



**HAL**  
open science

# Approche multi-échelle des interactions entre inhibiteurs bactériens et milieux biphasiques

Agathe Dutoit

## ► To cite this version:

Agathe Dutoit. Approche multi-échelle des interactions entre inhibiteurs bactériens et milieux biphasiques. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2024. Français. NNT : 2024BRES0035 . tel-04694685

**HAL Id: tel-04694685**

**<https://theses.hal.science/tel-04694685>**

Submitted on 11 Sep 2024

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

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

Par

**Agathe DUTOIT**

**Approche Multi-échelle des Interactions  
entre Inhibiteurs Bactériens et Milieux Biphasiques**

Thèse présentée et soutenue à Quimper, le 18 juin 2024

Unité de recherche : Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM)

## Rapporteurs avant soutenance :

Stéphane GUYOT	Maître de conférences, Institut Agro, Dijon
Nadia OULAHAL	Professeure des Universités, Université Claude Bernard, Lyon

## Composition du Jury :

Président :	Philippe FRAVALO	Professeur du CNAM, Ploufragan
Examineurs :	Stéphane GUYOT Nadia OULAHAL	Maître de conférences, Institut Agro, Dijon Professeure des Universités, Université Claude Bernard, Lyon
Dir. de thèse :	Louis COROLLER	Professeur des Universités, Univ Brest, Quimper
Co-encadrants :	Nicolas DECOURCELLE Anne-Gabrielle MATHOT	Maître de conférences, Univ Brest, Quimper Maître de conférences, Univ Brest, Quimper

## Invité(s)

Fanny TENENHAUS-AZIZA	Coordinatrice du projet, CNIEL, Paris
-----------------------	---------------------------------------



Le projet de thèse a été mené au Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne (LUBEM), USC INRAE 1504, sur le site de Quimper et s'inscrit dans le cadre de l'UMT ACTIA ALTER'IX (2019-2023), un partenariat entre l'ADRIA Développement et le LUBEM.

Le projet de thèse a été en partie financé par des bourses régionales (Quimper Bretagne Occidentale et ARED) ainsi que par le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) situé à Paris. Dans ce cadre, l'avancement du projet a été suivi lors de trois comités de pilotage entre septembre 2022 et mai 2024. La composition du comité de pilotage était la suivante :

TENENHAUS-AZIZA Fanny\*, CNIEL

ABRAHAM Laurence, ENTREMONT

ALVAREZ MARTIN Pablo,

ENTREMONT

AUGUSTIN Jean-Christophe, DANONE

COROLLER Louis, LUBEM

COUSIN Stéphane, GUILLOTEAU

DECOURCELLE Nicolas, LUBEM

DUVIVIER Anne, INGREDIA

GAUCHER Isabelle, SOREDAB

GAUVRY Emilie, BEL

GUERIN Alizée, SOREDAB

HATTE Jean-Louis, LACTALIS

JAMET Emmanuel, BEL

MATHOT Anne-Gabrielle, LUBEM

NOEL Laurent, EURIAL

RAULT Aline, SOREDAB

\*Coordinatrice du projet

Le comité de suivi individuel (CSI) de la thèse s'est réuni chaque année et était composé de :

DUBOIS-BRISSONNET Florence, Professeure des Universités, Université Paris-Saclay, INRAE UMR Micalis.

LINDER Michel, Professeur des Universités, Université de Lorraine, Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules.



## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance au Professeur Emmanuel COTON de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et avoir été attentif à l'avancement de mon projet de thèse pendant ces trois années.

J'adresse également mes sincères remerciements à Mme Nadia OULAHAL et M. Stéphane GUYOT d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'évaluer mon travail. Je remercie également M. Philippe FRAVALO de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Mon projet de thèse n'aurait pu aboutir sans le support et la complémentarité de mes trois encadrants, merci infiniment pour la confiance que vous m'avez accordée.

Un énorme merci Louis COROLLER, d'avoir été un directeur de thèse investi et disponible. Tu as toujours su trouver du temps pour porter ce projet et tu as toujours cru en sa réussite (bien plus souvent que moi je dois l'avouer). Merci d'être ce directeur de thèse avec qui on peut aussi bien discuter de sciences, de problèmes de manips, de scripts Matlab que de voyages ou de randonnées en montagne (et tout ça, toujours dans la bonne humeur !). Merci pour tout ce que tu m'as apporté tout au long de ces trois années (et pour toutes les questions que tu m'auras fait me poser : pourquoi ? c'est quoi ton objectif ?). C'est un honneur de faire partie des doctorants que tu as dirigés.

Merci sincèrement Anne-Gabrielle MATHOT d'avoir co-encadré ces travaux. Je te remercie de ton investissement, ta bienveillance, tes nombreux conseils avisés sur mes expériences et ton regard critique sur mes résultats qui m'a toujours permis de voir les choses sous un autre angle et de donner le meilleur de moi-même !

Nicolas DECOURCELLE, je te remercie chaleureusement de m'avoir fait confiance en premier lieu dans la réalisation de ce projet. Merci de ton soutien et de ton expertise sur la biochimie des émulsions. Tu m'as beaucoup appris et je regrette que tu n'aies pu me suivre jusqu'au bout.

Je tiens à remercier Fanny TENENHAUS-AZIZA et les membres de mon comité de pilotage pour nos moments d'échanges. Un grand merci également aux membres de mon comité de suivi individuel, Florence DUBOIS-BRISSONNET et Michel LINDER pour leur expertise et leurs conseils sur mes travaux de recherche. J'aimerais remercier également M. Thierry AUBRY, Professeur à l'UBO, pour ses conseils aussi bien sur la rhéologie des émulsions que sur la thèse en général, M. Mathieu BERCHEL, Maître de conférences à l'UBO, pour nos échanges sur la caractérisation des émulsions et son accueil dans son laboratoire de chimie et enfin merci à Mme Fabienne COURAND, de l'ADRIA, pour son temps et son aide concernant les mesures granulométriques.

Ces trois années de thèse n'auraient pas été aussi agréables sans la présence des collègues du LUBEM et du bâtiment G, je vous remercie tous d'avoir rendu ces journées de travail pleines de vie, que ce soit au laboratoire ou au café des spores.

Merci Ivan, Noémie et Olivier, pour vos conseils et votre aide quand j'en avais besoin.

Merci Corinne, pour ta bonne humeur et pour savoir si bien gérer les situations administratives.

Merci Roua et Barbara pour votre gentillesse et vos sourires à toute épreuve.

Merci Alexandra, pour ton dynamisme enjoué, pour ton aide avec la GC, pour ton soutien et tes précieux conseils sur la thèse.

Merci Clément, d'avoir été ce « grand-frère de thèse » (promis, tu es le seul pour qui j'utilise la métaphore de la famille car on sait que « LUBEM = grande famille » c'est du déjà-vu). Merci de m'avoir si bien épaulée pour les enseignements, de m'avoir appris les rouages de la cytométrie en flux, de m'avoir conseillée et encouragée mais aussi pour avoir bien su me taquiner (faut dire que tes refs seul toi les connais).

Merci Loïc pour m'avoir souvent fait rire grâce à tes blagues (pas si drôles en fait mais bon je reste Mme Bon Public) ou grâce à tes talents de nageur (tu maîtrises la pirouette comme personne). J'espère que tu trouveras un nouveau public pour apprécier tes bêtises et pour te rappeler que les années passent (c'est cadeau).

Merci Loona, d'être la personne 'indispensable' au laboratoire. Merci pour ton calme, ton écoute et l'aide précieuse que tu m'auras si souvent apportée. Surtout merci pour nos petites discussions entre deux PSMs qui ont égayé les journées manips, pour tes nombreux conseils de lecture, et pour tous ces mots fléchés partagés.

Merci Noémie, d'être venue, restée, partie, puis revenue et repartie du LUBEM. A chacun de tes passages, c'était un plaisir de travailler avec toi et tes petites 'catastrophes' et anecdotes de vie ont très bien rythmé ces journées passées au laboratoire.

Merci Pierric, le fromager du labo (j'étais obligée), pour ton investissement et ton aide si précieuse ces derniers mois sur les expériences. Ton travail a fortement contribué à l'aboutissement de ces travaux, je t'en remercie sincèrement.

Un merci tout particulier à mes colocataires de bureau, le bureau G120 a vu défiler de nombreux occupants ces dernières années. Merci d'avoir fait du bureau un lieu d'animation, d'effervescence et d'échanges.

Merci aux anciens : Junior pour tes jeux de mots et tes brioches Minguy, Marion pour tes conseils et ta gentillesse, Manon pour ton écoute et tes coups de gueule et Marie pour ta bonne humeur et tes « ou quoi ».

Merci Fabien (ou plutôt bravo) d'avoir été le seul colocataire du bureau G120 à m'avoir supporté du début à la fin. Je te remercie pour ta patience, pour ta disponibilité et pour tes nombreux conseils avisés (et merci d'être toujours partant quand il s'agit de faire des apéros plage ou d'aller surfer).

Merci Marwa pour ta douceur et ta bienveillance.

Merci Kévin pour ton optimisme et pour avoir partagé avec moi les joies de la rédaction.

Merci Kaoutar, d'avoir été une voisine de bureau compréhensive et enthousiaste. Merci pour nos heures de discussions à propos de nos manip ratées ou réussies, de nos scripts Matlab, de nos joies et peines de thésardes quoi !

Enfin, je souhaite le meilleur à la relève : Hadrien (avec un H), Erwan (ou plutôt devrais-je dire Yves Leroux), et Youness, dans votre aventure de doctorants ! N'oubliez pas que « cela semble toujours impossible, jusqu'à ce qu'on le fasse », comme le disent les plus grands de ce monde.

Je tiens également à remercier Marie, Léni et Maxence, les stagiaires que j'ai eu l'opportunité d'encadrer et dont les stages ont contribué à l'avancement de mes travaux.

Et puis il y a ces collègues qui deviennent des amis...

Un merci, tout particulier, à la team des « Ty'Potes », Loona, Manon, Fabien, Clément et Charly pour tous les moments que l'on a pu partager : entre les pintes du Ty'Mouss, les crêperies Place au Beurre, les cours de surf à Tréguennec mais surtout la dizaine (voir quinzaine ?) d'escapes game dans le Finistère. Sans oublier ce weekend riche en sensation au Parc Astérix. Tous ces moments avec vous m'ont permis de m'évader de la thèse et de vivre mes plus beaux fous rires (Oui Clément, Charlie je n'oublierais jamais votre performance en chant et votre talent pour les déguisements) et mes plus belles peurs (désolée encore Manon pour ta main dans le Goudurix). A quand Europa-park ? 😊

Comment ne pas finir en beauté sur les personnes du bâtiment G sans mentionner ma chère Garance. Merci Gaga pour tout ce que nous avons partagé pendant ces trois années, je ne sais même pas par où commencer : les restaurants en tête à tête, les pique-niques à la plage, les mardis piscine, les mercredi pâtes au saumon et films Disney, les jeudis portions de frites aux Planches, les dimanches surf et balades au bord de mer et j'en passe. Tu m'as tellement apporté que je ne pourrais regretter cette aventure de la thèse et je suis reconnaissante d'avoir pu la vivre à tes côtés (et j'espère que ça va continuer, pas la thèse hein, notre amitié).

Et puis il y a tous ceux qui sont là depuis des années, mes amis qui ont suivi de près ou de loin mon aventure en Bretagne. Merci pour votre soutien. Difficile de citer tous ceux qui ont été présents pour moi, alors un merci particulier à ceux d'entre vous qui sont venus me voir jusqu'à Quimper, votre présence m'a toujours fait chaud au cœur.

Merci Marine et Clément, la team des grenoblois expatriés en Bretagne. Je vous remercie pour nos moments partagés dans notre région d'adoption et le réconfort que vous m'avez procuré en retrouvant un peu de chez nous, si loin de nos montagnes.

Merci Elisa, d'avoir partagé un bout de mon aventure bretonne pour quelques semaines et surtout d'avoir été là pour moi malgré la distance. Merci pour ton amitié et ton soutien inébranlable depuis le lycée.

Merci mes coupines Camou et Mathou, à notre trio sur lequel je peux toujours compter. Je vous remercie pour votre présence et votre écoute, pour nos nombreux week-ends à travers la France (avec les autres onirissiens) et pour nos superbes vacances passées ensemble ces dernières années, que ce soit au ski ou en Ecosse, j'ai déjà hâte de nos prochains projets.

Enfin, merci à ma plus belle rencontre en Bretagne, Guéno. Je suis si reconnaissante que tu sois entré dans ma vie, le meilleur est à venir.

