrôler et empêcher l'apparition du « jaunissement » ou « brunissement » si un facteur abiotique est identifié comme étant responsable de ces défauts de couleur.

II. Matériels et Méthodes

2.1. Echantillonnage

Afin de vérifier l'hypothèse émise, une collection de fromages témoins et de fromages identifiés comme « jaunes » ou « bruns » a été établie à partir d'un échantillonnage chez nos partenaires industriels (Figure 49). Au total, 31 fromages ont été analysés. Les analyses ont été réalisées peu de temps après la réception des fromages (dans la journée ou le lendemain). Les fromages ont été stockés à 4 °C avant d'être analysés. L'ensemble des analyses ont été réalisées sur la croûte des fromages (± 3 mm de « cœur ») (Figure 50). Lorsque la surface des fromages était hétérogène, une série de mesure a été effectuée sur les différentes parties observées.

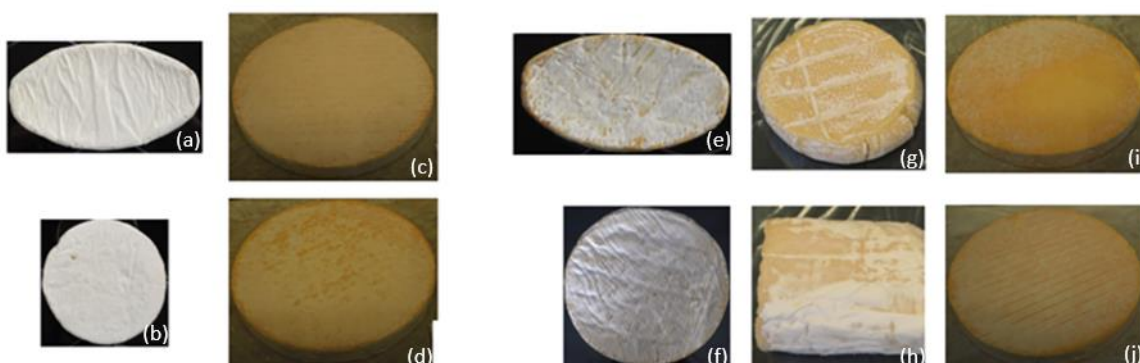


Figure 49. Photographies de fromages témoins (a à d) et fromages « jaunes » ou « bruns » (e à j). Les fromages représentés sont des fromages à pâte molle et croûte fleurie (a et e), des Coulommiers (b et f), des Bries (c, d, i, j) et des fromages de chèvre (g et h).



Figure 50. Photographies d'un prélèvement d'une croûte de fromage.

Tableau 20. Estimation du nombre de fromages nécessaires pour les analyses en fonction de la localisation de l'altération.

localisation de l'altération	Fromage rond (250g)			Bûche (180g)		
	quantité récupérée par fromage (g)	nombre de fromage(s) pour 1 échantillon	nombre de fromage(s) pour 3 échantillons	quantité récupérée par fromage (g)	nombre de fromage(s) pour 1 échantillon	nombre de fromage(s) pour 3 échantillons
tout le fromage	52	1	3	24	2	6
face (totalité)	25	2	6	20	2	6
côté (totalité)	25	2	6	3	12	36
arrêtes (totalité)	2.7	12	36	1.5	23	69

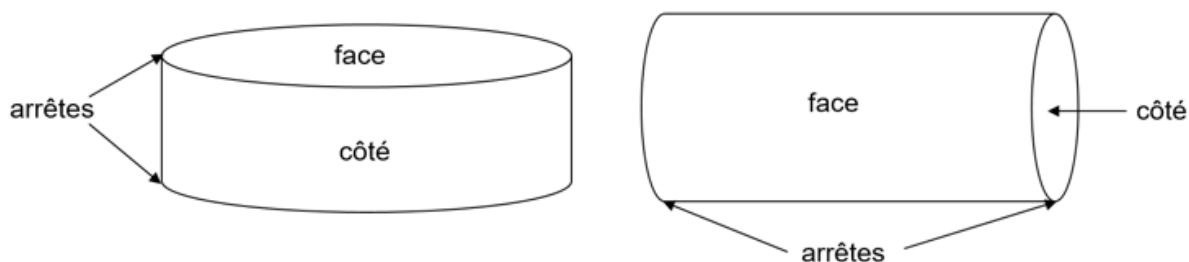


Figure 51. Schémas représentant les différentes parties des fromages en fonction de leur forme.

2.2. Analyses microbiologiques

Les échantillons de croûte de fromages ont été prélevés sous un Poste de Sécurité Microbiologique (PSM) afin de limiter les contaminations microbiologiques extérieures. La prise de croûte a été réalisée grâce à un emporte-pièce (environ 21,24 cm²) puis l'échantillon a été pesé. La croûte a été diluée dans de l'eau additionnée de tween 0,01% puis homogénéisée pendant 2 minutes avec un homogénéisateur de laboratoire. Des dilutions décimales ont ensuite été réalisées dans de l'eau additionnée de tween 0,01%. Les dilutions ont été étalées sur un milieu potato dextrose agar (PDA, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA, pH 5.6, 0.995 a_w). Les boîtes ont été incubées 7 jours à 25°C. Un dénombrement de la flore fongique a été réalisé après 3 jours puis 7 jours de culture. Les souches dénombrées ont été identifiées (Figure 52) au microscope avant d'être repiquées sur un milieu PDA (pour conservation).

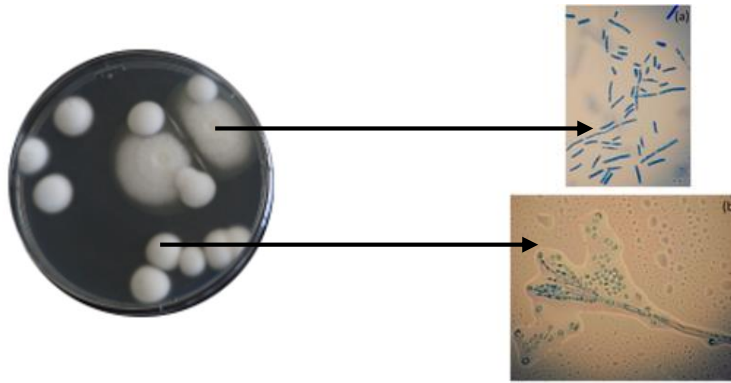


Figure 52. Photographies d'isolats de *Geotrichum candidum* (a) et de *Penicillium camemberti* (b) au grossissement x400 à l'aide d'un microscope à contraste de phase (BX51 microscope, Olympus, Tokyo, Japan).

2.3. Analyses physico-chimiques

Plusieurs analyses physico-chimiques ont été effectuées à partir des croûtes de fromages échantillonnées. Nous avons réalisé une mesure d' a_w (a_w -mètre Novasina Labmaster) et trois mesures de pH (Hanna instruments pH 209 R ou CyberScan pH / Ion 510 + électrode de surface Orion 8135BN) sur chaque échantillon. Des analyses complémentaires ont été réalisées par un laboratoire externe pour mesurer l'extrait sec et déterminer la teneur en chlorures (avec un chloruromètre), le taux de sel (par calcul), la teneur en Lactates (par dosage enzymatique), la quantité de tyrosine (par chromatographie en phase liquide à haute performance) et la quantité d'acides gras volatils (par chromatographie en phase gazeuse).

2.4. Analyses organoleptiques

Les fromages ont été photographiés sous PSM dès la réception avant que les analyses soient effectuées. Nous avons réalisé trois mesures de la couleur (chromamètre Minolta CR-200) sur chaque échantillon.

2.5. Etude de l'impact de l' a_w sur la croissance de *Geotrichum candidum*

2.5.1. Milieux de culture

Onze niveaux d' a_w ont été testés allant de 0,840 à 0,995 a_w (0,840, 0,862, 0,883, 0,902, 0,919, 0,935, 0,950, 0,964, 0,977, 0,988 and 0,995 a_w). Pour cela, du NaCl (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) a été ajouté selon les tables de Stokes et Robinson (Robinson and Stokes, 1965) dans du milieu de culture potato dextrose broth (PDB, Difco, Becton Dickinson Sparks, MD, USA, pH 5.6, 0.995 a_w) et de l'agar (Biomérieux, Marcy-l'Etoile, France) (Valle *et al.*, 2022).

Pour éviter les problèmes de dénaturation lors de la stérilisation, les milieux de culture et le soluté utilisé pour réduire l' a_w ont été doublement concentrés dans le même flacon alors que l'agar a

été doublement concentré dans un autre flacon (Valle *et al.*, 2022). Les solutions ont été stérilisées séparément par autoclavage (20 min at 121°C). Après stérilisation, le contenu des deux flacons a été mélangé à 55°C et le mélange obtenu a été coulé dans les boîtes de pétri.

2.5.2. Production et récolte des spores

Les spores ont été obtenues sur milieu PDA après 7 jours d'incubation à 25°C. Les spores fraîches ont été récoltées dans une solution d'eau additionnée de tween 80 à 0,01 %(v/v) à la même a_w que le milieu de culture testé (ajustement de l' a_w avec du NaCl) (Valle *et al.*, 2022). La concentration en spores a été estimée en effectuant un comptage sur une cellule de Malassez (Malassez, Preciss, Paris, France). La suspension de spores a ensuite été diluée dans une solution d'eau additionnée de tween 80 à 0,01 %(v/v) à la même a_w que le milieu de culture testé jusqu'à 10^6 spores/mL.

2.5.3. Inoculation des milieux de culture et suivi de la croissance radiale

10 μ L de la suspension à 10^6 spores/mL ont été déposés au centre des boîtes de pétri contenant environ 22 mL milieu de culture (quatre réplicats techniques par niveau d' a_w testé) (Valle *et al.*, 2022). Les boîtes de pétri ont été fermées avec du parafilm dans des boîtes en plastique (34 x 25 x 12 cm) contenant environ 200 mL de solution à la même a_w que le milieu de culture pour maintenir une humidité relative stable et ainsi éviter la dessiccation du milieu de culture. Les boîtes ont été incubées à 25°C (température optimale de croissance pour *Geotrichum candidum* d'après les données issues du projet PHYMIA 1 (Coroller *et al.*, 2014)). Le diamètre du thalle a été mesuré régulièrement selon deux directions en utilisant un décimètre gradué pendant une durée maximale de 30 jours.

2.6. Analyses des données

2.6.1. Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R et des packages FactoMineR et MissMDA. Lorsque les quantités de matières étaient trop faibles pour réaliser la totalité des analyses complémentaires, les données étaient « manquantes » pour les échantillons. Le package MissMDA permet d'attribuer une valeur aux données manquantes grâce à un algorithme.

Une Analyse en Composantes Principales (ACP) et une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) ont ensuite été réalisées.

2.6.2. Modélisations

2.6.2.1. Modélisation de la croissance radiale

La croissance radiale a été modélisée en fonction du temps avec un modèle primaire en deux phases (Equation 1) (Dagnas and Membré, 2013; Nguyen Van Long *et al.*, 2017; Valle *et al.*, 2022) pour estimer les paramètres primaires qui correspondent à la phase de latence et au taux de croissance :

$$r(t) = \begin{cases} r_{(0)} + \varepsilon_i \text{ if } t \leq \lambda \\ r_{(0)} + \mu \cdot (t - \lambda) + \varepsilon_i \text{ if } t > \lambda \end{cases} \quad (8)$$

Équation 8. Modèle primaire permettant de décrire la croissance radiale où $r(t)$ est le rayon du mycélium (en mm), t est le temps d'incubation (en jours), $r_{(0)}$ est le rayon initial (taille du dépôt, en mm), λ est la phase de latence (en jours), μ est le taux de croissance (en mm/jour) et ε_i est l'erreur résiduelle. Cette équation a déjà été présentée dans le paragraphe « IV. Mycologie prévisionnelle » du chapitre 1.