Je terminerais en remerciant du plus profond de mon cœur ma famille. Merci à mes grandes sœurs, Marion et Camille, pour les modèles de femmes fortes, intelligentes, ambitieuses et aimantes que vous êtes pour moi depuis des années. Merci d'avoir toujours été là pour moi. Et merci à vous et à mes beaux-frères d'avoir fait de moi la plus heureuse des tatas. Ces moments partagés avec Léonie, Ambre et Paul ont été si précieux et ressourçants pendant ces trois ans. Enfin merci à mes parents, pour leur soutien inconditionnel malgré la distance qui nous séparait, merci d'avoir si souvent parcouru ces 1000 km pour venir découvrir cette belle région et passer du temps à mes côtés, merci pour ces longues heures passées au téléphone le dimanche soir à écouter mes doutes, mes déceptions mais aussi mes petites victoires. Surtout merci d'avoir contribué à faire de moi celle que je suis aujourd'hui. Merci Papa de m'avoir offert ton vieux microscope quand j'avais 12 ans, tu ne t'en souviens sûrement pas mais c'est peut-être là qu'est née ma vocation pour le « monde microscopique » ? Merci de m'avoir transmis ta curiosité scientifique et d'être la personne sur qui je peux compter quand il s'agit de gérer des problèmes mécaniques ou administratifs. Merci Maman d'être ma plus grande supportrice, de m'avoir si souvent écoutée et encouragée. Merci de m'avoir transmis ta ténacité indispensable pour la réussite de cette thèse et merci d'avoir toujours pris soin de moi et de croire en moi.

En bref, très chère Bretagne merci, je t'aurais souvent critiquée toi et ton climat si particulier, je t'ai souvent comparée à mes belles montagnes qui me manquaient, mais je t'ai aussi aimée et une chose est sûre, je ne pourrais pas t'oublier et qui sait, je reviendrais ?

# Table des matières

---

<b>Chapitre 1 : Introduction générale .....</b>	<b>19</b>
1. Les bactéries sporulées du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	21
1.1. Diversité du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	21
1.2. <i>Bacillus cereus</i> , un challenge pour l'industrie alimentaire.....	22
1.2.1. Agent de toxi-infections alimentaires .....	22
1.2.2. Moyens de maîtrise .....	23
1.3. Cycle de vie des bactéries sporulées.....	25
1.3.1. Le mécanisme de sporulation .....	25
1.3.2. La structure de la spore .....	27
1.3.3. Le mécanisme de germination et de reprise de croissance.....	28
2. Les composés inhibiteurs, les acides en particulier .....	31
2.1. Structure et caractéristiques physico-chimiques d'un acide.....	31
2.1.1. La structure chimique d'un acide carboxylique .....	31
2.1.2. La constante de dissociation $pK_a$ .....	32
2.1.3. Le coefficient de partition Log P.....	33
2.1.4. Caractéristiques physico-chimiques des acides gras en particulier.....	34
2.2. L'activité antibactérienne des acides sur les bactéries sporulées .....	35
2.2.1. Mécanismes d'action des acides sur les cellules végétatives.....	35
2.2.2. Mécanismes d'action des acides sur les spores .....	37
3. La matrice alimentaire : cas des émulsions huile dans eau.....	39
3.1. Généralités sur les émulsions alimentaires .....	39
3.1.1. Définition et caractéristiques d'une émulsion huile dans eau .....	39
3.1.2. Les voies de stabilisation.....	41
3.1.3. La complexité des émulsions alimentaires.....	42
3.2. Facteurs intrinsèques à l'émulsion influençant le développement microbien.....	43
3.2.1. La structure.....	43
3.2.2. La composition chimique .....	44
3.3. Influence des facteurs intrinsèques sur l'activité de composés inhibiteurs .....	45
3.3.1. Interactions avec la phase grasse.....	46
3.3.2. Interactions avec les émulsifiants (surfactants, protéines, polysaccharides).....	47
4. La microbiologie prévisionnelle .....	48

4.1. Evaluation de la croissance microbienne.....	48
4.1.1. Description de la cinétique de croissance microbienne.....	48
4.1.2. Les modèles primaires décrivant la cinétique de croissance microbienne.....	50
4.1.3. Les modèles secondaires décrivant l'effet de facteurs environnementaux sur la croissance microbienne.....	51
4.2. Evaluation de l'effet antimicrobien par modélisation .....	52
5. Les objectifs de la thèse .....	55
6. Références.....	57

**Chapitre 2 : Relation entre efficacité inhibitrice et propriétés physico-chimiques de six acides organiques et de la monolaurine contre *B. weihenstephanensis* KBAB4 en milieu nutritif liquide..... 71**

1. Abstract.....	74
2. Introduction.....	74
3. Materials and methods .....	76
3.1. Bacterial strain and cell preparation .....	76
3.2. Inhibitory compounds.....	76
3.3. Bioscreen growth experiments .....	77
3.4. Investigating the acid form responsible for <i>B. weihenstephanensis</i> growth inhibition. ....	79
3.5. Modelling the effect of acid concentration on growth rate .....	79
3.6. Model fitting and statistical analysis .....	80
4. Results.....	81
4.1. Effect of the compound form on <i>B. weihenstephanensis</i> growth rate.....	81
4.2. Selection of the best-fitting model to describe <i>B. weihenstephanensis</i> growth inhibition by organic and fatty acids .....	83
4.3. Evaluation of acid inhibitory efficacy according to their physicochemical characteristics .....	87
5. Discussion.....	89
6. Conclusion .....	92
7. Acknowledgements.....	93
8. References.....	94

**Chapitre 3 : L'exposition à une émulsion H/E et la concentration en acides impactent l'inhibition de croissance et la culturabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ..... 99**

1. Abstract.....	102
2. Introduction.....	103
3. Materials and methods .....	104
3.1. Bacterial strain and spore production .....	104
3.2. Tested acids and solution preparation .....	104
3.3. Emulsion preparation.....	106
3.4. Particle size determination and stability .....	106
3.5. Enumeration of viable cells in nutrient broth and emulsion medium with plate counting .....	107
3.6. Flow cytometry measurements .....	107
3.7. Effect of the recovery medium on culturability of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 incubated in emulsion.....	108
3.8. Model development .....	109
3.9. Statistical analysis.....	110
4. Results.....	112
4.1. Particle size determination and stability .....	112
4.2. Growth kinetics of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 in nutrient broth and in O/W emulsion, with organic acids.....	112
4.3. Viability assessment of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 cells during growth by flow cytometry.....	115
4.4. Effect of the recovery medium on culturability of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 cells in emulsion .....	117
4.5. Simulating the temporary loss of culturability of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 on BHA .....	119
5. Discussion.....	121
6. Conclusion .....	123
7. Acknowledgments .....	124
8. References.....	125

**FOCUS Chapitre 3 : Précisions sur la formulation de l'émulsion H/E 50/50 modèle ... 129**

1. Définition de l'émulsion modèle : prérequis et exigences.....	130
2. Justification de la formulation de l'émulsion modèle.....	131
2.1. La phase aqueuse .....	131

2.2. La phase grasse .....	132
2.3. La phase interfaciale .....	133
3. Vérification de l'effet du Tween 80 sur la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 et sur l'activité inhibitrice des composés .....	136
3.1. Effet du Tween 80 sur la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4.....	136
3.2. Effet du Tween 80 sur l'activité inhibitrice des acides organiques .....	137
4. Conclusion .....	139
5. Références.....	140

**Chapitre 4 : Influence de la formulation d'émulsions et d'une matrice fromagère sur l'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide lactique et de l'acide caprylique..... 145**

1. Introduction.....	147
2. Matériels et méthodes .....	149
2.1. Matériel biologique, conditions de croissance et sporulation.....	149
2.2. Les acides inhibiteurs .....	149
2.3. Préparation des phases des émulsions .....	150
2.3.1. Préparation des phases aqueuses .....	150
2.3.2. Préparation des phases grasses .....	151
2.4. Fabrication des émulsions .....	151
2.4.1. Emulsions H/E 20/80 composées d'hexadécane et de Tween 80 (HEX_T80)	152
2.4.2. Emulsions H/E composées d'hexadécane et de caséinates (HEX_CAS).....	152
2.4.3. Emulsions H/E composée de matière grasse laitière et de caséinates (MGLA_CAS) .....	152
2.5. Mesures granulométriques et suivi de stabilité.....	153
2.6. Fabrication de la matrice fromagère .....	153
2.7. Inoculation et suivi de la germination et de la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 dans les différents milieux .....	155
2.7.1. Inoculation et énumération des spores et cellules totales dans les émulsions 20/80 .....	155
2.7.2. Inoculation et énumération des spores et cellules totales dans la matrice fromagère .....	155
2.8. Modélisation et analyses statistiques .....	156
2.8.1. Modèle de germination.....	156
2.8.2. Modèle de croissance .....	157

2.8.3. Analyses statistiques .....	157
3. Résultats.....	158
3.1. Effet de la formulation et des acides sur la structure et la stabilité des émulsions H/E 20/80 .....	158
3.2. Effet de l'émulsifiant et des acides sur la germination et la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 en milieu aqueux .....	161
3.3. Effet de l'émulsifiant, de la phase grasse et des acides sur la germination et la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 en émulsion H/E 20/80 .....	164
3.4. Effet de la concentration en acides sur la germination et la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 en matrice fromagère .....	167
3.5. Influence du milieu sur la germination et la croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 en fonction des acides étudiés .....	170
4. Discussion.....	171
4.1. La complexification de la formulation impacte la structure du milieu.....	171
4.2. La formulation du milieu influence avant tout la croissance de la souche.....	172
4.3. L'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide caprylique est impactée par la formulation du milieu .....	173
4.4. L'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide lactique est influencée par la présence de caséinates, qui entraînent une diminution du pH.....	175
5. Conclusion .....	178
6. Références.....	180
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>185</b>
Références .....	198
<b>Valorisations .....</b>	<b>203</b>
1. Publications.....	204
2. Communications orales et affichées .....	204
3. Activités d'enseignement et d'encadrement .....	205

## Liste des figures

---

Figure 1 : Occurrence (orange) et moyens de maîtrise (jaune et vert) de la contamination des aliments par des spores bactériennes au cours de leur transformation et en lien avec le cycle de vie des bactéries sporulées (d'après Trunet, 2016).....	25
Figure 2 : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation d'une bactérie sporulée du groupe <i>B. cereus sensu lato</i> (d'après Mckenney et al., 2013).....	26
Figure 3 : Observation microscopique d'une spore de <i>Bacillus weihenstephanensis</i> KBAB4 au microscope électronique à transmission (x35000) avec ses différentes structures. Photographie : I. Bornard, E. Baril, INRA Avignon, 2009. ....	27
Figure 4 : Evènements majeurs du processus de germination des spores de <i>Bacillus spp</i> (d'après Setlow, 2014a; et Setlow et al., 2017).....	29
Figure 5 : Structure chimique d'un acide mono-carboxylique .....	31
Figure 6: Schéma d'un monomère d'acide gras (A) et d'une micelle (B) .....	34
Figure 7: Principaux mécanismes cibles des acides organiques sur les cellules végétatives bactériennes (modifié de Yoon et al., 2018) .....	37
Figure 8 : Exemple d'une émulsion alimentaire Huile dans Eau (sauce salade) observée au microscope à l'aide d'un DIC (Differential Interference Contrast) (photographie issue de McClements, (2016)). ....	39
Figure 9: Les phénomènes de déstabilisation des émulsions H/E par des mécanismes physiques : crémage, sédimentation, floculation et coalescence.....	40
Figure 10 : Représentation schématique des principaux constituants d'une émulsion huile/eau en fonction de la région, d'après Berton-Carabin & Schroën, (2019). Le schéma n'est pas à l'échelle. ....	42
Figure 11 : Schéma représentant les différents environnements et modes de croissance microbiens dans un échantillon de fromage (issu de Wilson et al., (2002)) .....	44
Figure 12 : Représentation schématique d'une émulsion H/E, stabilisée par du Tween 80 dont la concentration varie et avec présence d'acide caprylique (d'après Kadri et al., 2017) .....	47
Figure 13 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases et ses paramètres caractéristiques.....	49
Figure 14 : Exemple d'ajustement du modèle de Luong (1985) (A) et du modèle de Lambert & Pearson (2000) (B) et signification des paramètres estimés.....	54
Figure 15 : Experimental growth rates of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 at pH 6.0 (circle) and pH 5.5 (triangle) as a function of undissociated (A), dissociated (B) and total (C) acid concentration for acetic acid (1) and lauric acid (2).....	82
Figure 16 : Experimental growth rates of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 at pH 6.0 (black circle) and pH 5.5 (grey triangle) as a function of undissociated acetic, lactic, propionic, phenyllactic, and caprylic acids (A,B,C,D,E) or total lauric acid and monolaurin (F,G).....	86