2.6.2.1. Modélisation de l'impact de l' a_w sur les paramètres primaires de croissance radiale

Le modèle biphasique (CMLM) décrit dans le paragraphe « II. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment » du chapitre 2 a été réutilisé pour décrire l'impact de l' a_w (modulée par du NaCl) sur le taux de croissance (Equation 11) (Le Marc *et al.*, 2002; Valle *et al.*, 2022):

$$\sqrt{\mu} = \sqrt{\mu_{opt} \cdot CMLM_n(a_w)} + \varepsilon_{ii} \quad (11)$$

$$CMLM_n(a_w) = \begin{cases} \frac{(a_w - a_{w1})^2 \cdot (a_w - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot [(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot (a_w - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot (a_{wopt} + a_{w1} - 2 \cdot a_w)]}, \text{ if } a_w \geq a_{wc} \\ \frac{(a_{wc} - a_{w1})^2 \cdot (a_{wc} - a_{wmax})}{(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot [(a_{wopt} - a_{w1}) \cdot (a_{wc} - a_{wopt}) - (a_{wopt} - a_{wmax}) \cdot (a_{wopt} + a_{w1} - 2 \cdot a_{wc})]} \cdot \left(\frac{a_w - a_{wmin}}{a_{wc} - a_{wmin}}\right)^2, \text{ if } a_w < a_{wc} \end{cases}$$

Équation 11. Modèle secondaire permettant de décrire l'impact de l' a_w sur la croissance radiale des moisissures (Le Marc *et al.*, 2002) où a_{wmin} , a_{wopt} and a_{wmax} sont respectivement les valeurs cardinales d' a_w minimale, optimale et maximale. Les paramètres a_{wc} et a_{w1} sont respectivement l' a_w où il y a le changement entre les deux phases de croissance et l' a_w correspondant au point d'intersection entre la première partie linéaire et l'axe des abscisses. Dans cette étude, le paramètre a_{wmax} est fixé à 1,000. Le taux de croissance μ est estimé avec l'Equation 8; μ_{opt} est la valeur de μ quand l' a_w est égale à l' a_{wopt} et ε_{ii} est l'erreur résiduelle.

Les statistiques ont été effectuées comme dans le paragraphe « II. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment » du chapitre 2 (Valle *et al.*, 2022). Le modèle a été ajusté en minimisant la somme des carrés des écarts (fonction *lsqcurvefit*, MATLAB 2018, The

Mathworks Inc., USA). Les approximations linéaires et les calculs ont été réalisés pour estimer des intervalles de confiance avec un risque $\alpha = 0,05$ (fonction MATLAB *nlparci*). Le critère d'information Akaike et la RMSE a été utilisé pour évaluer la qualité d'ajustement des modèles.

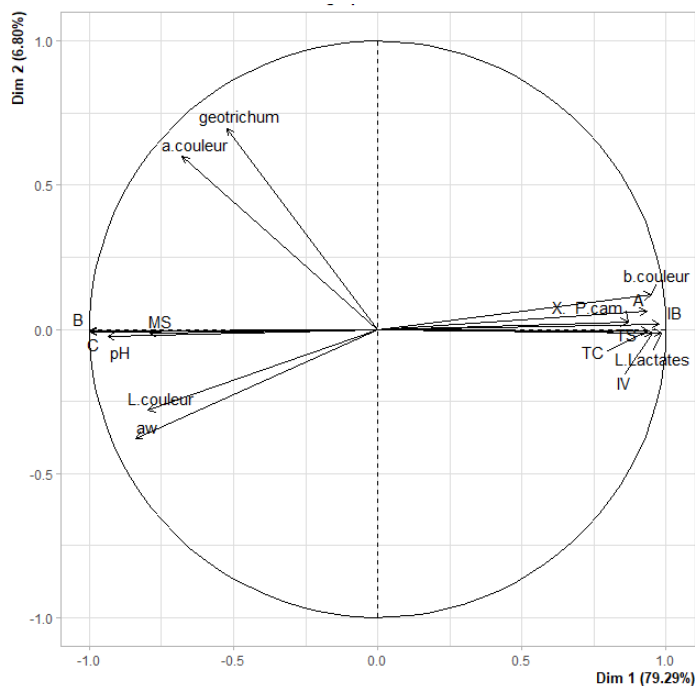
III. Résultats

Au total, deux industriels ont envoyé 70 fromages. Le recouvrement mycélien de certains fromages témoins n'était pas uniforme sur toute la surface. Certaines zones étaient très fleuries tandis que d'autres étaient beaucoup moins recouvertes. Dans ce cas, des mesures ont été réalisées sur chaque zone, c'est pourquoi 39 échantillons ont été analysés à partir de 31 fromages analysés (Brie, Coulommiers, Chèvre).

Différents défauts ont été identifiés en fonction du type de fromage. L'étude a ensuite été recentrée sur le Brie car ces échantillons présentaient des quantités de matières suffisantes pour réaliser l'ensemble des analyses, y compris les analyses complémentaires réalisées par un prestataire externe. L'ACP permet d'expliquer 86,09% de la variance avec les dimensions 1 et 2 (Figure 53). Seuls les paramètres significatifs sont représentés sur l'ACP afin de limiter le bruit lié aux facteurs non significatifs (Tableau 22). La CAH permet de distinguer deux groupes de fromages : les fromages qui sont de couleur jaune et les fromages qui ne sont pas de couleur jaune (témoins) (Figure 54).

Tableau 21. Moyennes et écart-types des paramètres significatifs pour l'étude du jaunissement des fromages de type Brie.

	fromages témoins	fromages jaunes
<i>aw</i>	0,978 ± 0,005	0,962 ± 0,002
pH	7,63 ± 0,25	5,73 ± 0,25
L.couleur	88,53 ± 2,50	83,10 ± 1,23
a.couleur	0,05 ± 0,45	-0,95 ± 0,56
b.couleur	7,32 ± 2,59	18,66 ± 0,41
<i>P.camemberti</i> (%)	1,53 ± 4,99	56,13 ± 27,27
<i>geotrichum</i>	1,52 ± 0,51	1,00 ± 0,00
Matière sèche	52,72 ± 2,68	47,34 ± 2,91
Teneur en chlorures	0,55 ± 0,04	1,09 ± 0,19
Taux de sel	0,91 ± 0,06	1,8 ± 0,31
L-lactates	< 160	274,29 ± 91,47
Acide acétique	34,43 ± 14,57	69,1 ± 9,59
Acide iso butyrique	1,8 ± 0,66	3,73 ± 0,29
Acide butyrique	298,73 ± 34,29	7,6 ± 5,38
Acide iso valérique	5,6 ± 1,39	8,3 ± 0,53
Acide caproïque	148,2 ± 11,75	4,5 ± 2,86



Légende :

- a_w : activité de l'eau
- pH : pH moyen
- L.couleur : clarté / luminosité
- a.couleur : axe rouge / vert
- b.couleur : axe bleu / jaune
- geotrichum : nombre de *Geotrichum* avec des morphologies différentes
- X_P.cam : % de *P.camemberti*
- MS : matière sèche
- A : acide acétique
- B : acide butyrique
- IB : acide iso butyrique
- C : acide caproïque
- IV : acide iso valérique
- TC : teneur en chlorures
- TS : taux de sel par la voie chlorures
- L.Lactates : teneur en L-Lactates

Figure 53. Analyse en Composantes Principales (ACP) réalisée pour les fromages de type Brie avec les facteurs significatifs.

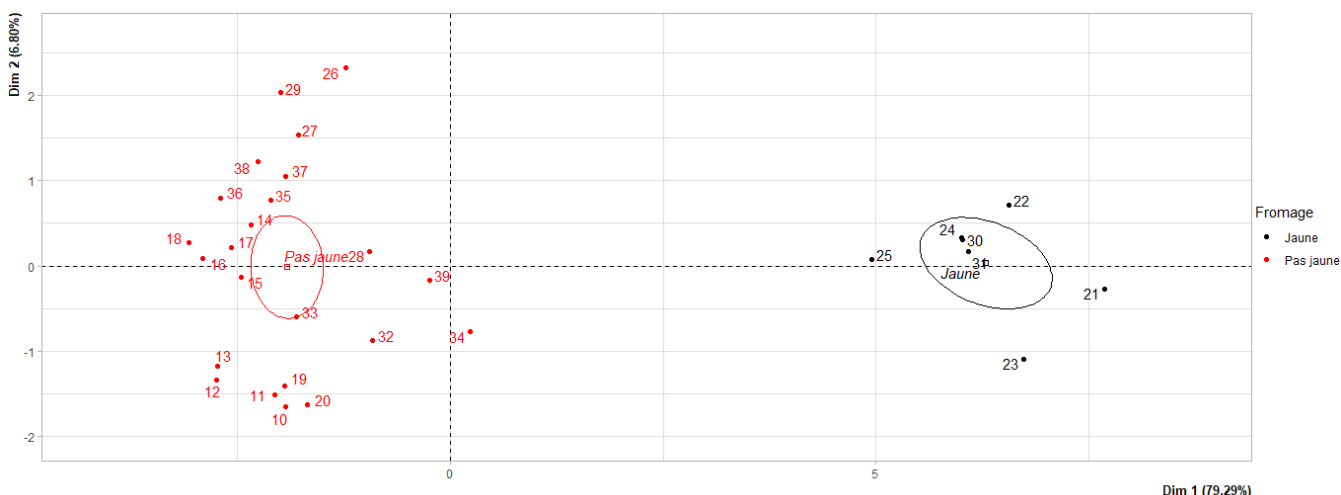


Figure 54. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) réalisée pour les fromages de type Brie avec les facteurs significatifs.

La couleur jaune est caractérisée par le paramètre « b.couleur ». Plus la valeur de ce paramètre est élevée et plus le fromage est jaune. Les fromages de couleur jaune sont représentés en noir sur la CAH. Les fromages de couleur jaune possèdent des valeurs élevées pour le paramètre b, le pourcentage de *Penicillium camemberti*, la teneur en chlorures, le taux de sel, la teneur en L-lactates et les quantités d'acide acétique, d'acide isobutyrique et d'acide isovalérique. Les fromages de couleur jaune possèdent des valeurs faibles pour les paramètres L et a, la matière sèche, le nombre de *Geotrichum*

présentant des morphologies différentes, le pH, l' a_w et les quantités d'acide caproïque et d'acide butyrique. Les fromages témoins sont représentés en rouge sur la CAH. Les fromages témoins possèdent des valeurs élevées pour les paramètres L et a, la matière sèche, le nombre de *Geotrichum* présentant des morphologies différentes, le pH, l' a_w et les quantités d'acide caproïque et d'acide butyrique. Les fromages témoins possèdent des valeurs faibles pour le paramètre b, le pourcentage de *Penicillium camemberti*, la teneur en chlorures, le taux de sel, la teneur en L-lactates et les quantités d'acide acétique, d'acide isobutyrique et d'acide isovalérique.

Le dosage de la tyrosine a également été réalisé car cette molécule intervient dans deux hypothèses en lien avec *Penicillium camemberti*. La quantité de tyrosine est plus faible dans les fromages jaunes, toutefois, la tendance observée est non significative entre les deux groupes de fromages. Par conséquent, notre hypothèse de départ reposant sur la production de tyrosine n'est pas validée.

Le jaunissement des fromages de type Brie analysés au cours de cette étude pourrait être lié à *Geotrichum candidum* et non pas à *Penicillium camemberti* (Figure 55). En effet, l'inoculum de la flore d'affinage ensemencé à la surface des fromages est majoritairement composé de *Geotrichum candidum* (> 50%, information fournie par le partenaire industriel). Cette espèce est dénombrée en faible proportion sur les fromages jaunes alors qu'elle est abondante à la surface des fromages témoins.

Notre hypothèse est basée sur le fait que le caillé des fromages jaunes n'est pas homogène car les parties jaunes ont des valeurs d' a_w et de pH qui sont plus faibles que pour les fromages témoins. La faible valeur d' a_w peut être due à un taux de sel élevé et la faible valeur de pH peut être due à une teneur élevée en L-Lactates. Le taux de sel élevé présent dans les parties jaunes pourrait inhiber la croissance de *Geotrichum candidum*. En effet, cette espèce est décrite comme étant sensible au sel (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004; Spinnler, 2004). Si la croissance de *Geotrichum candidum* est inhibée par un fort taux de sel, il ne peut pas consommer les lactates, c'est pourquoi le pH est faible. En effet, il a été rapporté que *Geotrichum candidum* est une espèce capable de consommer les lactates mais pas le lactose (Aziza *et al.*, 2008; Boutrou and Gue, 2005). La quantité de L-lactates présente dans les fromages jaunes est plus importante que dans les fromages témoins, cette quantité élevée pourrait être due à une non consommation de ce composé par *Geotrichum candidum* suite à une inhibition de croissance liée à un fort taux de sel. De plus, la quantité d'acide butyrique est plus importante dans les fromages témoins que les fromages jaunes, *Geotrichum candidum* est une espèce capable de produire cet acide (Leclercq-Perlat *et al.*, 2007; Spinnler, 2004). Si la croissance de *Geotrichum candidum* est inhibée alors il ne peut pas produire d'acide butyrique, c'est pourquoi la quantité est plus faible dans les fromages jaunes.

Geotrichum candidum se développe dès les premiers jours d'affinage alors que le développement de *Penicillium camemberti* commence généralement à partir du 6^{ème} jour (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004; Spinnler, 2004). *Penicillium camemberti* est moins sensible au sel que *Geotrichum candidum* et semble pouvoir recouvrir la surface des fromages plus tardivement, c'est pourquoi le défaut de « jaunissement » s'atténue au cours du temps (Leclercq-Perlat *et al.*, 2004; Spinnler, 2004). Cette hypothèse est corrélée avec la description faite par le partenaire qui a qualifié le défaut comme une « absence de développement d'une couche duveteuse blanche ». Le paramètre « b.couleur » qui est plus élevé sur les fromages jaunes que sur les fromages témoins traduirait donc une absence de recouvrement de la surface des fromages par *Geotrichum candidum*.

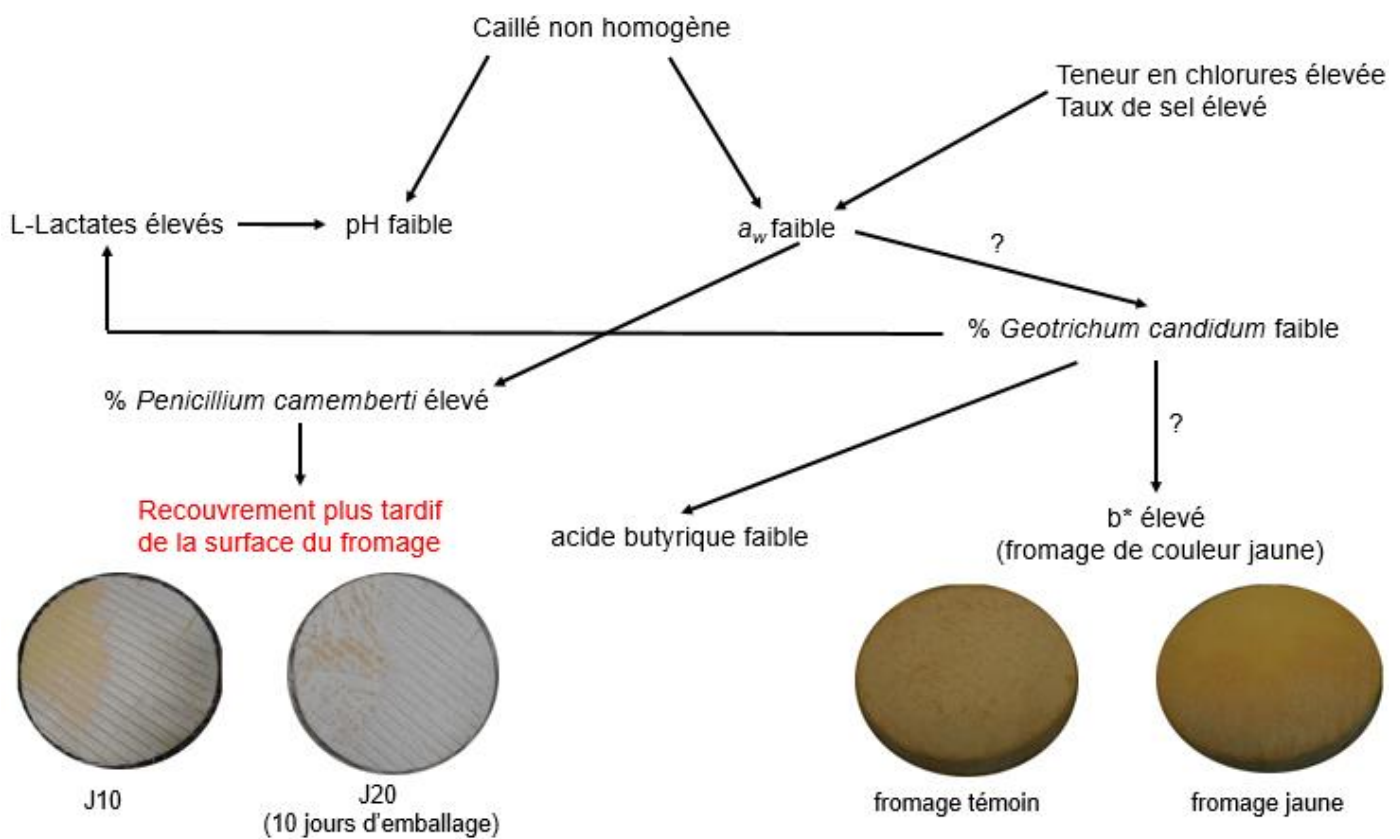


Figure 55. Schéma représentant l'hypothèse concernant l'origine du « jaunissement » des fromages de type Brie.

Afin de vérifier si la nouvelle hypothèse décrite ci-dessus est exacte (Figure 55), l'impact de l' a_w sur la croissance radiale de la souche de *Geotrichum candidum* isolée sur les Bries a été étudiée. La phase de latence n'est pas toujours bien estimée avec le modèle primaire. Par conséquent, seul le taux de croissance en fonction de l' a_w a été modélisé (Figure 56).

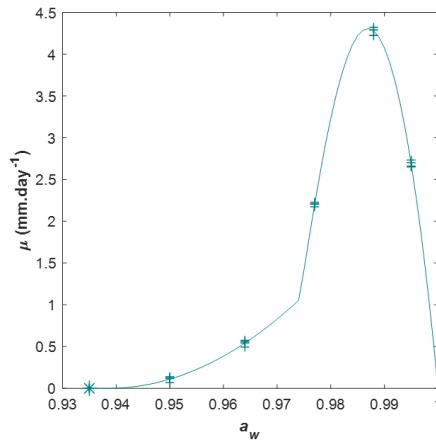


Figure 56. Modélisation secondaire représentant l'impact de l' a_w sur la croissance radiale de la souche de *Geotrichum candidum* isolée sur fromages de type Brie. Symboles (+) : données expérimentales ; (*) : niveau d' a_w testé mais pas de croissance observée (—) : valeurs calculées avec le modèle CMLM (Equation 11) (Le Marc *et al.*, 2002).

Tableau 22. Estimation des valeurs cardinales d' a_w (et des intervalles de confiance avec un risque $\alpha = 0,05$) obtenues en ajustant les données avec le modèle CMLM (Equation 11) sur le taux de croissance (μ_{max}) de la souche de *Geotrichum candidum* isolée sur les Bries à 25°C sur milieu PDA contenant du NaCl pour ajuster l' a_w .

$a_{w\ min}$	$a_{w\ opt}$	μ_{opt}	$a_{w\ 1}$	$a_{w\ C}$	RMSE	Akaike
$0,939 \pm 0,001$	$0,987 \pm 0,000$	$4,29 \pm 0,07$	$0,970 \pm 0,001$	$0,974 \pm 0,001$	0,0211	-95,32

Aucune croissance n'a été observée pour une a_w inférieure ou égale à 0,935 a_w (Figure 56). Cette observation est en accord avec l'estimation de l' $a_{w\ min}$ qui est de 0,939 a_w (Tableau 23). Le taux de croissance optimal estimé est de $4,29 \pm 0,07$ mm/jour pour une a_w de 0,987 a_w (Tableau 23). Le taux de croissance moyen observé pour les quatre réplicats est de $2,21 \pm 0,02$ mm/jour à 0,977 a_w et $0,54 \pm 0,03$ mm/jour à 0,964 a_w . Entre ces deux niveaux d' a_w , le taux de croissance de *Geotrichum candidum* est presque divisé par 4. Les niveaux d' a_w testés sont proches des valeurs moyennes obtenues pour les fromages témoins (0,978 a_w ce qui correspond à environ 4% de NaCl) et les fromages jaunes (0,962 a_w ce qui correspond à environ 6% de NaCl). Par conséquent, le taux de croissance de *Geotrichum candidum* est presque divisé par quatre entre les fromages témoins et les fromages jaunes et le taux de croissance sur les fromages jaunes est presque divisé par huit par rapport au taux de croissance optimal estimé (à 0,987 a_w). Ces résultats montrent que la souche de *Geotrichum candidum* isolée sur les fromages de type Brie est sensible au sel (voir paragraphe « II. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment » du chapitre 2).

IV. Discussion

Au vu de l'ensemble des résultats, notre hypothèse concernant l'inhibition de la croissance de *Geotrichum candidum* par un fort taux de sel semble légitime. Il a été rapporté que les fromages à pâte molle et croûte fleurie ont normalement une a_w de surface entre 0,970 et 0,980 a_w ce qui correspond à environ 4% de NaCl (Guinee and Fox, 2017; Marcos *et al.*, 1981). L' a_w moyenne des fromages témoins est en accord avec ce critère (0,978 a_w) alors que les fromages jaunes présentent une a_w moyenne plus faible (0,962 a_w) ce qui correspond à environ 6% de NaCl. Une étape de salage non contrôlée semble être à l'origine du phénomène observé. Cette étude montre la nécessité de maîtriser efficacement le processus de fabrication des fromages à toutes les étapes afin d'empêcher l'apparition de défauts. Pour les fromages de type Brie, il est nécessaire de modifier l'étape de salage actuellement en place afin que cette dernière soit homogène sur l'ensemble de la surface des fromages. L'homogénéité du caillé pourrait également être vérifiée afin de voir si l'étape de salage est homogène et ainsi éviter l'inhibition du développement de *Geotrichum candidum* entraînant l'apparition d'un défaut de « jaunissement ».

Concernant les autres fromages, les quantités de matière n'étaient pas suffisantes pour réaliser l'ensemble des analyses. Nos partenaires industriels n'étaient pas en mesure de nous fournir des quantités plus importantes de fromages car très peu de fromages sont conservés dans les échantillons. Au vu de la diversité des défauts de « jaunissement » et « brunissement » observés dans le cadre de cette étude préliminaire, il serait intéressant à l'avenir, de développer un projet entièrement dédié à ces défauts de couleur. Ainsi, le stockage d'une grande quantité d'échantillons pourrait être réalisé afin d'obtenir des fromages présentant un défaut de « jaunissement » ou « brunissement » malgré le caractère aléatoire de ce phénomène. Des analyses plus poussées comme des analyses du transcriptome par RNAseq pourraient être réalisées afin de mettre en évidence des processus physiologiques chez *Penicillium camemberti* ou *Geotrichum candidum* qui pourraient être impliqués dans l'apparition de ces défauts de couleur.