Figure 17 : Estimated MIC as a function of alpha (Luong model, A) or as a function of NIC (Lambert & Pearson model, B) for the undissociated (grey) or total (black) form of acids. ... 88

Figure 18 : Flow cytometry dot plots of a control oil-in-water emulsion previously inoculated with dead and viable cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4. Populations with a permeable membrane appeared in quadrant A and intact membrane cells appeared in quadrant C, damaged double-stained cells appeared in quadrant B..... 108

Figure 19 : Theoretical modelling diagram of the impact of viability loss on BHA used for bacterial enumeration due to an exposure to O/W emulsion where growth occurs. The black dotted line represents the supposed kinetics in O/W emulsion (total cells, characterized by 4 parameters of the growth model). The red line is the probability density over time when the cells lose their ability to grow on BHA used for enumeration. The time  $t_{rec}$ , in green, corresponds to the time at which the proportion of inactivated cells can fully recover on BHA. This inactivation time is characterized by the maximum proportion of cells losing their ability to grow on BHA ( $P_{max}$ ), the mean time ( $t_{ina}$ ) and the dispersion within the population ( $\sigma$ ). The black continuous line represents the evolution of the population of viable cells ( $\log(\text{CFU/ml})$ ) enumerated on BHA in O/W emulsion. .... 110

Figure 20 : Experimental growth kinetics of *B. weihenstephanensis* KBAB4, monitored by enumeration on BHA during their exposure to oil-and-water emulsion (circle), and in nutrient broth (triangle) without acid (A) or in presence of acetic (B), lactic (C), caprylic (D) or lauric (E) acid at pH 6.0 (black) or pH 5.5 (grey). Symbols with error bars represent the data average value and respective standard deviation due to replicates. The red arrows point to the drop in cell concentration in optimal conditions (without acid)..... 114

Figure 21 : Intact membrane cell population evolutions of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in oil-in-water emulsion (A), quantified by flow cytometry (■) and enumerated on BHA (◆). (B) Proportion of intact (■), damaged (■), and permeable (■) membrane cells in oil-in-water emulsion between 5 and 10h of incubation at 30°C..... 116

Figure 22 : Recovery of *B. weihenstephanensis* KBAB4 during their incubation in oil-in-water emulsion at pH 6.0. Colonies were enumerated on BHA (black), BHA supplemented with catalase (light grey), BHA supplemented with thiourea (dark grey) and O/W emulsion agar medium (hatched grey). Error bars correspond to standard deviations between replicates. Asterisks represents a significant difference between the concentrations ( $\log(\text{CFU/ml})$ ) ( $p$  value = 0.05), NS means non-significant difference..... 118

Figure 23 : Monitoring the viable cells on BHA (circles) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 exposed to O/W emulsion at pH 6.0 (A) or pH 5.5 (B) with 5 different conditions. The evolution over time of the theoretical viable cell population on BHA is fitted with a black line and the simulated growth kinetics in O/W emulsion are represented with a dotted line. Symbols with error bars represent the data average value and respective standard deviation due to replicates. The parameters correspond to the parameters described in Figure 19. .... 120

Figure 24 : Cinétique de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4, inoculé à partir d'une suspension de spores traitée thermiquement, dans la phase aqueuse de l'émulsion (Bouillon nutritif) (ronds vides) et dans l'émulsion modèle H/E 50/50 (ronds gris) ajustés à pH 6,0. Les lignes noires correspondent à l'ajustement du modèle de Rosso sur les données expérimentales

et les temps de latence ( $\lambda$ ) et taux de croissance ( $\mu_{\max}$ ) estimés sont indiqués sur la figure en fonction des milieux. ....	133
Figure 25: Structure chimique du Tween 80 (A) et du Span 80 (B) (Li et al., 2021) .....	134
Figure 26: Echelle du Turbiscan Stability Index et sa signification en termes de niveaux de déstabilisations (gauche) (Turbiscan Lab User Guide) et exemple d'émulsions modèles avec les déstabilisations correspondantes (droite). Photos personnelles. ....	136
Figure 27 : Diamètres des gouttelettes (A) et distribution de la taille des gouttelettes (B) dans les émulsions en fonction de la formulation et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair), après 24 h à 30°C. Les lettres diffèrent les échantillons dont les moyennes sont significativement différentes ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ) .....	159
Figure 28 : Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les milieux aqueux en fonction de l'émulsifiant et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair). Les lettres diffèrent les milieux dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ) (BN = Bouillon Nutritif, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium). ....	162
Figure 29 : Cinétique de germination (A) et de croissance (B) de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 dans du bouillon nutritif (1), du bouillon nutritif supplémenté par du Tween 80 (2), du bouillon nutritif supplémenté par des caséinates (3), en absence d'acide inhibiteur (●), en présence de 0,075 mM d'acide caprylique (▲) et en présence d'acide lactique (■). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliquas et leur écart-type, les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles. ....	163
Figure 30 : Cinétique de germination (A) et de croissance (B) de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 dans les émulsions 20/80 avec hexadécane et Tween 80 (HEX_T80) (1), avec hexadécane et caséinates (HEX_CAS) (2), avec matière grasse laitière et caséinates (MGLA_CAS) (3), en absence d'acide inhibiteur (●), en présence de 0,075 mM d'acide caprylique (▲) et en présence d'acide lactique (■). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliquas et leur écart-type et les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles. ....	165
Figure 31 : Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les émulsions H/E 20/80 en fonction de la formulation et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair). Les lettres diffèrent les milieux dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ) (HEX = Hexadécane, MGLA = Matière Grasse Laitière, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium). ....	166
Figure 32: Cinétiques de croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 dans les matrices fromagères en fonction des conditions étudiées dans les émulsions H/E 20/80 (A), de la concentration en acide caprylique (B), de la concentration en acide lactique (C) et du mélange d'acide lactique et d'acide caprylique (D). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliquas et leur écart-type et les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles. ....	168

Figure 33: Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les matrices fromagères en fonction des acides ajoutés et de leur concentration (en mM) (SI = Sans inhibiteur, AC= Acide Caprylique, AL = Acide lactique). Les lettres diffèrent les conditions dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{\text{value}} = 0,05$ )..... 169

Figure 34 : Hypothèses de l'effet de la complexification de la formulation d'une matrice sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur les activités inhibitrices de l'acide caprylique et de l'acide lactique (BN = Bouillon Nutritif, CAS = caséinates de sodium, MGLA = Matière Grasse Laitière). La représentation schématique de la matrice fromagère est inspirée du schéma de Wilson et al., (2002)..... 179

Figure 35 : Taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 observés en bouillon nutritif (ronds noirs) et en matrice fromagère (carrés rouges) en fonction de la concentration en acide caprylique non dissociée (A) et de la concentration en acide lactique non dissociée (B) à pH 6,0. Les symboles représentent les données expérimentales, les lignes noires correspondent aux ajustements des modèles. Les données de la figure A ont été ajustées par le modèle de Lambert & Pearson (2000) et les données de la figure B par le modèle de Luong (1989)..... 196

## Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Les groupes phylogénétiques de <i>Bacillus cereus</i> avec leur température de croissance et les toxines produites (Guinebretière et al., 2008).....	22
Table 2 : Physico-chemical characteristics of tested organic acids and monolaurin, and experimental conditions .....	78
Table 3 : Estimated parameters and their standard deviation of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 fitted with Luong and Lambert and Pearson models depending on the active concentration form of the acids. a RMSE is on a square root scale.....	85
Table 4 : Physicochemical properties of acetic, lactic, caprylic and lauric acid and their concentrations in the medium. ....	105
Table 5 : Growth parameters of <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 estimated in nutrient broth for each tested condition and their standard deviations. ....	113
Tableau 6 : Concentrations en acide acétique, lactique, propionique et en acides gras saturés dans du bouillon nutritif à 20 g/L.....	131
Tableau 7: Valeurs moyennes de TSI et leur écart-types des émulsions modèles ajustées à pH 6,0, après & jour (A) et 10 jours (B) de stockage à 30°C en fonction de la concentration en Tween 80 (lignes) et en Span 80 (colonnes) et du ratio volumique. Les couleurs correspondent au niveau de déstabilisation (Figure 26). ....	135
Tableau 8: Taux de croissance de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 en bouillon nutritif à pH 6,0 et 5,5 en fonction de la concentration en Tween 80 (% p/v).....	137
Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques et concentrations des acides étudiés dans les milieux .....	150
Tableau 10: Composition et procédé de fabrication des émulsions étudiées.....	151
Tableau 11: Conditions testées en acides inhibiteurs dans les matrices fromagères et volumes d'acide correspondants, d'acide chlorhydrique 1M ou d'hydroxyde de sodium (10 M) ajoutés. Les lignes grisées correspondent aux conditions identiques à celles des émulsions H/E 20/80. ....	154
Tableau 12 : TSI des émulsions après 24h et 4 j à 30°C, en fonction de la formulation .....	159
Tableau 13 : Paramètres de germination (A) et de croissance (B) de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 dans les milieux étudiés en fonction de l'absence d'acide, de l'ajout de 0,075 mM d'acide caprylique et de l'ajout de 250 mM d'acide lactique. Les valeurs sont les moyennes des estimations réalisées sur deux répliquas biologiques indépendants et leur écart-type (BN = Bouillon Nutritif, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium, HEX = Hexadécane, MGLA = Matière Grasse Laitière).....	160
Tableau 14 : Paramètres de germination de <i>B. weihenstephanensis</i> KBAB4 estimés dans les matrices fromagères en fonction des conditions testées.....	168

---

# **Chapitre 1 : Introduction générale**

---

Dans ce chapitre, une synthèse bibliographique sera réalisée sur le tryptique du projet de thèse : les bactéries sporulées, les composés inhibiteurs, et les matrices alimentaires. Ce chapitre vise ainsi à fournir une revue exhaustive de la littérature concernant le sujet de la thèse afin de faciliter la compréhension des chapitres suivants. Dans la première partie de ce chapitre, la diversité des souches du groupe *Bacillus cereus*, les risques qu'elles représentent pour l'industrie alimentaire ainsi que leur cycle de vie seront abordés. Ensuite, la deuxième partie présentera l'utilisation d'acides carboxyliques en tant que composés inhibiteurs. Leurs caractéristiques physico-chimiques seront définies et leurs activités antibactériennes expliquées sur la membrane de cellules végétatives et de spores. La troisième partie présentera les émulsions Huile dans Eau comme matrice alimentaire d'intérêt. Cette partie évoquera leur complexité structurelle et physico-chimique et les facteurs intrinsèques influençant le développement microbien et l'efficacité d'agents antibactériens. Enfin, la partie 4 introduira le concept de microbiologie prévisionnelle ainsi que les modèles utilisés pour caractériser la croissance microbienne et l'effet d'agents antibactériens. Pour finir, dans la dernière partie (Partie 5), le contexte du projet de thèse sera exposé et les objectifs détaillés.

## 1. Les bactéries sporulées du groupe *Bacillus cereus*

### 1.1. Diversité du groupe *Bacillus cereus*

Les espèces du groupe *Bacillus cereus*, aussi appelé *B. cereus sensu lato (sl)*, sont des bactéries gram-positives, productrices de spores et aéro-anaérobies facultatives, appartenant au genre *Bacillus* (Messelhäüßer & Ehling-Schulz, 2018). Ce sont des microorganismes ubiquitaires, qui sont des espèces endémiques du sol et qui occupent divers habitats écologiques, tels que les végétaux ou encore le tractus intestinal d'espèces à sang chaud (Stenfors Arnesen et al., 2008).