V. Références

- Arai, A., Igoshi, A., Inoue, A., Noda, K., Tsutsuura, S., 2020. Relationship between lactose utilization of lactic acid bacteria and browning of cheese during storage. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1768508>
- Aubrey, M.H., 2020. The Parmesan Cheese Model System : Alleviation of Browning Defect in Parmesan Cheese. *Electronic Theses and Dissertations*. 3684.
- Aziza, M., Adour, L., Amrane, A., 2008. Assimilation of peptides and amino acids and dissimilation of lactate during submerged pure cultures of *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Microbioly and Biotechnology*, 18, 124–127.
- Batty, D., Meunier-goddik, L., Waite-cusic, J.G., 2019a. Camembert-type cheese quality and safety implications in relation to the timing of high-pressure processing during aging. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16236>
- Batty, D., Waite-Cusic, J.G., Meunier-Goddik, L., 2019b. Influence of cheese-making recipes on the composition and characteristics of Camembert-type cheese. *Journal of Dairy Science*, 102, 164–176. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14964>
- Boutrou, R., Gue, M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>
- Carreira, A., Dillinger, K., Eliskases-Lechner, F., Loureiro, V., Ginzinger, W., Rohm, H., 2002. Influence of selected factors on browning of Camembert cheese. *Journal of Dairy Research*, 69, 281–292. <https://doi.org/10.1017/S0022029902005393>
- Carreira, A., Ferreira, L.M., Loureiro, V., 2001a. Production of brown tyrosine pigments by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 372–379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01256.x>
- Carreira, A., Ferreira, L.M., Loureiro, V., 2001b. Brown Pigments Produced by *Yarrowia lipolytica* Result from Extracellular Accumulation of Homogentisic Acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3463–3468. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3463-3468.2001>
- Carreira, A., Paloma, L., Loureiro, V., 1998. Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 223–230. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00054-3)
- Coroller, L., Rigalma, K., & Dantigny, P. (2014). Projet PHYMIA.01 Modélisation prédictive de la germination et de la croissance par l'étude éco-physiologique de moisissures et de levures d'intérêt alimentaire.
- Dagnas, S.P., Membré, J.M., 2013. Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, 76, 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Daly, D., Mcsweeney, P., Sheehan, J., Daly, D., Mcsweeney, P., Pink, J.S., 2012. Pink discoloration defect in commercial cheese : a review. *Dairy Science*, 92, 439–453. <https://doi.org/10.1007/s13594-012-0079-0>
- Divine, R.D., Rankin, S.A., 2013. Short communication : Reducing agents attenuate methylglyoxal-based browning in Parmesan cheese. *Journal of Dairy Science*, 96, 6242–6247.
- Ferraz, A.R., Pacheco, R., Vaz, P.D., Pintado, C.S., Ascens, L., Serralheiro, M.L., 2021. Melanin : Production from Cheese Bacteria , Chemical Characterization , and Biological Activities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph182010562>.

- Gandhi, N.N., Cobra, P.F., Steele, J.L., Markley, J.L., Rankin, S.A., 2018. Lactobacillus demonstrate thiol-independent metabolism of methylglyoxal : Implications toward browning prevention in Parmesan cheese. *Journal of Dairy Science*, 101, 968–978. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13577>
- Gandhi, N.N., Steele, J.L., Rankin, S.A., 2019. Lactobacillus casei expressing methylglyoxal synthase causes browning and heterocyclic amine formation in Parmesan cheese extract. *Journal of Dairy Science*, 102, 100–112. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15042>
- Goshi, A.I., Ato, Y.S., Ameyama, K.K., Urata, M.M., 2017. Galactose Is the Limiting Factor for the Browning or Discoloration of Cheese during Storage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, (Tokyo). 63, 412–418. <https://doi.org/10.3177/jnsv.63.412>.
- Guinee, T.P., Fox, P.F., 2017. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects, Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00013-2>
- Hutkins, R.W., Paul, S., Morris, H.A., 1986. Use of Galactose-Fermenting *Streptococcus thermophilus* in the Manufacture of Swiss , Mozzarella , and Short-Method Cheddar Cheese. *Journal of Dairy Science*, 69, 1–8.
- Johnson, M.E., Olson, N.F., 1985. Nonenzymatic Browning of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 68, 3143–3147. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81219-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81219-4)
- Kotomi, A., Asuka, I., Masatsune, M., 2020. Analyses of Factors Affecting the Browning of Model Processed Cheese during Storage. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, (Tokyo). 66, 364–369. <https://doi.org/10.3177/jnsv.66.364>.
- Labonte, R., 2012. Rebecca Labonte Estimation De L ' Etat Physiologique De *Penicillium Camemberti* Lors De L ' Affinage Du Camembert.
- Lange, M., Champagne, C., Goulet, J., Lange, M., Champagne, C., Contribution, J.G., Lactococcus, D., 1994. Contribution de *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar diacetylactis au brunissement de fromages de types brie et camembert. *Lait*, 74, 187–195. <https://doi.org/10.1051/lait:1994316>
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 73, 219–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00640-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00640-7)
- Leclercq-Perlat, M.N., Buono, F., Lambert, D., Latrille, E., Spinnler, H.E., Corrieu, G., 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions. *Journal of Dairy Research*, 71, 346–354. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000196>
- Leclercq-Perlat, M.N., Corrieu, G., Spinnler, H.E., 2007. Controlled production of camembert-type cheeses: Part III role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. *Journal of Dairy Research*, 74, 218–225. <https://doi.org/10.1017/S0022029906002329>
- Leclercq-Perlat, M.N., Picque, D., Riahi, H., Corrieu, G., 2006. Microbiological and biochemical aspects of Camembert-type cheeses depend on atmospheric composition in the ripening chamber. *Journal of Dairy Science*, 89, 3260–3273. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72601-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72601-7)
- Leclercq-Perlat, M.N., Sicard, M., Perrot, N., Trelea, I.C., Picque, D., Corrieu, G., 2015. Temperature and relative humidity influence the ripening descriptors of Camembert-type cheeses throughout ripening. *Journal of Dairy Science*, 1325–1335. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8916>

- Leclercq-Perlat, M.N., Sicard, M., Trelea, I.C., Picque, D., Corrieu, G., 2012. Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 95, 4666–4682. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5368>
- Marcos, A., Alcalá, M., León, F., Fernández-Salguero, J., Esteban, M.A., 1981. Water Activity and Chemical Composition of Cheese. *Journal of Dairy Science*, 64, 622–626. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(81\)82621-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(81)82621-5)
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarne, P., Swennen, D., 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiology Letter*, 362, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., Vasseur, V., 2017. Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology*, 68, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- O’Connell, J.E., Fox, P.F., 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: A review. *International Dairy Journal*, 11, 103–120. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00033-4)
- Picque, D., Leclercq-Perlat, M.N., Corrieu, G., 2006. Effects of atmospheric composition on respiratory behavior, weight loss, and appearance of Camembert-type cheeses during chamber ripening. *Journal of Dairy Science*, 89, 3250–3259. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72600-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72600-5)
- Rammell, C.G., Joerin, M.M., 1972. Determination of nitrite in cheese and other dairy products. *Journal of Dairy*, 39, 89–94.
- Robinson, R.A., Stokes, R.H., 1965. *Electrolyte Solutions* 2d ed. Butterworth and Co., Ltd, London.
- Ropars, J., Caron, T., Lo, Y.-C., Bastien, B., 2020a. *Comptes Rendus Biologies*. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.04.001>
- Ropars, J., Didiot, E., Rodríguez de la Vega, R.C., Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., Coton, E., Snirc, A., Le Prieur, S., Giraud, T., 2020b. Domestication of the Emblematic White Cheese-Making Fungus *Penicillium camemberti* and Its Diversification into Two Varieties. *Current Biology*, 30, 4441–4453. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.082>
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., Brakhage, A.A., 2009. Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 493–503. <https://doi.org/10.1128/AEM.02077-08>
- Spinnler, H.-E., Leclercq-Perlat, M.-N., 2007. White-mould cheese: Why does Camembert or Brie have a grey or brown colour? *Cheese Problem Solved*, 275–276. <https://doi.org/10.1533/9781845693534.268>
- Spinnler, H.E., 2004. Surface Mould-ripened Cheeses.
- Suhr, K.I., Haasum, I., Steenstrup, L.D., Larsen, T.O., 2002. Factors affecting growth and pigmentation of *Penicillium caseifulvum*. *Journal of Dairy Science*, 85, 2786–2794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74365-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74365-8)
- Tabla, R., Gómez, A., Rebollo, J.E., Roa, I., 2015. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese. *Journal of Dairy Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S0022029915000023>
- Toledo, A.V., Franco, M.E.E., Yanil Lopez, S.M., Troncozo, M.I., Saparrat, M.C.N., Balatti, P.A., 2017. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 99, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2017.04.004>

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J.L., Bregier, T., Pawtowski, A., Barbier, G., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., Coroller, L., 2022. Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment. *Food Research International*, 157.

Vasanthakumar, A., Dearaujo, A., Mazurek, J., Schilling, M., Mitchell, R., 2015. Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by l-tyrosine. *Microbiology (United Kingdom)* 161, 1211–1218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000030>

Chapitre 6 : Conclusion

I. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral ont permis de mettre en évidence une grande variabilité de sensibilité des espèces fongiques face aux variations des conditions environnementales. Ces résultats démontrent la nécessité de bien identifier les souches (flores d'intérêt technologique et flores d'altération) rencontrées dans l'environnement fromager pour ensuite déterminer de façon précise leurs caractéristiques de croissance, tout en tenant compte d'une possible variabilité intra-spécifique. Ces résultats ont également montré qu'il était nécessaire de maîtriser l'ensemble des facteurs abiotiques afin de garantir la qualité des produits fermentés. Par exemple, les travaux réalisés ont permis de montrer que *Geotrichum candidum*, espèce utilisée pour affiner des fromages à pâte molle et croûte fleurie, est sensible à la réduction de l' a_w . Lors du processus de fabrication des fromages, si l'étape de salage n'est pas contrôlée, le développement de cette moisissure peut être inhibé et ainsi conduire à l'apparition de défauts. Au contraire, d'autres flores d'altération appartenant au genre *Penicillium* sont peu sensibles à la réduction de l' a_w . Dans ce cas, l'étape de salage ne sera pas suffisante pour inhiber le développement de ces moisissures. Il sera nécessaire de combiner plusieurs facteurs abiotiques afin de réduire efficacement le développement de ces flores indésirables.

Ce travail doctoral a permis d'améliorer les outils de mycologie prévisionnelle existants avec l'utilisation de nouveaux modèles adaptés pour décrire la réponse des moisissures aux variations des conditions environnementales (a_w et CO_2). Ces travaux seront diffusés via le GIS Sym'Previus (<https://symprevius.eu>). Les nouvelles données acquises vont être intégrées dans la base de données utilisée par les outils de simulation, permettant d'offrir des services originaux de prévision de croissances des moisissures. Ces outils seront disponibles pour une grande diversité de moisissures rencontrées dans l'environnement laitier, y compris certaines espèces très peu étudiées jusqu'à présent comme *Bisifusarium domesticum* ou *Scopulariopsis asperula*.

Suite à la lecture des chapitres précédents, les lecteurs sont susceptibles de se poser un certain nombre d'interrogations. Plusieurs questions ont été identifiées, leurs réponses seront détaillées dans les paragraphes suivants.

- Comment ont été sélectionnées les souches ?

Le nombre et l'identité des souches ont été définis en accord avec nos partenaires industriels qui appartiennent à l'industrie laitière. Idéalement, deux aspects sont à prendre en compte pour cette sélection : la variabilité des réponses au niveau inter-spécifique (entre différentes espèces) et au niveau intra-spécifique (entre plusieurs souches d'une même espèce).

L'existence d'une variabilité intra-spécifique au sein des espèces fongiques a été mise en évidence chez *Penicillium expansum* et *Penicillium nalgiovense* par le biais de différentes études qui ont montré que plusieurs souches appartenant à la même espèce isolées sur des substrats différents (exemples : produits laitiers, fruits) ou sur le même substrat (exemple : saucisses sèches) ne présentaient pas les mêmes valeurs minimales de croissance (Lahlali *et al.*, 2005; Ludemann *et al.*, 2004; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Chez *Penicillium roqueforti*, plusieurs études ont montré l'existence d'une variabilité intra-spécifique au niveau des critères morphologiques, des critères génétiques, de la production de mycotoxines, de l'activité protéolytique et des valeurs cardinales de croissance (Fontaine *et al.*, 2015; Gillot *et al.*, 2017, 2015; Nguyen Van Long *et al.*, 2021). L'existence d'une variabilité intra-spécifique face à la résistance aux désinfectants a également été mise en évidence chez *Penicillium commune* dans une étude réalisée sur quatre souches appartenant à cette espèce. Les spores d'une seule souche (spores produites à 0,950 a_w et récoltées sans réhydratation) survivent après 2 minutes d'exposition à 70% d'éthanol, aucune survie n'a été observée pour les spores des trois autres souches étudiées (Visconti *et al.*, 2020).