Le groupe « *B. cereus* » comprend plusieurs espèces génétiquement très proches, et s'est enrichi au cours du temps : *Bacillus cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. wiedmanii* and *B. toyonensis* et *B. cytotoxicus* (Guinebretière et al., 2013; Jiménez et al., 2013). La distinction entre les espèces du groupe *B. cereus* s'appuie sur les maladies provoquées ou sur des caractères phénotypiques particuliers : par exemple, *B. cereus* et *B. anthracis* sont reconnus comme agents pathogènes humains, en effet *B. anthracis* est l'agent responsable de la maladie du charbon (Mock and Fouet, 2001), *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* sont caractérisés par la formation de colonies rhizoïdales (Nakamura, 1998) et *B. thuringiensis* est différencié par sa capacité à former un cristal parasporal insecticide (Ehling-Schulz et al., 2019). Par ailleurs, Guinebretière et al., en 2008 ont classifié le groupe *B. cereus* en 7 groupes phylogénétiques selon leurs caractéristiques de croissance (Tableau 1), démontrant ainsi de claires différences dans la capacité de la bactérie à croître à haute ou à basse température (Carlin et al., 2010). On retrouve notamment le groupe VI composé d'espèces psychrotolérantes, dont *B. weihenstephanensis* capable de croître entre 4 et 7°C mais pas au-delà de 43°C (Lechner et al., 1998), tandis que *B. cytotoxicus* (groupe VII) est une souche thermotolérante et peut se développer jusqu'à 50°C (Guinebretière et al., 2013). Cependant, depuis plusieurs années, des études ont montré que bon nombre de ces caractéristiques phénotypiques utilisées pour l'attribution des espèces varient au sein même et entre les espèces (Stenfors Arnesen et al., 2008, Tallent et al., 2019). De plus, l'utilisation de techniques génétiques a permis un plus grand pouvoir discriminatoire et a joué un rôle déterminant dans la différenciation et la reclassification des membres de *B. cereus* (Carroll et al., 2022). Par exemple, Liu et al., en 2018 ont publié une étude visant à fusionner l'espèce *B. weihenstephanensis* au sein de l'espèce *B. mycoides*, suite à la comparaison de leur génome révélant de fortes similarités entre ces derniers.

Tableau 1 : Les groupes phylogénétiques de *Bacillus cereus* avec leur température de croissance et les toxines produites (Guinebretière et al., 2008)

Groupe phylogénétique	Espèces	Gamme de température de croissance (°C)	Thermotype	Production de toxines
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	10-40	Mésophile	Entérotoxines Hbl, Nhe
II	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	7-40	Psychrotolérant	Entérotoxines Hbl, Nhe, CytK
III	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i>	15-45	Mésophile	Entérotoxines Hbl, Nhe, CytK Céréulide
IV	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	10-45	Mésophile	Entérotoxines Hbl, Nhe, CytK
V	<i>B. cereus</i> <i>B. thuringiensis</i>	8-40	Intermédiaire	Entérotoxines Hbl, Nhe, CytK
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> <i>B. thuringiensis</i>	5-37	Psychrotolérant	Entérotoxines Hbl, Nhe
VII	<i>B. cytotoxicus</i>	20-50	Thermotolérant	Entérotoxine CytK

## 1.2. *Bacillus cereus*, un challenge pour l'industrie alimentaire

### 1.2.1. Agent de toxi-infections alimentaires

Selon l'agence nationale de Santé Publique Française, *B. cereus* est un germe pathogène reconnu pour causer des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Il s'agit, avec d'autres agents producteurs de toxines (*Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*), du deuxième agent bactérien suspecté en 2021 après *Salmonella*, incriminant 21% des agents confirmés (soit 665 malades) et 34% des agents suspectés (soit 1956 malades) (Santé publique France, 2023).

Le germe pathogène *B. cereus* est responsable de deux types de syndromes : i) un syndrome émétique causé par l'ingestion d'une toxine thermorésistante, le céréulide, préformée dans l'aliment au cours de la croissance de certaines souches de *B. cereus* (intoxication) et ii) le syndrome diarrhéique, causé par la multiplication de la bactérie dans l'intestin de l'hôte et permettant la sécrétion d'entérotoxines (Nhe, CytK, Hbl) après ingestion de cellules végétatives ou de spores en quantité suffisante (toxi-infection) (Jovanovic et al., 2021). La dose minimale infectante de la bactérie retrouvée dans les aliments à l'origine de TIAC est généralement égale à  $10^5$  UFC.g<sup>-1</sup> (ANSES, 2021). Le risque d'intoxication à *B. cereus* pour le consommateur est lié à l'exposition des aliments à des températures inappropriées, notamment lorsqu'ils ne sont

pas cuits ou refroidis de manière adéquates lors de leur préparation et avant consommation, permettant ainsi la croissance de la bactérie (ANSES, 2021). Certaines souches du groupe *B. cereus* *sl* sont également responsables d'altération des aliments, affectant la qualité organoleptique des produits de par la production d'enzymes, d'acides organiques ou d'autres composés indésirables (Arslan et al., 2014; Postollec et al., 2012).

### 1.2.2. Moyens de maîtrise

Son abondance dans les sols, sa capacité d'adhésion, sa capacité à former des biofilms mais surtout sa capacité à former des spores résistantes font de *B. cereus* *sl* un agent pathogène redoutable (Setlow, 2014b). Sous forme de spores, *B. cereus* peut contaminer un grand nombre de matières premières et survivre à différents stades des procédés de fabrication pour se retrouver dans les produits finis (Carlin & Nguyen-The, 2013; Stecchini et al., 2013). On les retrouve notamment dans les végétaux, les produits secs et déshydratés comme les épices, les céréales et farines, le riz ou bien les produits laitiers (European Food Safety Authority, 2016; Mathot et al., 2021). Les industries alimentaires emploient donc activement des stratégies pour assurer une inactivation adéquate des spores au sein des produits et ainsi contrôler leur croissance (Wells-Bennik et al., 2016).

Les traitements d'inactivation appliqués aux aliments en cours de transformation sont en général des traitements thermiques permettant d'inactiver les cellules végétatives ainsi qu'une partie des toxines (pasteurisation, cuisson). La pasteurisation consiste à soumettre le produit à une température comprise entre 85°C et 100°C pendant une durée déterminée, et est susceptible de détruire les cellules végétatives bactériennes (DGCCRF, 2021). Par exemple, 10 minutes à 80°C suffisent pour inactiver les cellules végétatives de *B. cereus* (Cronin & Wilkinson, 2008). Cependant, bien que la pasteurisation inactive la majorité des toxines bactériennes, dont les toxines diarrhéiques produites par *Bacillus spp*, elle n'est pas suffisante pour inactiver les toxines émétiques (European Food Safety Authority, 2016). Ainsi, des traitements thermiques plus élevés tels que la stérilisation ou les traitements UHT (Ultra-Haute-Température), ayant lieu à des températures supérieures à 100°C et allant au-delà de 135°C, sont nécessaires pour garantir une complète inactivation des spores et de la toxine émétique dans les produits alimentaires. Par exemple, un traitement thermique de 3 min à 121,1 °C inactive les spores de *B. cereus* alors que la stabilité du céréulide reste intact après un traitement thermique de plus de 2h à 121°C (European Food Safety Authority, 2016; Rajkovic et al., 2008). Les propriétés de thermorésistance des spores dépendent de différents facteurs : de la phylogénie de la souche

et ses caractéristiques de croissance, des conditions de sporulation et des conditions de traitement. Les souches émétiques sont en moyenne plus résistantes à la chaleur que les autres souches du groupe *B. cereus* *sl* (Carlin et al., 2006) et il existe une corrélation négative entre les propriétés de thermorésistance et la température minimale de croissance des souches du groupe *B. cereus* *sl* (Afchain et al., 2008). Les conditions de sporulation peuvent également moduler la thermorésistance des spores (Garcia et al., 2010). Une diminution des propriétés de résistance est observée pour des spores produites à basse température, ou à pH acide (Baril et al., 2011; Baril et al., 2012; Planchon et al., 2011). La présence de sels, sucres ou d'acides dans le milieu de traitement peut également avoir un effet protecteur sur les propriétés de résistances des spores comme par exemple la présence de saccharose, glycérol et glucose dans le milieu de traitement. Une diminution de l'activité de l'eau du milieu, via la présence de ces ingrédients, augmente ainsi la thermorésistance des spores (Coroller et al., 2001). A l'inverse, cette thermorésistance peut être réduite par la présence de la forme non dissociée d'un acide dans le milieu de traitement (Leguerinel & Mafart, 2001).

De plus, l'application d'un traitement thermique peut moduler le potentiel des spores survivantes à germer et à se développer dans les matrices alimentaires (Augustin, 2011; Wells-Bennik et al., 2016). Des études ont montré que l'application d'un traitement thermique doux (légère augmentation de la température) entraîne l'activation de la population de spores, tandis que l'application d'un traitement thermique sévère endommage les spores et perturbe leur efficacité de germination (Eijlander et al., 2011). En effet, l'application d'un traitement thermique diminue de manière significative le pourcentage de germination de spores par rapport à des spores non traitées, cependant le processus de reprise de croissance semble plus affecté par les conditions du milieu (Augustin, 2011). Pour cela, des moyens de maîtrise sont mis en place pour limiter le développement de bactéries sporulées au sein de l'aliment tels que des facteurs intrinsèques (activité de l'eau, pH, conservateurs...) et/ou des facteurs extrinsèques (température de stockage, atmosphère modifiée...) (Couvert et al., 2019; Samapundo et al., 2014; Smelt et al., 2008; Warda et al., 2015). La Figure 1 présente succinctement l'origine des spores bactériennes et leurs moyens de maîtrise rencontrés au cours de la transformation/conservation des aliments, en lien avec les étapes du cycle de vie de *B. cereus*.

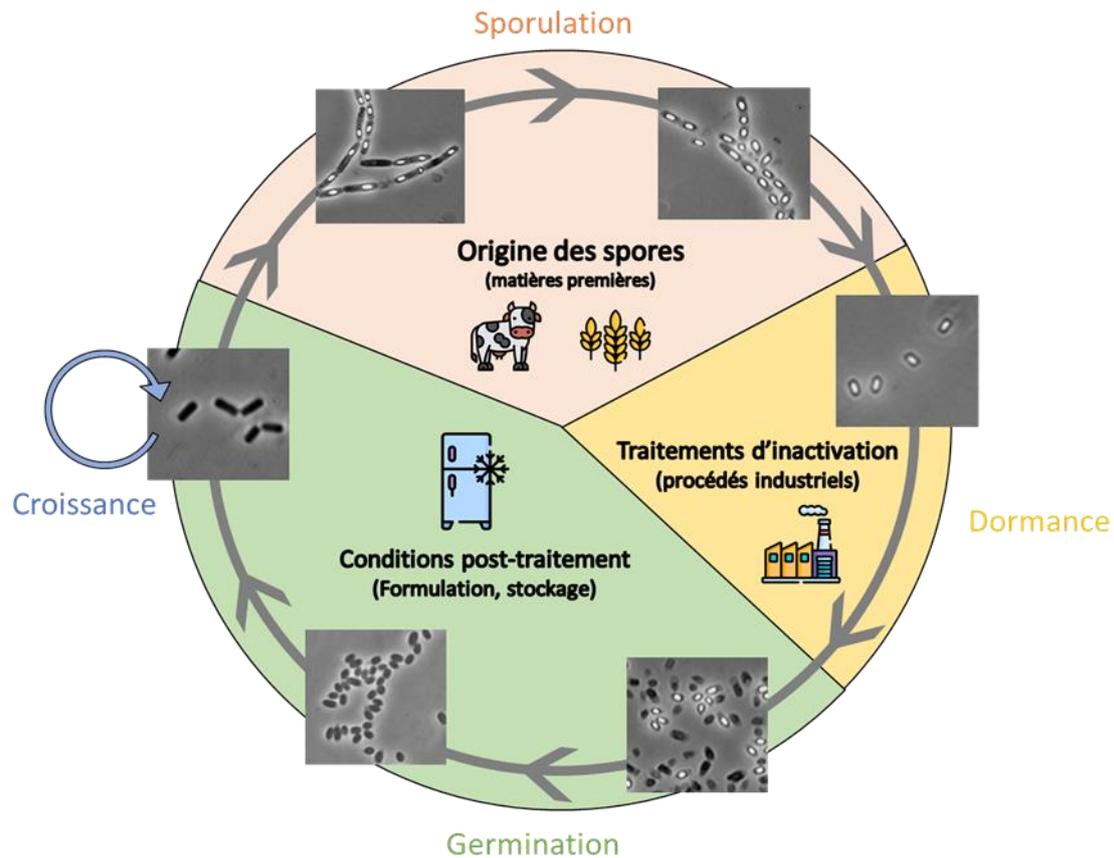


Figure 1 : Occurrence (orange) et moyens de maîtrise (jaune et vert) de la contamination des aliments par des spores bactériennes au cours de leur transformation et en lien avec le cycle de vie des bactéries sporulées (d'après Trunet, 2016).

### 1.3. Cycle de vie des bactéries sporulées

La particularité des bactéries du groupe *B. cereus* est leur capacité à produire des spores, une structure cellulaire particulière qui leur permettent de résister à de nombreux stress et ainsi de survivre dans un environnement non favorable à leur croissance.

#### 1.3.1. Le mécanisme de sporulation

Le processus de sporulation est une série d'étapes morphologiques coûteuses en énergie qui mène à l'obtention d'une spore dormante à partir d'une cellule végétative bactérienne. En général, la sporulation est induite par des signaux environnementaux concomitants : une forte densité cellulaire, une carence nutritive et une communication cellulaire, le « quorum sensing » (Higgins & Dworkin, 2012; Piggot & Hilbert, 2004). Le processus de sporulation du groupe *B. cereus* est illustré dans la figure 2.

La sporulation commence par une **division asymétrique** polaire de la cellule générant deux compartiments inégaux : la pré-spore et la cellule mère (Errington, 2003). Chacun de ces deux compartiments, séparés par le septum, possède une copie du génome. Cette étape est déclenchée par l'activation du régulateur de transition Spo0A par phosphorylation, en fin de phase exponentielle (Piggot & Hilbert, 2004). A partir de là, une expression génétique complexe et régulée se met en place dans les deux compartiments cellulaires afin d'assurer la formation, la maturation et la libération de l'endospore (Eijlander et al., 2014; Mckenney et al., 2013). La cellule mère **endocyte** ensuite la pré-spore, donnant ainsi lieu à une endospore et assemble autour de cette dernière une couche de peptidoglycane modifiée appelée cortex et une couche protéique appelée manteau. Une fois l'**engloutissement** initié, la sporulation est rendue irréversible (Higgins & Dworkin, 2012). Ensuite, la **maturation de la spore** a lieu grâce à l'accumulation d'acide dipicolinique (DPA) associé aux cations bivalents de calcium ( $Ca^{2+}$ ) au niveau du cœur de l'endospore (Errington, 2003; Higgins & Dworkin, 2012). Après maturation, la cellule mère **se lyse** et permet la **libération de la spore dormante** dans l'environnement (Errington, 2003; Higgins & Dworkin, 2012). Une fois libérée, la forme sporale représente un avantage considérable pour l'organisme car elle assure la survie de la bactérie dans l'environnement et la possibilité de contaminer des aliments ou des équipements de transformation alimentaire.

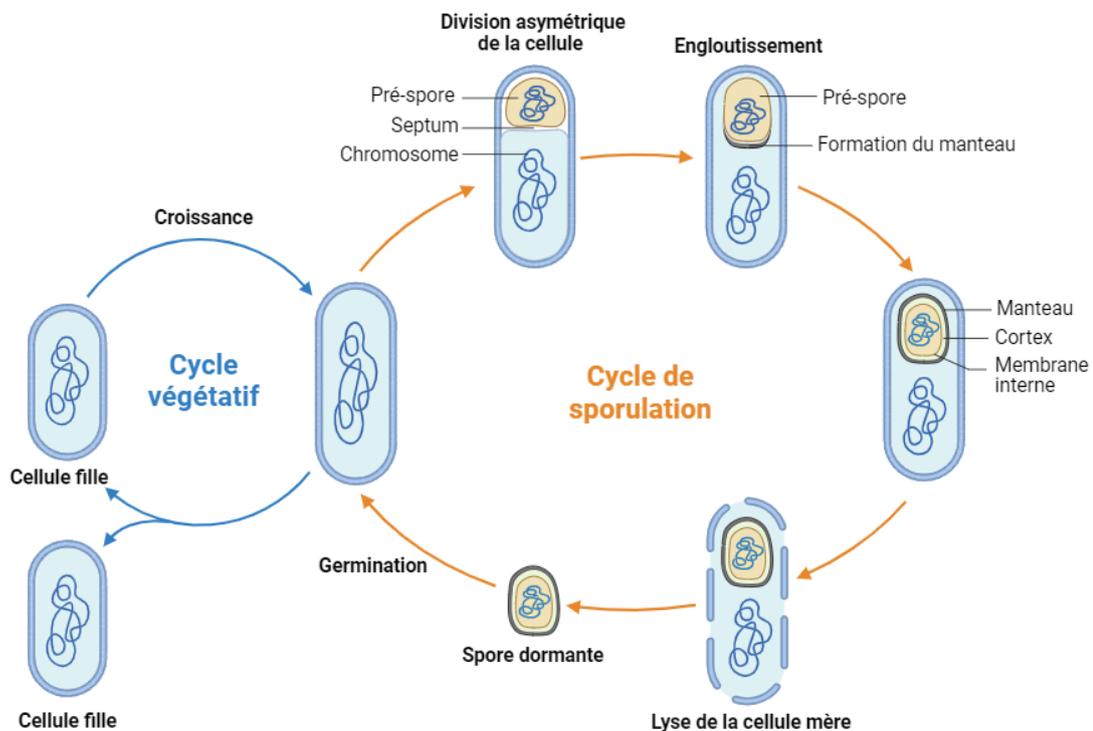


Figure 2 : Schéma simplifié des étapes du cycle de sporulation d'une bactérie sporulée du groupe *B. cereus sensu lato* (d'après Mckenney et al., 2013)

### 1.3.2. La structure de la spore

La spore bactérienne est une cellule métaboliquement inactive, caractérisée par sa faible teneur en eau (25 à 50% de la masse totale) (Cowan et al., 2003). Sa structure complexe, mise en place lors de la sporulation, lui confère des propriétés uniques de résistance et de dormance. Les conditions dans lesquelles la spore s'est formée (composition du milieu, température, pH) influencent ses propriétés structurales (Melly et al., 2002; Zhou et al., 2017). La structure d'une spore de *B. cereus* est composée d'un exosporium, d'un manteau, d'une membrane externe, d'un cortex, d'une membrane interne et du cœur (Figure 3).

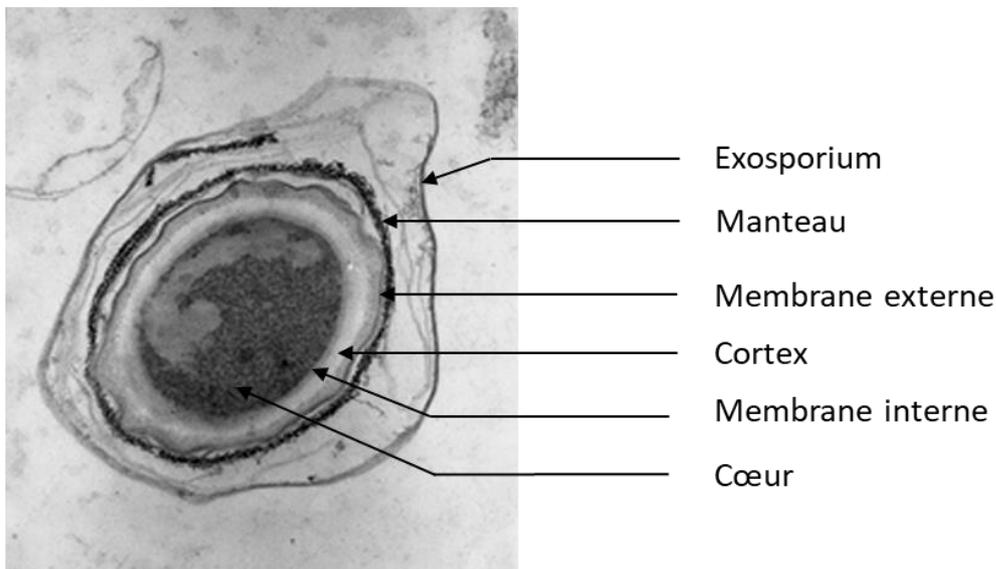


Figure 3 : Observation microscopique d'une spore de *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 au microscope électronique à transmission (x35000) avec ses différentes structures. Photographie : I. Bornard, E. Baril, INRA Avignon, 2009.

L'**exosporium** est la couche externe de la spore. La taille et la présence de l'exosporium peut varier en fonction de l'espèce bactérienne, ce dernier est présent chez le groupe *B. cereus* (Todd et al., 2003).

Le **manteau** (ou tuniques) est composé de plusieurs couches multiprotéiques. Les protéines qui constituent le manteau sont principalement des protéines de structure, telles que CotD ou CotE chez *B. cereus* et représentent 30% des protéines totales de la spore (Henriques & Moran, 2007). Elles agissent comme une barrière perméable, limitant l'accès aux grosses molécules, telles que des enzymes, aux potentielles cibles de la partie intérieure de la spore (Peter Setlow, 2014b). Le manteau protège donc la spore de traitements physiques et chimiques (Nicholson et al., 2000).

Le manteau est séparé du cortex par la **membrane externe**, qui semble moins importante dans la résistance de la spore aux traitements thermiques, chimiques ou encore aux radiations (Leggett et al., 2012).

Entre la membrane externe et la membrane interne, se situe le **cortex**. Ce dernier est composé principalement de peptidoglycane et participe activement à l'imperméabilité de la spore et donc au maintien de sa thermorésistance (Atrih & Foster, 2001).

La **membrane interne** est la dernière couche avant le cœur de la spore. Elle contient des lipides, certains récepteurs germinatifs ainsi que des protéines canaux qui lui confèrent un rôle important pour le maintien de la dormance et lors de la germination de la spore (Cowan et al., 2004).

Enfin, le **cœur** de la spore, situé au centre de la spore, possède le matériel génétique et métabolique (ADN, ARN, ribosomes, enzymes) de la cellule. Le cœur contient une grande quantité de la molécule caractéristique de la spore, la pyridine-2,6-dicarboxylique acide (DPA) associé à des cations divalents  $\text{Ca}^{2+}$  (CaDPA) (Peter Setlow, 2014b). La déshydratation du cœur, via l'accumulation de cette molécule, et sa structure cristalline très ordonnée sont des facteurs responsables de la robustesse de la spore et permet la protection du matériel génétique nécessaire à l'activité métabolique lors de la reprise de croissance (Dittmann et al., 2015; Nicholson et al., 2000).

### 1.3.3. *Le mécanisme de germination et de reprise de croissance*

Lorsque les conditions sont de nouveau favorables dans l'environnement, les spores dormantes germent et redeviennent des cellules végétatives. Le mécanisme de germination et de reprise de croissance joue un rôle important car il est préliminaire à la formation des cellules végétatives capables de se multiplier et de coloniser les aliments. La figure 4 résume les principales étapes du processus de germination et de reprise de croissance des spores d'espèces de *Bacillus spp.*

La germination est généralement induite par la présence de nutriments, tels que des acides aminés ou des sucres, dans l'environnement (Peter Setlow, 2003). Ces nutriments se lient de manière spécifique aux récepteurs de la membrane interne, les récepteurs des germinants (GRs). Cette étape est appelée **engagement** (Figure 4) et est associée à la libération de cations monovalents ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ) (Setlow, 2014a). De façon concomitante, le CaDPA présent dans le cœur des spores est relâché, via les canaux protéiques SpoVA, et est remplacé par de l'eau. Il s'agit de la **première étape** de germination, pendant laquelle le cœur est partiellement hydraté

(Christie & Setlow, 2020). Le cortex entourant la spore est ensuite hydrolysé par deux enzymes (*cortex-lytic enzymes* CLEs) au cours de la **deuxième étape** de germination, ce qui permet au cœur de la spore de s'étendre rapidement et d'absorber une plus grande quantité d'eau (80% de la masse totale du noyau) similaire à celle des cellules végétatives. Cette augmentation de la teneur en eau permet le rétablissement des activités métaboliques et la synthèse de macromolécules, entraînant ainsi l'émergence d'une cellule végétative (**Etape 3**) et la **reprise de croissance** (Figure 4) (Christie & Setlow, 2020). Les conditions dans lesquelles se trouvent les spores (température, pH, etc) lors de leur germination, impactent fortement leur capacité à retrouver une activité métabolique, d'autant plus après un stress thermique (Trunet et al., 2020).