Actuellement, la variabilité intra-spécifique n'est pas ou peu prise en compte en mycologie prévisionnelle. L'hypothèse émise lors de travaux précédents a été conservée pour ce travail doctoral : la variabilité inter-spécifique est plus importante que la variabilité intra-spécifique (Dagnas, 2015). Chaque souche est considérée comme étant représentative de l'espèce étudiée malgré le fait qu'il existe une variabilité intra-spécifique. Les souches sélectionnées ont été isolées dans l'environnement laitier afin d'obtenir des souches qui ont des caractéristiques de croissance proches de ce qui peut être observé chez nos partenaires industriels.

Afin de prendre en compte la variabilité intra-spécifique, plusieurs stratégies peuvent être envisagées (Nguyen Van Long *et al.*, 2021). Un mélange de spores de plusieurs souches pourrait être utilisé pour acquérir des données, ce protocole permettrait de se rapprocher de la réalité notamment lorsque plusieurs souches appartenant à la même espèce cohabitent au sein de la même niche écologique. Dans ce cas, c'est le scénario le plus défavorable qui sera pris en compte car c'est la souche qui présente la latence la plus faible et le taux de croissance le plus élevé qui va dominer. L'acquisition des données pourrait également être réalisée avec une souche présentant des caractéristiques qui permettent de répondre à une problématique précise. Par exemple, si l'étude consiste à déterminer l'altération d'un aliment suite à la croissance de *Penicillium roqueforti* à 4°C, l'acquisition des données pourrait être réalisée avec la souche de *Penicillium roqueforti* présentant le comportement le plus extrême (exemple : souche la plus psychrotolérante qui présente le plus fort taux de croissance à 4°C). Dans ce cas, c'est le cas le plus défavorable qui est étudié, les modélisations obtenues seront sécuritaires mais elles peuvent entraîner une sur-évaluation du risque et entraîner un gaspillage alimentaire.

Enfin, si les modélisations sont dédiées à un seul site spécifique, il pourrait être intéressant de sélectionner une souche fréquemment isolée sur site et de la considérer comme représentative du site.

En résumé : La variabilité inter-spécifique a été privilégiée, ce choix permet d'être plus représentatif pour une grande diversité d'altérations des produits laitiers. Pour de futurs travaux, il sera nécessaire de collecter un nombre important de souches appartenant à la même espèce et d'utiliser des méthodes de criblages pour les caractériser rapidement et ainsi prendre en compte la variabilité intra-spécifique.

- **Comment ont été définies les conditions expérimentales pour l'acquisition des données ?**

Dans le cadre de ce travail doctoral, un seul plan d'expériences a été déterminé pour toutes les souches étudiées (à l'exception de *Scopulariopsis asperula* pour le CO₂). La modélisation de l'effet d'un facteur nécessite plusieurs cinétiques réalisées à différents niveaux statiques de ce dernier (on parle de plan d'expériences monofactoriel). Lorsqu'un facteur est étudié, tous les autres facteurs (non étudiés) doivent être maintenus à un niveau « optimal ». Toutes les moisissures ne présentent pas les mêmes niveaux optimaux, par conséquent des compromis ont dû être trouvés pour conserver un plan d'expériences unique pour chaque facteur étudié.

Les données ont été acquises sur milieu potato dextrose agar (PDA, 0,99 a_w et pH 5,3) qui est un milieu riche et non sélectif, il ne contient pas d'antibiotiques. Il est utilisé en routine au laboratoire pour conserver les souches de collection. L'ensemble des souches sélectionnées pour l'étude présentaient une température optimale de croissance entre 20 et 30°C (Coroller *et al.*, 2014). Par conséquent, l'ensemble des données de ce travail doctoral ont été acquises à 25°C afin de conserver une seule température pour toutes les souches. Pour étudier l'impact du CO₂ sur la physiologie des moisissures, il a été décidé d'utiliser un pH défavorable (pH 4,7) à la dissolution du CO₂ (dépendante du pH et de la température). L'impact de cette valeur de pH sur la croissance des moisissures était faible (Coroller *et al.*, 2014), à l'exception de *Scopulariopsis asperula* qui présentait un taux de croissance réduit de 50% et une absence de sporulation. Après discussion avec nos partenaires industriels, ces derniers ont souhaité conserver cette souche car elle peut être assez fréquemment retrouvée dans l'environnement laitier et être responsable de l'altération des produits laitiers. Par conséquent, nous avons dû adapter le milieu et l'acquisition des données a été réalisée à pH 7,0 pour cette souche.

Les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral montrent que la croissance fongique sur milieu PDA est variable en fonction des souches. Peu de données sont disponibles pour plusieurs espèces telles que *Bisifusarium domesticum*, *Scopulariopsis asperula* et *Penicillium bialowiezense*. Ces souches ont un taux de croissance inférieur à 1 mm/jour sur milieu PDA alors que la majorité des autres souches ont un taux de croissance supérieur à 2 mm/jour. Il serait intéressant de tester la croissance

de ces souches sur plusieurs milieux de culture afin de déterminer un milieu de culture adapté à leur croissance. Il a été rapporté que la croissance d'une souche de *Mucor fuscus* utilisée pour affiner des fromages augmente de 58% sur milieu « *cheese agar* » par rapport au milieu PDA (Morin-Sardin *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que le choix du milieu de culture est primordial pour l'acquisition des données.

En résumé : Le choix des conditions expérimentales est un compromis permettant à la fois de cibler plusieurs niveaux du facteur étudié tout en maintenant les autres facteurs à des niveaux considérés comme optimaux pour toutes les souches. Les conditions expérimentales d'études précédentes (Coroller *et al.*, 2014) ont également été prises en compte pour permettre une cohérence entre différents jeux de données pour ensuite déterminer des combinaisons de facteurs efficaces contre le développement des moisissures d'altération.

- **Comment ont été définis les plans d'expériences pour l'acquisition des données ?**

Les plans d'expériences ont été définis en fonction des données disponibles dans la littérature et des limites expérimentales, par exemple, la solubilité du soluté, la perméabilité des matériaux, la respiration des moisissures, voire l'acidification du milieu de culture. Au vu de la diversité des souches étudiées, il était difficile d'établir un plan d'expériences optimal pour l'ensemble des souches. La stratégie qui a été retenue au cours de ce travail doctoral a été de définir un plan d'expérience unique pour toutes les moisissures testées plutôt qu'un plan spécifique à chaque moisissure.

Pour modéliser, de façon robuste, l'effet d'un facteur sur une réponse biologique, une large gamme de niveaux de ce facteur doit être testée, parfois indépendamment de leur représentativité de conditions réelles. Par exemple, des niveaux de NaCl bien au-delà des conditions réelles de salage peuvent être testés, ces niveaux ne sont pas représentatifs des taux de sel rencontrés dans l'environnement laitier sauf dans le cas des saumures les plus concentrées. Le plus faible niveau d' a_w testé était de 0,815 a_w ce qui correspond à 22% de NaCl. Plus on se rapproche de la saturation (36% de NaCl), plus la solubilisation du NaCl devient difficile et les solutions obtenues sont moins homogènes.

En résumé : Les plans d'expériences établis sont un compromis entre la diversité des moisissures étudiées, les contraintes expérimentales et l'étendue requise pour les niveaux des facteurs étudiés.

- Quelle stratégie expérimentale pourrait être envisagée afin d'étudier spécifiquement l'impact de la force ionique sur la physiologie des moisissures ?

Dans le cadre de ce travail doctoral, la force ionique est issue d'une transformation de données. L'hypothèse émise pour les travaux sur l' a_w était que l'effet observé pour le glycérol était uniquement lié à l' a_w et que l'effet observé pour le NaCl était lié à l' a_w et la force ionique. L'effet de l' a_w estimé avec le glycérol a été retiré aux données obtenues avec le NaCl afin de ne conserver que l'effet de la force ionique. Les résultats préliminaires obtenus au cours de ce travail doctoral suggèrent que la force ionique ne doit pas être négligée dans les études physiologiques. Il semblerait que son impact devienne moins important lorsque le système cellulaire est proche de la saturation ionique.

Il a été rapporté que les protéines cellulaires et les systèmes membranaires peuvent être endommagés par les ions Na^+ (Gunde-cimerman and Zalar, 2014; Plemenitaš *et al.*, 2016). D'autres sels comme le chlorure de calcium (CaCl_2 , solubilité = 745 g/L à 20°C) ou le chlorure de magnésium (MgCl_2 , solubilité = 540g/L à 20°C) pourraient être utilisés afin de tester des forces ioniques plus importantes que celles testées avec le chlorure de sodium (NaCl, solubilité = 360 g/L à 20°C).

En résumé : Pour de futurs travaux, il serait intéressant d'acquérir des données de croissance radiale directement en fonction de la force ionique sans passer par une transformation des données. Il pourrait être intéressant de remplacer le NaCl par un autre sel qui présente une force ionique plus élevée à faible concentration. Il sera nécessaire de vérifier si des études ont mis en évidence l'existence d'effets toxiques des ions retrouvés dans les sels sur le développement des moisissures.

- Quelle stratégie expérimentale pourrait être envisagée afin d'observer une limite de croissance pour les expériences réalisées avec le CO_2 ?

Pour déterminer une limite de croissance fongique en fonction du CO_2 , il aurait été nécessaire d'acquérir des données supplémentaires avec des pourcentages plus élevés en CO_2 . La méthode utilisée pour préparer les mélanges gazeux au laboratoire dans des bouteilles de plongée permet de tester un mélange contenant jusqu'à 95% de CO_2 et 5% d' O_2 . D'après les résultats obtenus au cours de ce travail doctoral, 100% de CO_2 n'est pas suffisant pour inhiber la croissance de *Mucor lanceolatus*. Il a été rapporté que plusieurs espèces appartenant au genre *Mucor* sont capables de se développer dans une atmosphère contenant 100% de CO_2 (Bartnicki-Garcia and Nickerson, 1962). Pour avoir une inhibition de la croissance fongique, la pression de CO_2 doit être supérieure à la pression atmosphérique (supérieure à 100% CO_2). Pour cela, des expériences en « sur-pression » avec du matériel adapté (résistant aux hautes pressions) pourraient être réalisées. Cette méthode (« *High Pressure Carbon Dioxide* ») est applicable à certains aliments liquides (exemple : jus de fruits), elle permet d'injecter du CO_2 sous haute pression (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007).

En résumé : Pour de futurs travaux, il pourrait être intéressant de développer des méthodes permettant d'acquérir des données de croissance radiale sous haute pression.

- **Les valeurs cardinales peuvent-elles être influencées par la taille de l'inoculum ?**

Peu d'études sur la taille de l'inoculum ont été réalisées jusqu'à présent. Il a été rapporté que pour des conditions proches de l'optimum de croissance sur milieux gélosés, l'impact de la taille de l'inoculum sur la phase de latence est significatif alors qu'il ne l'a pas toujours pour le taux de croissance (Garcia *et al.*, 2010; González *et al.*, 1988; Sautour *et al.*, 2003). En revanche, en conditions stressantes, la phase de latence et le taux de croissance sont impactés par la taille de l'inoculum. Un inoculum faiblement concentré aura une phase de latence plus élevée et un taux de croissance plus faible qu'un inoculum fortement concentré (Aldars-García *et al.*, 2017; Dagnas *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2010).

La variabilité est généralement plus importante à l'échelle individuelle qu'à l'échelle populationnelle et cette variabilité augmente en conditions stressantes (Dagnas *et al.*, 2017; Garcia *et al.*, 2010; Gougouli and Koutsoumanis, 2013). En effet, lorsque l'inoculum contient une forte concentration de spores, les spores qui germent et se développent le plus vite seront prédominantes. Dans le cas d'une étude à l'échelle individuelle, c'est le comportement de chaque spore individuelle qui est étudiée. Une étude réalisée chez *Aspergillus flavus* à deux concentrations (1 et 500 spores) a montré que l'utilisation d'un inoculum concentré (500 spores) entraîne une sous-estimation du temps nécessaire à la croissance et à la production de mycotoxines pour un inoculum faiblement concentré (1 spore) (Aldars-García *et al.*, 2017).