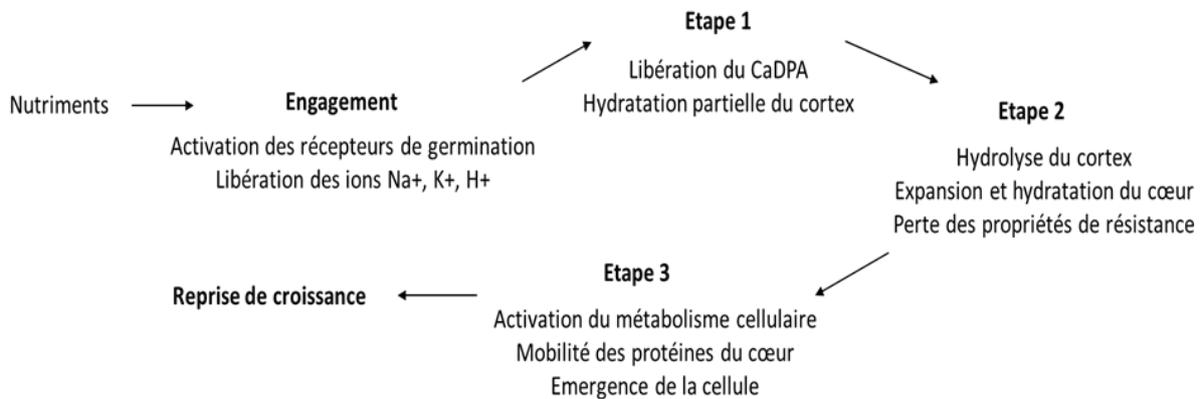


Figure 4 : Evènements majeurs du processus de germination des spores de *Bacillus spp* (d'après Setlow, 2014a; et Setlow et al., 2017)

En plus des nutriments, il existe des traitements non physiologiques qui peuvent induire la germination des spores, tels que l'exposition à de fortes concentrations en CaDPA, à de hautes pressions ou aux alkylamines ou autres surfactants (Moir, 2006). Par exemple, l'exposition à 600 MPa ou à la dodécylamine entraîne la libération du CaDPA de la spore sans avoir enclenché la fonction récepteur-germinant (Setlow, 2003). Par ailleurs, la germination des spores peut être activée par traitement thermique, ce dernier entraînerait un changement de conformation réversible des récepteurs des germinants présents dans les spores, ce qui les rendrait plus réceptifs et accessibles aux nutriments (Zhang et al., 2009).

La germination des spores à l'échelle individuelle au sein d'une population est hétérogène (Stringer et al., 2011). Le temps de germination et de latence précédant la première division cellulaire est propre à chaque spore. Une petite fraction de spores dans une population peut présenter de longues périodes de latence entre l'exposition aux germinants et la germination finale ou bien ne pas répondre aux déclencheurs de germination. On parle dans ce cas-là de spores super dormantes (Setlow, 2013). L'hétérogénéité de germination serait un exemple de

couverture, qui garantit que toutes les spores d'une population ne germent pas simultanément, réduisant ainsi le risque pour l'ensemble de la population si l'environnement change brutalement (Grimbergen et al., 2015; Veening et al., 2008). Cette hétérogénéité, définie par des variations de temps de latence, peut s'expliquer par différents facteurs : la composition de la spore, le passé de la spore ou l'impact des conditions environnementales de la spore lors de sa germination et reprise de croissance (Eijlander et al., 2011). Les spores super dormantes ont une résistance plus élevée à la chaleur qui résulte d'une teneur en eau réduite dans le noyau (Ghosh & Setlow, 2009). De plus, le nombre de récepteurs de germinants présents dans la spore joue un rôle important : une diminution du nombre de récepteurs entraîne une augmentation du temps de germination des spores (Setlow, 2013). Ces différences pourraient résulter de l'hétérogénéité de l'expression des gènes et des protéines lors de la sporulation, engendrant des différences phénotypiques, ce qui affecterait le comportement individuel des spores lors de la germination et de la reprise de croissance (Smelt et al., 2008). Enfin, les conditions environnementales lors de la germination sont également responsables des variations du temps de germination. Une température de germination supérieure ou inférieure à la température optimale prolonge le temps de germination, tandis qu'une activation thermique ou l'augmentation des concentrations en germinants dans le milieu diminue les valeurs de temps de latence (Setlow, 2013).

## 2. Les composés inhibiteurs, les acides en particulier

Les acides organiques sont utilisés depuis de nombreuses années comme agent antimicrobien, pour maîtriser les risques de contamination dans les aliments. La sélection d'un agent antimicrobien est dépendante de plusieurs facteurs, décrits ci-dessous : des propriétés physico-chimiques de l'antimicrobien (partie 2.1), de son spectre d'activité antibactérienne (partie 2.2) et des propriétés physiques et de la composition de l'aliment (partie 3) (Davidson et al., 2021).

### 2.1. Structure et caractéristiques physico-chimiques d'un acide

#### 2.1.1. La structure chimique d'un acide carboxylique

En chimie organique, un acide carboxylique est une molécule possédant un groupe carboxyle (R-COOH) (Figure 5). Le groupe carboxyle est un groupement fonctionnel composé d'un atome de carbone lié à un atome d'oxygène par une double liaison et à un groupe hydroxyle (OH) par une simple liaison.

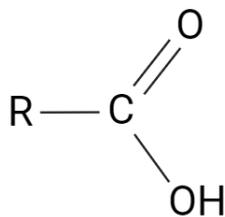


Figure 5 : Structure chimique d'un acide mono-carboxylique

Le radical de l'acide peut être un simple hydrogène (acide méthanoïque) ou un groupe organique composé d'une chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique. Cette chaîne carbonée se distingue par sa longueur, c'est-à-dire le nombre d'atomes de carbone qui la constitue. On retrouve, en effet, les acides à courtes chaîne carbonée, avec un nombre de carbone inférieur à 8 (i.e. l'acide acétique, propionique, butyrique, etc.) et les acides à longue chaîne carbonée possédant un nombre d'atome de carbone strictement supérieur à 8 (i.e. l'acide caprique, laurique, stéarique, etc.). De plus, cette chaîne carbonée peut posséder une ou plusieurs insaturations (i.e. l'acide oléique, linoléique, etc.) et d'autres groupements fonctionnels peuvent être retrouvés sur cette chaîne carbonée, tels que le groupe hydroxyle (i.e. l'acide lactique), le groupe amine (i.e. les acides aminés tel que la glycine), ou bien des groupements halogènes tels que le chlore, le brome, l'iode et le fluor.

### 2.1.2. La constante de dissociation $pK_a$

Un acide est défini comme un composé chimique capable de céder ou donner un ou plusieurs protons (l'ion hydrogène  $H^+$ ) lorsqu'il se trouve en solution aqueuse. La forme conjuguée d'un acide carboxylique est l'ion carboxylate ( $R-COO^-$ ). La réaction de dissociation d'un acide dans l'eau peut s'écrire :  $RCOOH + H_2O \rightleftharpoons RCOO^- + H_3O^+$ . Elle s'écrit plus généralement de manière simplifiée par :  $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$  avec  $AH$  l'acide protoné, capable de se dissocier pour donner sa forme conjuguée  $A^-$  et un ion hydrogène  $H^+$ . Cette réaction de dissociation est caractérisée comme toute réaction chimique par une constante d'équilibre, il s'agit de la constante de dissociation  $K_a$ , ou constante d'acidité. Cette constante d'équilibre est définie par l'équation suivante (Alongi & Shields, 2010) (équation 1):

$$K_a = \frac{[A^-] \times [H^+]}{[AH]} \quad (1)$$

Avec  $K_a$  la constante d'acidité,  $[A^-]$  la concentration (mol/L) de la forme conjuguée ou dissociée de l'acide,  $[H^+]$  la concentration (mol/L) en ions hydrogène dans l'eau, et  $[AH]$  la concentration (mol/L) en acide non-dissocié.

A partir de cette équation, transformée à l'échelle logarithmique, on définit le  $pK_a$  tel que (équation 2) :

$$pK_a = -\log(K_a) \quad (2)$$

Le  $pK_a$  d'un acide révèle sa tendance à libérer un proton et est souvent utilisé pour caractériser la force d'un acide en solution. Plus le  $pK_a$  est bas, plus l'acide est fort c'est-à-dire qu'il a une plus forte capacité à libérer des protons. Par ailleurs, la dissociation d'un acide en milieu aqueux ne dépend pas seulement du  $pK_a$  mais également du pH de l'environnement. La relation entre le pH de la solution et le  $pK_a$  de l'acide en solution est décrite par l'équation de Henderson-Hasselbach (équation 3) :

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (3)$$

Avec  $pK_a$  la constante de dissociation de l'acide définie précédemment,  $[A^-]$  la concentration (mol/L) de la forme conjuguée ou dissociée de l'acide et  $[AH]$  la concentration (mol/L) en acide non-dissocié.

Cette équation montre que si le pH de la solution est inférieur au  $pK_a$  de l'acide, la forme non-dissociée de l'acide prédomine tandis que si le pH est supérieur au  $pK_a$  de l'acide, la forme dissociée est majoritaire. Cette relation est essentielle pour comprendre le comportement d'un acide en solution aqueuse, en lien avec son activité antimicrobienne.

### 2.1.3. Le coefficient de partition Log P

Un acide, comme toute molécule, est caractérisée par son caractère hydrophile ou lipophile. Ce caractère est défini par la valeur du log P aussi appelé « coefficient de partition octanol-eau ». Ce coefficient est défini comme le rapport à l'équilibre de la concentration d'un composé chimique dans deux solvants non miscibles, un solvant organique l'octanol, et un solvant aqueux, l'eau (Kujawski et al., 2012). Il s'écrit comme suit (équation 4) :

$$\log P = \log \left( \frac{C_{\text{octanol}}}{C_{\text{eau}}} \right) \quad (4)$$

Avec  $C_{\text{octanol}}$  la concentration du composé dans l'octanol et  $C_{\text{eau}}$  la concentration du composé dans l'eau. Ainsi, un log P positif et élevé indique que la molécule est plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, définissant son caractère lipophile. A contrario, un log P négatif signifie que la molécule est plus soluble dans l'eau, indiquant son caractère hydrophile.

La valeur du coefficient de partition est liée à la taille et à la polarité de la molécule (Abraham, 2004). En effet, une augmentation de la taille moléculaire d'un composé augmente son hydrophobicité, tandis qu'une polarisation de la molécule diminue son hydrophobicité. Par ailleurs, dans le cas des molécules ionisables, le coefficient de partage varie également en fonction du pH de la solution (Disdier et al., 2022). La forme ionisée (ou dissociée) du composé est fortement soluble dans l'eau, donc l'équilibre entre les solvants octanol-eau ne s'établit qu'avec la forme non-dissociée du composé. Or, la proportion de forme non-dissociée dépend du pH de la solution et du pKa de la molécule. En prenant en compte le pH et le pKa du composé, le coefficient de partition devient le coefficient de distribution log D et est relié au log P par l'équation suivante (équation 5) (Kah & Brown, 2008; Köhler et al., 2023) :

$$\log D = \log P - \log \left[ 1 + 10^{(pKa-pH)} \right] \quad (5)$$

La différence entre le log P et le log D varie donc en fonction des composés. Ainsi, lorsque le caractère lipophile (log P) d'une molécule est connue, il est possible de calculer la variation de sa lipophilie en fonction du pH.

Le coefficient de partition octanol-eau est donc indispensable pour évaluer le comportement d'un agent antimicrobien dans un aliment, en particulier sa distribution entre les différentes phases et donc sa disponibilité envers les microorganismes pathogènes indésirables.

### 2.1.4. Caractéristiques physico-chimiques des acides gras en particulier

Parmi les acides carboxyliques à chaîne aliphatique, on retrouve les acides gras. Les acides gras sont caractérisés par leur structure amphiphile (Figure 6A) composée d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe, saturée ou insaturée, et d'un groupement acide carboxylique hydrophile, leur conférant ainsi des propriétés tensio-actives (Ontiveros et al., 2018). Ils sont donc par définition des molécules avec une faible solubilité dans l'eau (Fameau et al., 2014). Lorsqu'ils sont ajoutés à des solutions aqueuses, leur chaîne carbonée hydrophobe repousse les molécules d'eau provoquant l'autoassemblage des acides gras. Les queues hydrophobes des acides gras se regroupent et forment une sphère, appelée micelle (Figure 6B).

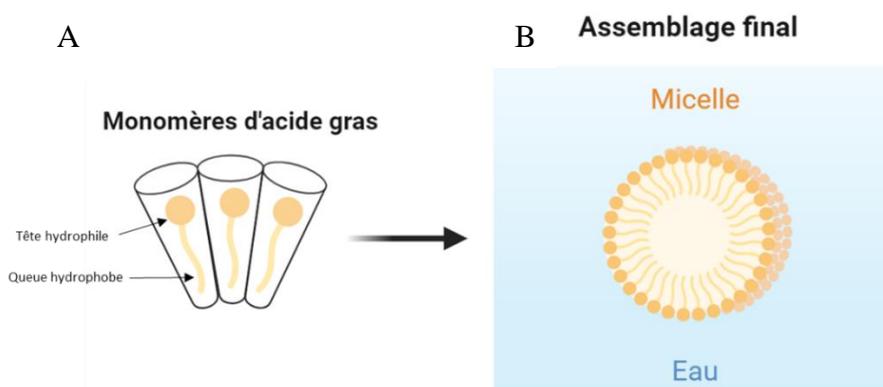


Figure 6: Schéma d'un monomère d'acide gras (A) et d'une micelle (B)

La solubilité d'un acide gras dans l'eau est déterminée par sa structure chimique : les acides gras à courte chaîne ( $C < 8$ ) sont légèrement solubles dans l'eau, tandis que les acides gras à moyenne ou longue chaîne ( $C > 8$ ) ne se dissolvent pas dans l'eau (Arnould, 2015). De plus, la formation de structure auto-assemblées ou micelles par les acides gras est également modulée par la température et le pH du milieu (Fameau et al., 2014) ainsi que leur concentration. En effet, la solubilité des acides gras augmente avec l'augmentation de la température dans le milieu (Khuwijtjaru et al., 2002) et il existe une température minimale à partir de laquelle un acide gras devient soluble dans l'eau, il s'agit de la température de Krafft. Par ailleurs, lorsqu'un acide gras ou tensioactifs est dispersé dans l'eau, ce dernier sous forme de monomère se place à l'interface eau-air, avec sa tête hydrophile orienté vers l'eau et sa queue hydrophobe orientée vers l'air (Rosen, 1989). Cependant, en augmentant progressivement la concentration en tensio-actifs en solution, l'interface devient saturée d'acides gras ce qui entraîne une diminution de la tension de surface. Les acides gras s'assemblent alors spontanément sous la forme de micelle. La concentration à laquelle ce phénomène apparait est appelée Concentration Micellaire Critique (CMC).

## 2.2. L'activité antibactérienne des acides sur les bactéries sporulées

L'action antimicrobienne des acides est reconnue sur un grand nombre de bactéries pathogènes et d'altération, en agissant à la fois sur la croissance bactérienne mais également sur la germination et reprise de croissance des spores.

### 2.2.1. Mécanismes d'action des acides sur les cellules végétatives

#### ○ Cas des acides forts et des acides faibles

Les mécanismes d'action des acides carboxyliques sur la croissance microbienne et plus précisément sur la membrane des cellules végétatives sont plus ou moins bien compris. Premièrement, les acides forts et les acides faibles n'ont pas la même activité antibactérienne. Grâce à leurs propriétés dépendantes du pH, les acides faibles sont capables d'interagir et de diffuser à travers la membrane plasmique bactérienne. La forme non dissociée de l'acide présente dans le milieu peut traverser la membrane plasmique et atteindre le cytoplasme. Les protons du groupe carboxylique vont se dissocier en raison du pH neutre du cytoplasme et provoquer une acidification du pH intracellulaire (Stratford & Eklund, 2003). Cette diminution du pH intracellulaire affecte les voies métaboliques de la cellule et entraîne une forte consommation d'ATP de la part de la bactérie pour maîtriser l'efflux de protons, ce qui provoque la mort cellulaire (Lambert & Stratford, 1999a). Les propriétés antimicrobiennes d'un acide faible sont donc favorisées par une proportion en acide non-dissocié élevée, cette dernière dépendant du pH extracellulaire et du pKa de l'acide. C'est pourquoi, lorsqu'un acide fort est ajouté à un milieu de culture, sa dissociation instantanée et complète ne permet pas à l'acide de diffuser à travers la membrane plasmique et n'a donc aucun effet antimicrobien excepté la diminution du pH extracellulaire.

La forme non-dissociée des acides organiques joue donc un rôle primordial dans leur activité antimicrobienne, peu d'acides organiques présentent une activité antimicrobienne via leur forme dissociée, sauf l'acide sorbique et l'acide benzoïque (Eklund, 1983, 1985). L'activité inhibitrice de croissance de la forme dissociée de l'acide sorbique serait la conséquence de plusieurs mécanismes potentiels: i) l'altération d'évènements critiques intervenant dans la formation de l'enveloppe cellulaire et la division cellulaire, ii) l'inhibition des systèmes de transports de substrats à travers la membrane et l'inhibition partielle du système de transport des électrons, iii) l'inhibition des enzymes clés nécessaires à l'activité métabolique de la cellule et iv) la création d'un flux de protons dans la cellule, qui augmenteraient les besoins en énergie de la cellule pour maintenir un pH intracellulaire neutre (Sofos et al., 1986).

○ Cas des acides gras

On retrouve parmi les acides carboxyliques, des acides à plus forte hydrophobicité, les acides gras. L'activité antibactérienne et les mécanismes d'action des acides gras sur la membrane sont étroitement reliés à leur structure chimique amphiphile (Casillas-Vargas et al., 2021). Dans un premier temps, la présence d'un groupement carboxylique en fin de chaîne aliphatique leur permet d'être capable de donner ou d'accepter des protons hydrogènes. En fonction du pH du milieu et du pKa, les acides gras peuvent donc agir de la même manière que les acides faibles en traversant la membrane plasmique sous leur forme non-dissociée jusqu'à atteindre le cytoplasme et ainsi altérer les fonctions métaboliques, comme décrit précédemment. Les acides gras ont donc une plus grande activité antimicrobienne à pH faible car leur forme protonée est prédominante (Wang & Johnson, 1992).

Dans un second temps, les effets néfastes des acides gras sur les membranes bactériennes ont plutôt été attribués à leurs propriétés tensioactives. Cette structure amphiphile leur permet d'interagir avec la membrane cellulaire et de créer principalement des pores transitoires ou permanents de taille variable (Desbois & Smith, 2010). En effet, les acides gras peuvent augmenter la perméabilité de la membrane cytoplasmique via leur incorporation dans les phospholipides membranaires (Yoon et al., 2018). Cette augmentation de la perméabilité membranaire entraîne une fuite du contenu cellulaire tel que l'ARN, les acides aminés, les protéines et une lyse de la membrane entraînant la mort cellulaire (Desbois & Smith, 2010). En interagissant avec la membrane, les acides gras peuvent également interférer avec le transport d'électrons dans la chaîne respiratoire ce qui diminue la consommation d'oxygène, mais aussi perturbe la phosphorylation oxydative en diminuant la force protomotrice. Le découplage de la phosphorylation oxydative va ainsi aboutir à une baisse de production d'ATP ce qui va devenir létal pour la bactérie concernée. De plus, les acides gras vont également agir sur la membrane en inhibant l'activité des enzymes bactériennes nécessaires à l'activité métabolique de la cellule (Yoon et al., 2018) ainsi que d'autres protéines membranaires, réduisant l'assimilation des nutriments (Desbois & Smith, 2010). La figure 7 résume les principaux mécanismes d'action des acides gras sur la membrane bactérienne.

Un autre paramètre intervenant dans la structure chimique influence l'activité inhibitrice des acides gras, il s'agit de la présence d'insaturation sur la chaîne carbonée : les acides gras insaturés ont une meilleure activité inhibitrice que les acides gras saturés pour le même nombre de carbone (Kabara et al., 1972). Zheng et al., (2005) ont constaté une différence dans

l'inhibition de la biosynthèse des acides gras de la cellule, mettant en évidence l'inhibition sélective de l'enzyme FabI par les acides gras insaturés, qui n'a pas été observée pour les acides gras saturés. L'inhibition ciblée de la synthèse des acides gras par les acides gras insaturés souligne un mécanisme d'action différentielle de ces acides sur la croissance bactérienne.

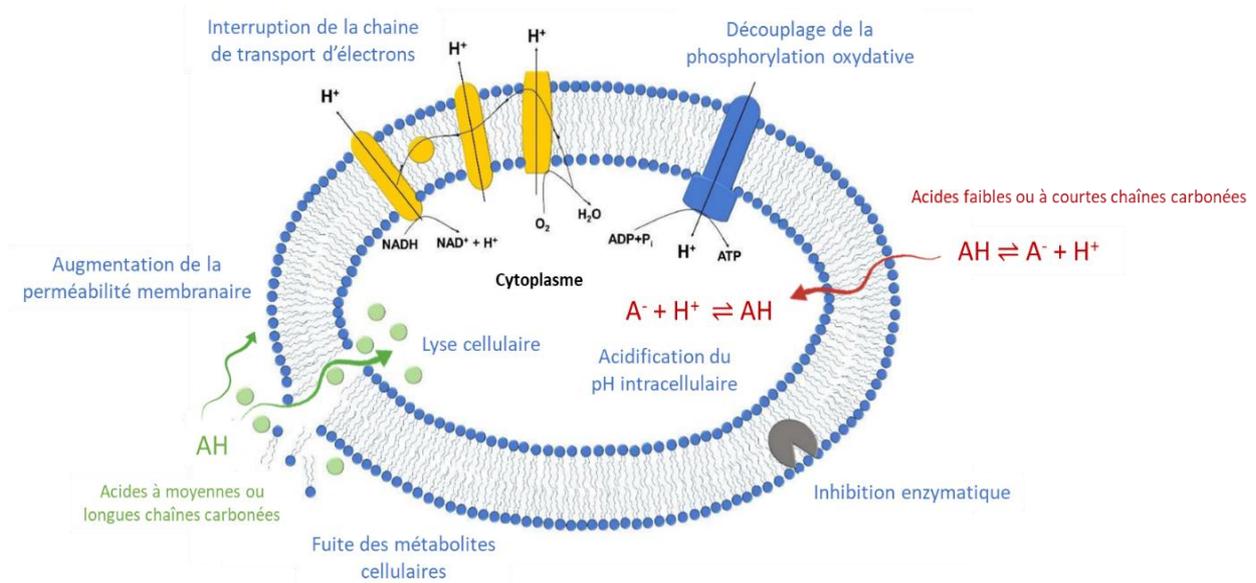


Figure 7: Principaux mécanismes ciblés des acides organiques sur les cellules végétaives bactériennes (modifié de Yoon et al., 2018)

### 2.2.2. Mécanismes d'action des acides sur les spores

Les spores dormantes sont métaboliquement inertes et très résistantes aux traitements antimicrobiens généralement létaux pour les cellules végétaives (Brul & Coote, 1999). Quand la germination est déclenchée, les spores libèrent des protons, ce qui augmente leur pH intracellulaire, et absorbent de l'eau, ce qui permet la mise en place de leur métabolisme cellulaire. Ces processus sont des moments d'action privilégiés des acides organiques pour inhiber la reprise de croissance des spores. De plus, les changements dans la perméabilité de la membrane survenant lors du déclenchement de la germination pourraient être des sites potentiels d'action des inhibiteurs sur les spores.

L'inactivation de spores d'espèce de *Bacillus* par des acides forts, tel que l'acide chlorhydrique, est reliée directement à une déstructuration importante de la membrane interne ainsi que des structures plus externes comme le manteau ou le cortex, ce qui entraîneraient la rupture et la mort de la spore (Setlow et al., 2002).

Cependant, lorsqu'il s'agit d'acides faibles ou d'acides gras d'autres mécanismes d'inhibition sur les spores ont été mis en avant. L'efficacité inhibitrice d'acides organiques sur

la germination des spores serait due à leur caractère lipophile (van Melis et al., 2012). Ce caractère peut être influencé par leur acidité ou capacité de dissociation ainsi que par leur caractère hydrophobe ( $\log P$ ), ce dernier devenant la contribution la plus importante à mesure que la longueur de chaîne de l'acide augmente. En effet, les propriétés inhibitrices de germination d'acides faibles à courte chaîne serait plus importante à pH acide, comme pour les cellules végétatives, lorsque leur concentration en forme indissociée augmente. Cependant, l'activité inhibitrice d'acides à moyenne chaîne de carbone augmenterait avec le nombre de carbone présents sur la chaîne carbonée (van Melis et al., 2012). Les propriétés lipophiles des acides impacteraient leur capacité à s'accumuler dans la membrane interne de la spore et plusieurs hypothèses sont énoncées concernant leur mécanisme d'inhibition sur ces spores :

- 1) L'accumulation de composés inhibiteurs dans la membrane interne entraînerait sa perméabilité et sa désintégration, ce qui impacterait la reprise de croissance et la viabilité de la spore (Ababouch et al., 1992).
- 2) Les acides accumulés dans la membrane interne seraient capables de se lier aux récepteurs de la germination, interférant ainsi avec les signaux de la germination (van Beilen & Brul, 2013; van Melis et al., 2011).
- 3) L'accumulation de composés étrangers dans la membrane interne ajusterait le volume de la membrane et influencerait les interactions protéines-protéines sans affecter l'intégrité de la membrane (Griepernau & Böckmann, 2008). En effet, les protéines essentielles pour la germination induite par les nutriments sont regroupées à proximité de ce qu'on appelle des « germinosomes », constitués d'amas protéiques dépendant de ces protéines contributrices. La saturation de la membrane par des inhibiteurs empêcherait les interactions protéines-germinosomes (Griffiths et al., 2011).