Des expériences réalisées à différentes densités de spores (exemples : 1, 10, 100 ou 1000 spores) pourraient permettre de mettre en évidence des phénomènes de communication proche du « *quorum sensing* » décrit chez les bactéries. Des études réalisées précédemment ont montré que le 1-octen-3-ol et le 1-octanol étaient des auto-inhibiteurs de la germination des spores chez *Penicillium paneum* et *Penicillium camemberti* respectivement (Chitarra *et al.*, 2004; Gillot *et al.*, 2016).

En résumé : L'acquisition des données de mycologie prévisionnelle est généralement réalisée avec une forte concentration en spores. Ce type d'inoculation est intéressant pour acquérir des données sur les flores d'intérêt technologique qui sont généralement inoculées volontairement à forte concentration dans les matrices alimentaires. En revanche, ce type d'inoculation est moins adapté pour acquérir des données sur les flores d'altération. En effet, dans le cas d'une contamination fongique, seulement un faible nombre de spores (une ou quelques spores) se déposent à la surface du produit et vont entraîner l'altération du produit. L'acquisition de données avec un inoculum fortement concentré n'est pas représentative des contaminations réelles dans l'industrie agroalimentaire. Pour

de futurs travaux, il sera nécessaire d'utiliser des conditions expérimentales qui se rapprochent des conditions réellement rencontrées dans l'industrie agroalimentaire.

- Les valeurs cardinales peuvent-elles être influencées par l'état physiologique des spores inoculées ?

Dans le cadre de ce travail doctoral, la majorité des données (germination des spores et croissance radiale) ont été acquises avec des spores fraîches. Des spores congelées ont uniquement été utilisées pour acquérir les données de croissance radiale en fonction du CO₂ pour faciliter le lancement des manipulations sous atmosphères modifiées. Des expériences réalisées sur *Penicillium camemberti* (données non publiées) ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative au niveau de l'estimation de la phase de latence et du taux de croissance pour des expériences de croissance radiale réalisées sur spores fraîches et spores congelées. Ce phénomène est probablement dû au fait que les expériences de croissance radiale sont réalisées avec une forte concentration de spores (environ 10⁴ spores), la quantité de spores non germées ou présentant un retard de germination semble donc négligeable. En revanche, un retard de germination des spores a été observé pour les spores congelées par rapport aux spores fraîches de *Penicillium camemberti*. Ces résultats suggèrent qu'il est acceptable d'utiliser des spores congelées pour acquérir des données de croissance radiale à forte concentration de spores. En revanche, il est préférable d'utiliser des spores fraîches pour acquérir des données de germination ou à faible concentration de spores (exemple : spore unique).

Une étude réalisée précédemment a montré que les conditions de sporulation peuvent impacter la germination des spores (Nguyen Van Long *et al.*, 2017b). Chez *Penicillium roqueforti*, les spores produites à 5°C germent plus vite que les spores produites à 20°C. De même, les spores de *Penicillium roqueforti* et *Penicillium expansum* produites à une a_w de 0,900 a_w germent plus vite que les spores produites à une a_w de 0,980 a_w . Ce phénomène avait déjà été observé pour d'autres espèces fongiques. La germination précoce des spores serait liée à l'état de maturation des spores, ce dernier est associé à l'accumulation de tréhalose et mannitol, la mélanisation et l'hydrophobicité. Les résultats obtenus dans l'étude citée précédemment suggèrent que les spores produites en conditions stressantes (5°C ou 0,900 a_w) sont moins matures, elles ont des quantités de tréhalose et mannitol accumulées et une hydrophobicité moins importantes que les spores produites en conditions témoins (20°C ou 0,980 a_w). Ces phénomènes pourraient entraîner une sortie plus rapide de l'état de dormance des spores, favoriser l'absorption d'eau qui va entraîner le gonflement de la spore (croissance isotropique) puis la formation d'un tube germinatif (croissance polarisée).

L'état physiologique des spores peut également avoir un impact sur leur inactivation par divers désinfectants. Dans une première étude, les spores de quatre souches de *Penicillium commune* ont été

produites sur des milieux de culture avec une a_w de 0,995 ou 0,950 a_w et les spores ont été récoltées par réhydratation ou sans réhydratation. Pour les quatre souches de *Penicillium commune* étudiées, seules les spores produites à 0,950 a_w et récoltées sans réhydratation survivent après 1 minute d'exposition à 70% d'éthanol, aucune survie n'a été observée pour les spores produites dans les autres conditions (Visconti *et al.*, 2020). Dans une seconde étude, les spores ont été produites en conditions de laboratoire (conditions optimales avec une a_w du milieu de culture égale à 0,995 a_w et une récolte des spores avec une solution aqueuse) et d'autres spores ont été produites en conditions industrielles de façon à mimer les conditions rencontrées dans l'industrie agroalimentaire (stress modéré avec une a_w du milieu de culture de 0,95 a_w et une récolte sèche des spores grâce à une action mécanique et sans solution aqueuse). Dans cette étude, les spores d'*Aspergillus flavus* produites en conditions industrielles sont plus résistantes aux désinfectants que les spores produites en conditions de laboratoire.

En résumé : Les spores utilisées pour l'acquisition de données de mycologie prévisionnelle sont généralement produites dans des conditions optimales or plusieurs études ont montré que l'état physiologique des spores peut impacter les valeurs cardinales. Pour de futurs travaux, il sera nécessaire de prendre en compte les conditions environnementales lors de la sporulation et d'acquérir des données avec des spores produites dans des conditions proches de celles retrouvées dans l'environnement industriel afin de se rapprocher des situations industrielles réelles (exemple : dans l'industrie, les spores sont dispersées dans l'air, elles ne sont pas réhydratées et généralement produites à un a_w réduite). Pour cela, l'utilisation de méthodes de récolte sèche déjà décrites pourront être utilisées (Burgain and Dantigny, 2016; Visconti *et al.*, 2021).

- [Quelles sont les limites de la méthode utilisée pour étudier la germination des spores ?](#)

Pour des raisons organisationnelles, l'acquisition des données a été réalisée sur des répliquats techniques. Pour de futurs travaux, il serait intéressant de travailler sur des répliquats biologiques. En effet, lors d'un premier essai réalisé à 0,25% d' O_2 , 100% des spores de *Penicillium camemberti* étaient germées après 24h d'incubation pour les trois répliquats techniques. Lors d'un second essai, environ 20% des spores étaient germées après 23h d'incubation et seulement 74 à 80% des spores étaient germées après 39h d'incubation pour les trois répliquats techniques. A l'heure actuelle, deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène : (i) la phase de latence avant la germination est variable en fonction du répliquat biologique et la germination est constante ou (ii) la germination est variable en fonction du répliquat biologique.

Concernant l'acquisition des données de germination des spores à 18% de NaCl, l'expérience a été stoppée avant la fin de la durée maximale de l'expérience (70 jours) et avant que le pourcentage

de spores germées n'ait atteint 100%. En effet, en conditions stressantes, l'hétérogénéité au sein de la population de spores augmente ce qui se traduit par une augmentation de la dispersion, la différence entre le moment où la première spore germe et le moment où la dernière spore germe pour une population donnée augmente. Ce phénomène a déjà été observé précédemment (Dagnas *et al.*, 2017; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a). Cette augmentation de l'hétérogénéité pose problème pour le suivi de la germination car les premières spores germées vont commencer à former des hyphes qui vont cacher les spores non germées. La méthode utilisée actuellement ne permet pas de savoir si après 70 jours d'incubation toutes les spores sont capables de germer à 18% de NaCl.

Déjà évoqué dans une étude précédente, il est impossible de savoir si toutes les spores germées sont capables de donner un mycélium visible et d'effectuer le suivi de l'élongation des hyphes au niveau populationnel car les spores germées vont former un réseau dense et inextricable (Dagnas and Membré, 2013). Des expériences au niveau individuel devront être réalisées pour répondre à ces questions. Pour des raisons organisationnelles, ces expériences ne sont pas réalisables avec la méthode utilisée actuellement pour effectuer le suivi de la germination des spores.

En résumé : La méthode utilisée actuellement pour effectuer le suivi de la germination des spores présente plusieurs limites. Pour de futurs travaux, il sera nécessaire d'améliorer la méthode d'acquisition des données de germination des spores.

- [Comment améliorer l'acquisition des données de germination des spores ?](#)

La méthode utilisée actuellement pour acquérir les données de germination des spores est fastidieuse, consommatrice de temps et d'énergie. Cette méthode pourrait être améliorée en développant une méthode automatisée. Un comptage automatique des spores sur une cellule de Malassez avec un script MATLAB permettrait de gagner du temps et de travailler sur des réplicats biologiques plutôt que des réplicats techniques (système existant). Concernant le suivi de la germination des spores, une caméra installée sur un microscope et commandée par un système électronique avec une carte Arduino pourrait permettre de prendre des micrographies à des intervalles de temps réguliers. Ensuite, des analyses d'images pourraient être réalisées grâce à l'utilisation de logiciels de traitement d'images (ou de scripts MATLAB) afin de déterminer le pourcentage de spores germées en fonction du temps (Gougouli and Koutsoumanis, 2013; Kalai *et al.*, 2017). Toutefois, ce dispositif peut présenter certaines limites. Si le microscope et la caméra sont directement placés dans un incubateur de grande taille, l'acquisition des données sera limitée pour une certaine gamme de température car des faibles températures (exemple : 4°C) ou fortes températures (exemple : 40°C) pourraient endommager le matériel. Il pourrait être envisagé de placer une enceinte directement sur le microscope, l'enceinte serait régulée automatiquement grâce à des capteurs (température, humidité relative, composition gazeuse)

reliés à un système électronique avec une carte Arduino. Ce dispositif peut sembler complexe à mettre en place pour un biologiste car il nécessite des connaissances en électronique.

Le développement de nouvelles méthodes grâce à l'utilisation d'outils récents qui peuvent réaliser des mesures à des intervalles de temps réguliers de façon automatique pourrait permettre de limiter le temps de présence au laboratoire (notamment la nuit). Un néphélomètre laser ou un oCelloScope pourraient permettre d'acquérir des données de germination des spores en quantité plus importantes car plusieurs expériences peuvent être lancées en parallèle dans des microplaques.

En résumé : Pour de futurs travaux, l'automatisation ou le développement de nouvelles méthodes grâce à l'utilisation d'outils récents pourrait permettre d'alléger les contraintes liées au suivi de la germination des spores.

II. Perspectives

Ce travail doctoral contribue à mieux comprendre les réponses biologiques des moisissures rencontrées dans l'industrie laitière face aux conditions environnementales particulières à cette filière. Il a également permis de soulever plusieurs questions qui permettent d'envisager de nombreuses perspectives pour des travaux futurs. Les perspectives envisagées sont décrites ci-dessous.

Concernant les données acquises sur la croissance radiale des moisissures, il serait intéressant de réaliser des validations sur matrices fromagères pour voir si les prévisions réalisées à partir d'expériences effectuées sur un milieu de culture gélosé (potato dextrose agar) sont proches des valeurs obtenues sur matrices alimentaires. Des expériences menées précédemment sur différentes matrices fromagères (exemples : Tomme de Savoie, fromage de chèvre et fromage frais) ont montré des résultats encourageants (Morin-Sardin *et al.*, 2016; Nguyen Van Long *et al.*, 2017a).

Il pourrait également être intéressant d'étudier l'impact de l' a_w et du CO_2 sur la production de mycotoxines et la sporulation. En effet, les mycotoxines peuvent représenter un danger pour la santé humaine, ce risque dépend de la nature de la mycotoxine et de la quantité produite. La sporulation peut impacter la dispersion des moisissures dans l'environnement. Si des spores sont produites, ces dernières peuvent se retrouver dispersées dans l'environnement par l'air ou l'eau et donc contaminer d'autres produits. Il semble donc pertinent de savoir si ces phénomènes peuvent être maîtrisés grâce aux facteurs abiotiques.

Dans le cadre de ce travail doctoral, chaque facteur a été étudié individuellement selon un plan monofactoriel, les facteurs qui ne sont pas pris en compte dans la modélisation sont maintenus à un niveau optimal pour la réponse biologique étudiée. Par la suite, il serait intéressant de tester des combinaisons de facteurs (exemples : température, pH, a_w , acides organiques, mélanges gazeux) pour

prendre en compte d'éventuelles interactions responsables de synergies ou d'effets antagonistes entre les facteurs et ainsi déterminer des effets barrières efficaces contre le développement de moisissures responsables de l'altération des produits laitiers.

Très peu d'études décrivant les mécanismes d'adaptation des moisissures face aux conditions environnementales défavorables sont disponibles. Au vu de la diversité des espèces fongiques étudiées et des réponses observées, il est probable que plusieurs stratégies d'adaptation soient utilisées par les moisissures. Face à la réduction de l' a_w , l'accumulation de solutés compatibles semble être une méthode d'adaptation courante. Il serait intéressant de réaliser l'extraction et le dosage des solutés compatibles grâce à l'utilisation d'une chromatographie en phase liquide à haute pression (« *High Performance Liquid Chromatography* », HPLC) afin de déterminer précisément la nature (exemples : sucres, mycosporines) et la quantité de chaque soluté compatible accumulé lorsque l' a_w est réduite (Kogej *et al.*, 2007). D'autres stratégies d'adaptation impliquent des modifications de la membrane plasmique ou de la paroi cellulaire. *Cladosporium herbarum* présente des caractéristiques proches de la levure mélanisée *Hortaea werneckii* (Musa *et al.*, 2018), il est possible que cette espèce fongique produise de la mélanine afin de favoriser la rétention de solutés compatibles dans ces cellules. Des observations avec un microscope électronique à transmission pourraient être réalisées afin de voir si des granules de mélanine sont observés au niveau de la paroi des cellules de moisissures lorsque l' a_w est réduite (Kogej *et al.*, 2007). Des outils de biologie moléculaire pourraient également être utilisés afin d'évaluer l'expression des gènes impliqués dans le remodelage de la membrane plasmique (exemple : enzymes impliquées dans la modification des acides gras) et de la paroi cellulaire (exemple : enzymes impliquées dans la modification des polysaccharides). L'expression d'autres gènes comme ceux impliqués dans la régulation des flux ioniques (exemple : transporteurs impliqués dans l'exclusion des ions Na^+) ou les mécanismes de défense contre un stress oxydatif pourrait également être évaluée (Jiménez-Gómez *et al.*, 2020; Pérez-Llano *et al.*, 2020). Face à l'augmentation du pourcentage de CO_2 , des expériences pourraient être réalisées avec du carbone radioactif (exemple : ^{14}C) et des dosages pourraient être effectués afin de déterminer précisément le ou les mécanismes permettant l'incorporation du carbone radioactif (Gitterman and Knight, 1952; Graafmans, 1973; Noble *et al.*, 1958; Stoppani *et al.*, 1958, 1957; Wendell Davis *et al.*, 1956).

Concernant l'impact de la variabilité intra-spécifique sur la germination des spores et la croissance radiale de *Penicillium camemberti* en fonction de l' a_w ou du CO_2 , il est nécessaire d'acquérir des données supplémentaires pour plusieurs souches appartenant à chaque variété avant de pouvoir déterminer des conclusions propres à chaque variété. Déjà évoqué précédemment, il est nécessaire d'améliorer ou de développer une nouvelle méthode afin de faciliter l'acquisition des données de germination.

Dans le cadre de ce travail doctoral, une étude préliminaire a été réalisée sur des fromages à pâte molle et croûte fleurie afin de déterminer l'origine du « jaunissement / brunissement » de ces fromages. Il serait intéressant de développer un projet entièrement dédié à ce phénomène qui apparaît de façon aléatoire lors de l'affinage des fromages ou beaucoup plus tardivement et qui semble pouvoir avoir diverses origines.

La méthode utilisée pour dénombrer la flore fongique à la surface des fromages pourrait être améliorée. En effet, c'est une méthode classique de dénombrements sur géloses qui a été utilisée dans le cadre de cette étude préliminaire. La croûte des fromages a été diluée avec une solution d'eau et de tween 80 (0,01 % w/w) puis le tout a été homogénéisé à l'aide d'un broyeur homogénéisateur. Avec cette méthode, il est difficile de savoir exactement ce qui est dénombré (spores ou bien fragments de mycélium). Des méthodes de biologie moléculaire basées sur la *qPCR* (« *Quantitative Polymerase Chain Reaction* ») ont été développées afin de quantifier de façon plus précise le mycélium de *Penicillium camemberti* au cours de l'affinage des fromages (Le Dréan *et al.*, 2010; Leclercq-Perlat *et al.*, 2013; Lessard *et al.*, 2012). Cette approche pourrait être utilisée et adaptée afin de pouvoir quantifier le mycélium de *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti* à la surface des fromages à pâte molle et croûte fleurie.

L'état physiologique de *Penicillium camemberti* a été estimé sur des caillés modèles grâce à une méthode de *RT-qPCR* (« *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction* ») permettant de suivre l'expression de gènes centraux (*casA*, *casB*, *atg8*, *atg22*) codant pour des protéines impliquées dans différents mécanismes cellulaires comme l'autophagie pour le gène *atg8* (Labonte *et al.*, 2012). Cette étude a permis d'observer des petits changements métaboliques liés au vieillissement mais n'a pas permis de mettre en évidence d'autres stress que ceux liés au développement normal de *Penicillium camemberti*. Le suivi sur 42 jours n'a pas été suffisant pour mettre en évidence une phase de dégradation de *Penicillium camemberti*, il aurait été intéressant de poursuivre cette étude au-delà de cette durée. Cette méthode pourrait être utilisée sur des échantillons de fromages témoins et des fromages présentant un défaut de couleur afin de comparer les profils d'expression de ces gènes. Il pourrait également être envisagé d'utiliser une méthode de « *RNA sequencing* » afin de déterminer les gènes exprimés et leur niveau d'expression sur des fromages témoins et des fromages présentant un défaut de couleur.

III. Références

- Aldars-García, L., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2017). Single vs multiple-spore inoculum effect on growth kinetic parameters and modeled probabilities of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* on pistachio extract agar. *International Journal of Food Microbiology*, *243*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.026>
- Burgain, A., & Dantigny, P. (2016). Inoculation of airborne conidia of *Penicillium chrysogenum* on the surface of a solid medium. *Food Microbiology*, *54*, 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.002>
- Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., Posthumus, M. A., Dijksterhuis, J., Chitarra, G. S., Abee, T., Rombouts, F. M., & Posthumus, M. A. (2004). Germination of *Penicillium paneum* Conidia Is Regulated by 1-Octen-3-ol , a Volatile Self-Inhibitor. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*, 2823–2829. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2823>
- Coroller, L., Rigalma, K., & Dantigny, P. (2014). Projet PHYMIA.01 Modélisation prédictive de la germination et de la croissance par l'étude éco-physiologique de moisissures et de levures d'intérêt alimentaire.
- Dagnas, S. (2015). Développement d'une méthode de quantification du risque d'altération de produits alimentaires par les moisissures. Applications aux produits de Boulangerie, Viennoiserie, Pâtisserie.
- Dagnas, S. P., & Membré, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, *76*(3), 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Dagnas, Stéphane, Gougouli, M., Onno, B., Koutsoumanis, K. P., & Membré, J. M. (2017). Quantifying the effect of water activity and storage temperature on single spore lag times of three moulds isolated from spoiled bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, *240*, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.013>
- Fontaine, K., Hymery, N., Lacroix, M. Z., Puel, S., Puel, O., Rigalma, K., Gaydou, V., Coton, E., & Mounier, J. (2015). Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, *215*, 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.021>
- Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2010). Modelling mould growth under suboptimal environmental conditions and inoculum size. *Food Microbiology*, *27*(7), 909–917. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.015>
- Gillot, G., Decourcelle, N., Dauer, G., Barbier, G., Coton, E., Delmail, D., & Mounier, J. (2016). 1-Octanol, a self-inhibitor of spore germination in *Penicillium camemberti*. *Food Microbiology*, *57*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.008>
- Gillot, G., Jany, J. L., Coton, M., Le Floch, G., Debaets, S., Ropars, J., López-Villavicencio, M., Dupont, J., Branca, A., Giraud, T., & Coton, E. (2015). Insights into *Penicillium roqueforti* morphological and genetic diversity. *Plos One*, *10*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129849>
- Gillot, G., Jany, J. L., Poirier, E., Maillard, M. B., Debaets, S., Thierry, A., Coton, E., & Coton, M. (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001>
- Gitterman, C. O., & Knight, S. G. (1952). Carbon dioxide fixation into amino acids of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Bacteriology*, *64*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1128/jb.64.2.223-231.1952>

- González, H. H. L., Resnik, S. L., & Vaamonde, G. (1988). Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *International Journal of Food Microbiology*, 6(2), 179–183. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(88\)90052-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(88)90052-9)
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. P. (2013). Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.006>
- Graafmans, W. D. J. (1973). The Influence of Carbon Dioxide on Morphogenesis in *Penicillium isariiforme*. *Arch. Mikrobiol*, 91, 67–76.
- Gunde-cimerman, N., & Zalar, P. (2014). Extremely Halotolerant and Halophilic Fungi Inhabit Brine in Solar Salterns Around the Globe. *Food Technology and Biotechnology*, 2, 170–179.
- Kalai, S., Anzala, L., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2017). Modelling the effect of temperature, pH, water activity, and organic acids on the germination time of *Penicillium camemberti* and *Penicillium roqueforti* conidia. *International Journal of Food Microbiology*, 240, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.024>
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A. A., Galinski, E. A., & Gunde-Cimerman, N. (2007). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 153(12), 4261–4273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Labonte, R., Des, D., Des, S., & Et, A. (2012). Estimation De L ' Etat Physiologique De *Penicillium Camemberti* Lors De L ' Affinage Du Camembert.
- Lahlali, R., Serrhini, M. N., & Jijakli, M. H. (2005). Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 315–322. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.002>
- Le Dréan, G., Mounier, J., Vasseur, V., Arzur, D., Habrylo, O., & Barbier, G. (2010). Quantification of *Penicillium camemberti* and *P. roqueforti* mycelium by real-time PCR to assess their growth dynamics during ripening cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.013>
- Leclercq-Perlat, M. N., Picque, D., Martin del Campo Barba, S. T., & Monnet, C. (2013). Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses under different conditions of temperature and relative humidity. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 4031–4040. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6372>
- Lessard, M. H., Bélanger, G., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). The composition of camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.06645-11>
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M. L., & Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003>
- Morin-Sardin, S., Rigalma, K., Coroller, L., Jany, J. L., & Coton, E. (2016). Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food Microbiology*, 56, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.019>
- Musa, H., Kasim, F. H., Nagoor Gunny, A. A., & Gopinath, S. C. B. (2018). Salt-adapted moulds and yeasts: Potentials in industrial and environmental biotechnology. *Process Biochemistry*, 69(March), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.026>

- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Coroller, L., Dadure, R., Debaets, S., Mounier, J., & Vasseur, V. (2017). Modelling the effect of water activity reduction by sodium chloride or glycerol on conidial germination and radial growth of filamentous fungi encountered in dairy foods. *Food Microbiology*, *68*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.014>
- Nguyen Van Long, N., Rigalma, K., Jany, J. L., Mounier, J., & Vasseur, V. (2021). Intraspecific variability in cardinal growth temperatures and water activities within a large diversity of *Penicillium roqueforti* strains. *Food Research International*, *148*(April). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110610>
- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Coroller, L., Dantigny, P., Le Panse, S., Weill, A., Mounier, J., & Rigalma, K. (2017). Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.022>
- Noble, E. P., Reed, D. R., & Wang, C. H. (1958). Utilization of acetate, pyruvate, and CO₂ by *Penicillium digitatum*. *Canadian Journal of Microbiology*, *4*(5), 469–476. <https://doi.org/10.1139/m58-050>
- Plemenitaš, Ana, Konte, T., Gostinč, C., & Cimerman, N. G. (2016). Transport Systems in Halophilic Fungi. Yeast Membrane Transport, *Advances in Experimental Medicine and Biology* *892*, 307–325. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6>
- Sautour, M., Dantigny, P., Guilhem, M. C., & Bensoussan, M. (2003). Influence of inoculum preparation on the growth of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(5), 1034–1038. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02073.x>
- Stoppani, A. O., Conches, L., De Favelukes, S. L., & Sacerdote, F. L. (1958). Assimilation of carbon dioxide by yeasts. *The Biochemical Journal*, *70*(3), 438–455. <https://doi.org/10.1042/bj0700438>
- Stoppani, A. O., Favelukes, L. S., De Conches, L., & Sacerdot, F. L. (1957). Mechanism of carbon dioxide fixation by *Saccharomyces cerevisiae*.
- Visconti, V., Rigalma, K., Coton, E., & Dantigny, P. (2020). Impact of intraspecific variability and physiological state on *Penicillium commune* inactivation by 70% ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, *332*(February), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108782>
- Visconti, V., Rigalma, K., Coton, E., & Dantigny, P. (2021). Impact of the physiological state of fungal spores on their inactivation by active chlorine and hydrogen peroxide. *Food Microbiology*, *100*(June). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103850>
- Wendell Davis, J., Vernon, H., & Bert E., C. H. (1956). Carbon dioxide fixation and biosynthesis of amino acids in yeast. *Biochimica and Biophysica acta*, *21*, 101–105.

Chapitre 7 : Valorisations

I. Publications

1. Publication acceptée

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J. L., Bregier, T., Pawtowski, A., Barbier, G., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., & Coroller, L. (2022). Impact of water activity on the radial growth of fungi in a dairy environment. *Food Research*, 157(April).

2. Publications en préparation

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J. L., Koullen, L., Couvert, O., Huchet, V., & Coroller, L.. Impact of carbon dioxide partial pressure on the radial growth of fungi in a dairy environment (soumission au journal *Food Microbiology*).

Valle, M., Nguyen Van Long, N., Jany, J. L., Koullen, L., Rigalma, K., Vasseur, V., Huchet, V., & Coroller, L.. Impact of sodium chloride and carbon dioxide partial pressure on conidial germination and radial growth of *Penicillium camemberti* (soumission au journal *Food Microbiology*).

II. Communication orale

Marion Valle, Nicolas Nguyen Van Long, Jean-Luc Jany, Karim Rigalma, Valérie Vasseur, Véronique Huchet, Louis Coroller. Investigating the origin of soft cheeses color defect. *Les journées scientifiques de l'ED EGAAL* (visioconférence).

Investigating the origin of soft cheeses color defect

Marion Valle^{a,b}, Nicolas Nguyen Van Long^b, Jean-Luc Jany^a, Karim Rigalma^a, Valérie Vasseur^a, Véronique Huchet^b, Louis Coroller^a

^a Université de Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

Keywords : alimentation ; fungi ; water activity.

Abstract :

In food industry, filamentous fungi can be used for the production of fermented products, e.g. *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* are usually used as culture adjunct to ripen soft cheeses (e.g. Camembert, Brie). In some cases, an undesirable yellow or brown color can appear on the cheese surface. According to different authors, *Penicillium camemberti* was hypothesized to play a role in this coloration defect. The present case-study aimed to investigate a specific color defect issue observed at the manufacturing level.

Samples of spoiled and non-spoiled (controls) industrial cheeses were collected. This study was focused on Brie (30 samples) for which enough crust was available for all analyses. Microbiological, colorimetric and physico-chemical analyses (measurements of water activity, pH, dry matter and volatile fatty acid, NaCl, lactates and tyrosine contents) were performed on cheese surface. The data collected were analysed by a Principal Component Analysis (PCA).

Two types of cheese were identified with the PCA : i) cheeses with an undesirable yellow color (spoiled cheeses) and ii) control cheeses without visible and detectable spoilage. Compared to control cheeses, the yellow cheeses are associated with a relative high presence of *Penicillium camemberti* and high contents of NaCl, L-lactates, acetic acid, isovaleric acid and iso butyric acid. In addition, these cheeses had low values of pH, water activity, relative presence of *Geotrichum candidum* and contents of butyric acid and caproic acid.

The water activity of yellow cheeses was lower than in control cheeses explained by a high salt content. *G. candidum* is described as a salt sensitive species. Therefore, we assumed that this defect may be probably due to an inhibition of *G. candidum* growth by high salt content. Therefore, the fungi could not cover the cheese surface. Moreover, the pH and the content of butyric acid of yellow cheeses were lower than in control cheeses. *G. candidum* is described as a species which consumes lactate but not lactose and produces butyric acid. If *G. candidum* growth was inhibited by high salt content there were not lactate consumption (linked to a low pH) and butyric acid production. High salt content might be due to a salting step of cheeses which was not homogenous or the curd was not homogenous which leading to a heterogeneous diffusion of salt in the cheese matrix.

III. Communications affichées (poster)

Marion Valle, Nicolas Nguyen Van Long, Jean-Luc Jany, Karim Rigalma, Valérie Vasseur, Louis Coroller. Effect of water activity reduction by glycerol or sodium chloride on radial growth of sixteen filamentous fungi encountered in dairy environment. *EFFoST Novembre 2021, Lausanne (Suisse)*.

Effect of water activity reduction by glycerol or sodium chloride on radial growth of sixteen filamentous fungi encountered in dairy environment

Marion Valle^{a,b}, Nicolas Nguyen Van Long^b, Jean-Luc Jany^a, Karim Rigalma^a, Valérie Vasseur^a, Louis Coroller^a

^a Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

Filamentous fungi are used as starters in fermented products, but can also they can also spoil foods leading to waste and economic losses. Predictive microbiology is mainly focused on the assessment of spoilage and sanitary risks linked to bacterial activity, while there is a lack of information about the growth of fungi in foods. To study the diversity of filamentous fungi physiology, the impact of water activity (a_w) reduction was assessed on the radial growth of sixteen starter or spoiler species (*Penicillium roqueforti*, *Geotrichum candidum* and others) encountered in dairy products.

Several media with different water activities were used. The a_w was adjusted with glycerol or sodium chloride. These media were inoculated with standardized conidia suspension and incubated at 25°C. The thallus growth kinetics were monitored and modelled. Then, the estimated fungal growth rates were modelled as a function of a_w for both solutes.

The impact of a_w reduction on growth rate was species dependant. Among the tested species, *Fusarium domesticum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor lanceolatus* and *Paecilomyces niveus* (growth limits $\geq 0.920 a_w$) were the most sensitive and *Aspergillus* and *Penicillium* spp. were the less sensitive to a_w reduction (growth limits $\leq 0.880 a_w$). The most resistant strains to low a_w were the same whatever the solute. Nevertheless, the sensitivity to a_w reduction depends on solute. The a_w reduction has a constant effect on the radial growth using glycerol. In contrast, using sodium chloride, a greater reduction of the growth rate is observed at high a_w compared to low a_w , for a same a_w reduction. When the fungi grow on salted media, the water activity and the ionic strength act together on the fungal activity. A low addition of salt in food strongly could reduce the fungi growth rate and this effect could be amplified by a combination of abiotic factors.

Valle Marion, Nguyen Van Long Nicolas, Jany Jean-Luc, Koullen Loona, Couvert Olivier, Huchet Véronique, Coroller Louis. Impact of carbon dioxide on radial growth of fourteen filamentous fungi encountered in dairy environment. *IAFP, Munich Mai 2022 (Allemagne)*.

Impact of carbon dioxide on radial growth of fourteen filamentous fungi encountered in dairy environment

Valle Marion ^{a,b}, Nguyen Van Long Nicolas ^b, Jany Jean-Luc ^a, Koullen Loona ^a, Couvert Olivier ^a, Huchet Véronique ^b, Coroller Louis ^a

^a Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, F-29000 Quimper, France

^b ADRIA Développement, UMT ACTIA 19.03 ALTER'IX, Quimper, France

Introduction: Filamentous fungi are used as starters in fermented products, but they can also spoil food leading to waste and economic losses. Modified Atmospheres Packaging (MAP) is recognized to delay the spoilage which there is a lack of information about the growth of fungi in foods as a function of MAP gas composition.

Purpose: The present study investigated the impact of carbon dioxide (CO₂) on the radial growth of fourteen starters or spoilers encountered in dairy products.

Methods: The experiments were performed on Potato Dextrose Agar medium at pH 4.7 inoculated with conidia suspension and placed into a controlled atmosphere chamber during 70 days at 25°C. All studied atmospheres were composed of 5% of oxygen, 8 CO₂ levels between 0 and 70% and supplemented with nitrogen. The atmosphere was renewed each hour to ensure the stability of chamber gas composition. The growth rates were estimated on thallus growth kinetics and modelled as a function of undissociated carbonic acid concentration ([AH]). For each strain, the [AH]₅₀ which allowed to reduce the growth by 50% was estimated.

Results: *Penicillium bialowiezense* was the most sensitive strain to CO₂, no observed growth at 50% CO₂, followed by *Cladosporium herbarum* and *Bisifusarium domesticum* with no observed growth at 70% CO₂. All other strains were able to grow at 70% CO₂. Several behaviours were observed like a linear decrease of μ_{max} over the presence of an optimal growth value of CO₂. *Mucor lanceolatus* was the less sensitive strain to CO₂.

Significance: This study may help to understand the fungal diversity adaptation to modified atmospheres and allows to model mycelial growth under MAP conditions which could provide a better control of fungal spoilage of dairy products.

Titre : Effets des conditions de stockage et de formulation des produits laitiers sur la physiologie des moisissures d'intérêt technologique et d'altération.

Mots clés : champignons filamenteux, germination des spores, croissance mycélienne, activité de l'eau, atmosphères modifiées, mycologie prévisionnelle

Résumé : Dans l'industrie laitière, certains champignons filamenteux sont utilisés comme ferments alors que d'autres sont responsables de l'altération des produits laitiers. Leur développement peut être contrôlé par plusieurs facteurs abiotiques.

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de l'activité de l'eau et des atmosphères modifiées sur la germination des spores de *Penicillium camemberti* et la croissance radiale de seize moisissures rencontrées dans l'environnement laitier.

Une diminution de la disponibilité en eau et une augmentation de la force ionique retardent la germination des spores et la croissance radiale. Une pression partielle en CO₂ de 70% ne permet pas d'inhiber la germination des spores et la

croissance radiale de toutes les souches étudiées. La majorité des souches sont sensibles à la pression partielle en CO₂ tandis que certaines sont sensibles à l'acide carbonique non dissocié.

Plusieurs modèles couramment utilisés chez les bactéries ont été adaptés pour décrire la réponse des moisissures et ainsi améliorer les outils de mycologie prévisionnelle existants. Une étude a été réalisée sur des fromages à pâte molle et croûte fleurie présentant des défauts de couleur. Les résultats obtenus montrent qu'un salage hétérogène semble inhiber le développement du microorganisme utilisé pour recouvrir la surface des fromages et donc à l'origine du défaut de fabrication.

Title: Effects of storage and formulating conditions of dairy products on physiology of adjunct and spoiler molds.

Keywords: filamentous fungi, conidial germination, mycelial growth, water activity, modified atmospheres, predictive mycology

Abstract: In dairy industry, some filamentous fungi are used as adjuncts whereas others are responsible for dairy product spoilage. Their development could be controlled by several abiotic factors.

The aim of this work was to study the effect of water activity and modified atmospheres on conidial germination of *Penicillium camemberti* and radial growth of sixteen different molds encountered in dairy environment.

Water availability decrease as well as ionic strength increase delayed conidial germination and radial growth. A CO₂ partial pressure of 70% did not inhibit neither the conidial germination nor

the radial growth of all the tested strains. The majority of strains were sensitive to CO₂ partial pressure while some strains were sensitive to undissociated carbonic acid.

Several models currently used for bacteria were adapted to describe the mold responses and thus improve the predictive mycology tools.

A study was performed on soft mold ripened cheeses with color defects. The results showed that a heterogenous salting seems to inhibit the development of microorganisms used to cover cheese surfaces and thus at the origin of production defect.