Par ailleurs, le mécanisme inhibiteur des acides sur la germination des spores peut aussi avoir lieu après l'activation de la spore, lorsqu'elle est en état de transition, c'est-à-dire lorsqu'elle met en place les processus clés qui mènent à l'obtention d'une cellule végétative. Lors de cette étape, l'action de protéines ou enzymes spécifiques intervenants dans le processus de germination peut être inhibée. Par exemple, les acides sont capables d'inactiver les enzymes responsables de l'hydrolyse du cortex (CLEs), stoppant ainsi la progression de la germination (Setlow et al., 2002). Par la suite, la reprise de croissance des spores peut être inhibée en interrompant des réactions vitales telles que le découplage du métabolisme énergétique ou de la phosphorylation oxydative, comme chez les cellules végétatives (Ababouch et al., 1994).

### 3. La matrice alimentaire : cas des émulsions huile dans eau

#### 3.1. Généralités sur les émulsions alimentaires

Une grande variété d'aliments, qu'ils soient transformés ou d'origine naturelle, sont des émulsions. On retrouve par exemple le lait, la crème, le beurre, la mayonnaise, les sauces salades. Les émulsions alimentaires sont des structures complexes possédant de nombreuses caractéristiques physico-chimiques qui sont le résultat des différents ingrédients qui les composent et de leur méthode de fabrication.

##### 3.1.1. Définition et caractéristiques d'une émulsion huile dans eau

Les émulsions sont des dispersions constituées de deux liquides non miscibles, généralement de l'huile dans l'eau (McClements, 2016), comme le montre la figure 8. Le liquide présent sous forme de fines gouttelettes est appelé phase dispersée ou discontinue tandis que le liquide environnant présent autour est appelé phase continue. Au sein des émulsions alimentaires, la taille des gouttelettes varie en général entre 100 nm et 100  $\mu\text{m}$  (McClements, 2016). Le processus qui mène à l'obtention d'une émulsion à partir de deux liquides non miscibles distincts est connue sous le nom d'homogénéisation. Dans l'industrie alimentaire, ce processus est généralement effectué à l'aide de méthodes coûteuses en énergie, qui utilisent des dispositifs mécaniques ou l'application de forces perturbatrices (Dickinson, 2009).

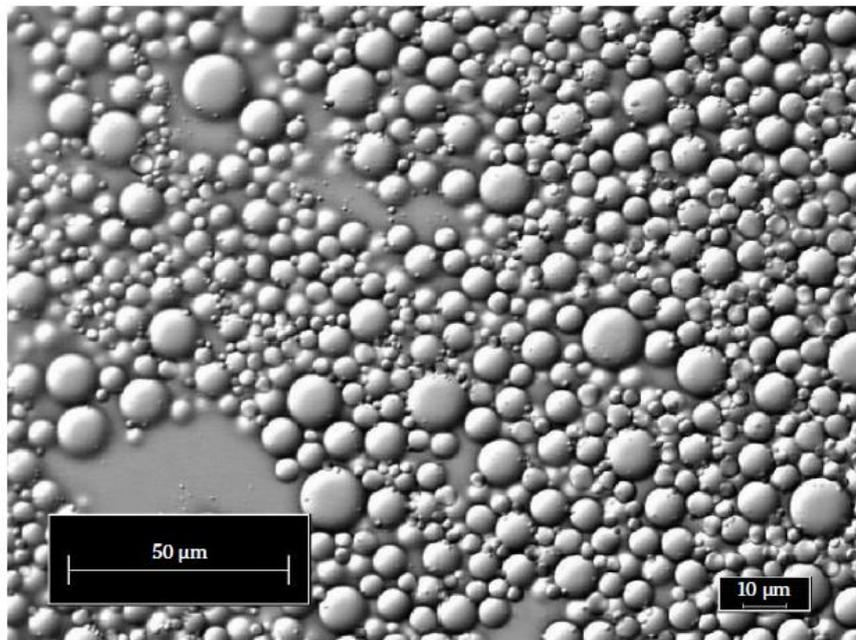


Figure 8 : Exemple d'une émulsion alimentaire Huile dans Eau (sauce salade) observée au microscope à l'aide d'un DIC (Differential Interference Contrast) (photographie issue de McClements, (2016)).

Les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables au cours du temps. Les deux phases peuvent rapidement se séparer pour former un système composé d'une couche de phase grasse, de faible densité, au-dessus d'une couche d'eau, à plus haute densité. Les phénomènes physiques responsables de l'instabilité des émulsions sont schématisés dans la Figure 9. Le **crémage** et la **sédimentation** sont deux formes de séparations gravitationnelles : le crémage correspond au mouvement ascendant des gouttelettes dû au fait qu'elles ont une densité inférieure à celle de la phase continue tandis que la sédimentation correspond au mouvement descendant des gouttelettes car leur densité est supérieure à celle de la phase continue. La **floculation** et la **coalescence** sont des phénomènes d'agrégation des gouttelettes. La floculation apparaît lorsque plusieurs gouttelettes se rassemblent pour former un agrégat, tandis que la coalescence a lieu lorsque les gouttelettes fusionnent entre elles pour former une gouttelette plus grande. Cette dernière peut mener à la séparation complète des phases. Il existe également le phénomène d'inversion des phases qui correspond au processus par lequel une émulsion H/E est convertie en une émulsion E/H ou inversement (McClements, 2016).

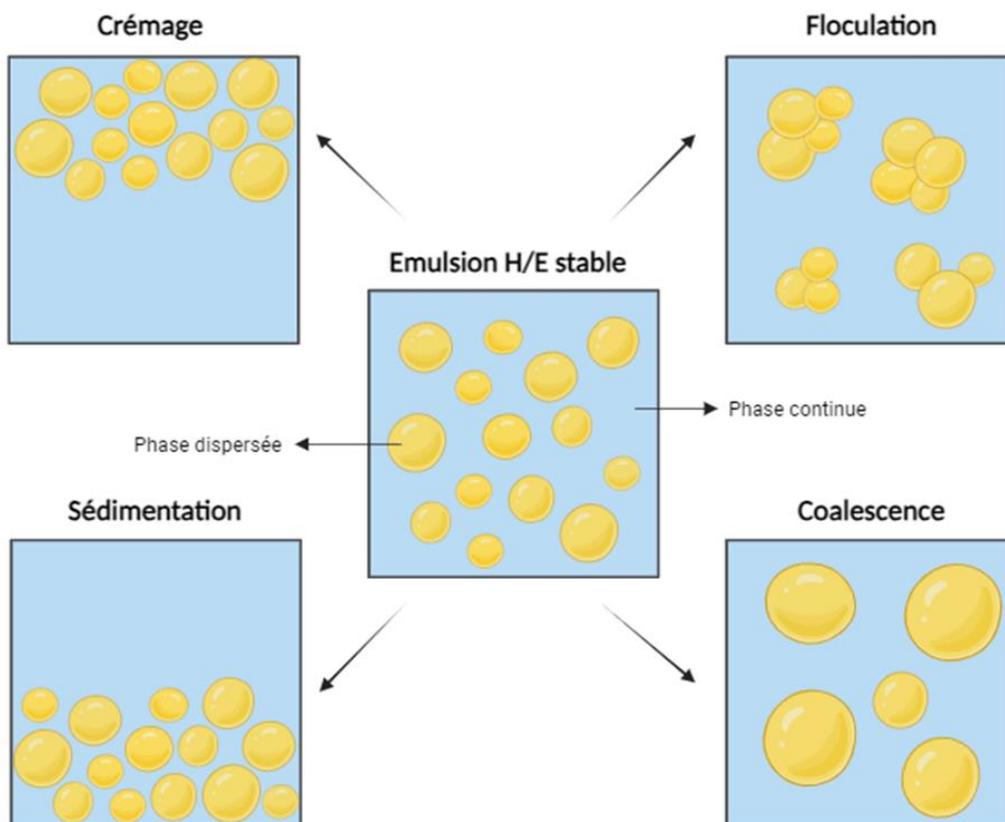


Figure 9: Les phénomènes de déstabilisation des émulsions H/E par des mécanismes physiques : crémage, sédimentation, floculation et coalescence.

### 3.1.2. Les voies de stabilisation

Il est possible de former des émulsions thermodynamiquement stables pendant une période de temps définie, grâce à l'utilisation de substances stabilisatrices. Ces substances stabilisatrices sont appelées « **émulsifiants** » et sont des molécules dites « tensioactives » constituées d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. Leurs propriétés amphiphiles leur permettent de s'adsorber à la surface des gouttelettes formées lors de l'homogénéisation, en formant une couche protectrice qui va ensuite permettre de diminuer la tension superficielle entre les deux phases et ainsi de stabiliser le système (Berton-Carabin et al., 2018). En effet, la présence d'émulsifiants à l'interface permet d'augmenter la force de répulsion entre les gouttelettes et ainsi limiter leur rapprochement. La capacité émulsifiante de ces molécules tensioactives est caractérisée par le HLB, balance hydrophile/lipophile, qui définit leur potentialité à stabiliser des émulsions Huile dans Eau ( $8 < \text{HLB} < 16$ ) ou Eau dans Huile ( $3 < \text{HLB} < 6$ ) (Kralova & Sjöblom, 2009).

Il existe deux catégories prédominantes d'émulsifiants utilisés pour la stabilisation d'émulsions alimentaires : les émulsifiants à faible poids moléculaire ou **surfactants** et les émulsifiants à haut poids moléculaire ou **biopolymères** (Kralova & Sjöblom, 2009). Dans la première catégorie, on retrouve les monoglycérides, les lécithines, les acides gras, les polysorbates ou Tweens, les Spans et autres phospholipides. Dans la deuxième catégorie d'émulsifiants, on retrouve principalement des protéines, telles que les protéines dérivées du lait et de l'œuf reconnues pour leur propriétés émulsifiantes et également quelques polysaccharides (Kralova & Sjöblom, 2009).

Par ailleurs, d'autres molécules peuvent être utilisés comme substances stabilisatrices dans les émulsions alimentaires, il s'agit des **agents de texture** (Dickinson, 2009). Ces derniers améliorent la stabilité des émulsions en réduisant le mouvement des gouttelettes. Parmi eux, on retrouve deux catégories caractérisées par leur différent mode de fonctionnement. Les **agents épaississants** augmentent la viscosité de la phase continue, tandis que les **agents gélifiants** forment un gel dans la phase continue de l'émulsion (Leal-Calderon et al., 2007). Les principaux agents de texture utilisés dans l'alimentaire sont des polysaccharides, tels que l'amidon et ses dérivés, les galactomannanes, les carraghénanes et agars, les pectines, la gomme de xanthane, etc. Ils peuvent également être de nature protéique telle que la gélatine (Stephen et al., 2006). Ces différentes substances stabilisatrices peuvent être utilisées seules ou en association au sein des émulsions (Berton-Carabin et al., 2018).

### 3.1.3. La complexité des émulsions alimentaires

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes, dont la composition et les propriétés varient en fonction de la région étudiée. Une émulsion huile dans eau est généralement caractérisée par trois régions distinctes avec des propriétés physico-chimiques différentes : la phase grasse ou dispersée, la phase continue ou aqueuse et l'interface (McClements, 2016). La **phase grasse** peut contenir un mélange de composants liposolubles tels que des triacylglycérols, des diacylglycérols, des monoacylglycérols, des acides gras libres, des vitamines, des agents de texture, etc. La **phase aqueuse** est constituée d'une variété de composants hydrosolubles, comme des sucres, des sels, des acides, des alcools, des émulsifiants, des protéines, des polysaccharides, etc. L'interface ou **région interfaciale** contient un mélange de divers composants tensioactifs (Figure 10). De plus, les composants hydrosolubles non adsorbés à l'interface se retrouvent dans la phase aqueuse, formant des assemblages qui peuvent interagir avec les autres constituants de la phase (Berton-Carabin & Schroën, 2019) (Figure 10). Le mouvement et la répartition des molécules entre ces régions impacte les propriétés physico-chimiques de l'émulsion et sa stabilité.

Par ailleurs, les propriétés physico-chimiques des émulsions sont aussi le résultat de leur procédé de fabrication. L'homogénéisation est un procédé énergétique qui entraîne la désintégration des gouttelettes d'huile et le mouvement rapides des molécules tensioactives à l'interface, impactant la distribution finale et la taille des gouttelettes en suspension (Dickinson, 2009). De plus, les émulsions alimentaires sont sensibles à des variations de température, de pression, d'agitation intervenant au cours de leur fabrication ou de leur stockage, ce qui peut influencer les interactions au sein du système et causer de changements significatifs dans l'ensemble de leurs propriétés physico-chimiques et leur stabilité au cours du temps (McClements, 2016).

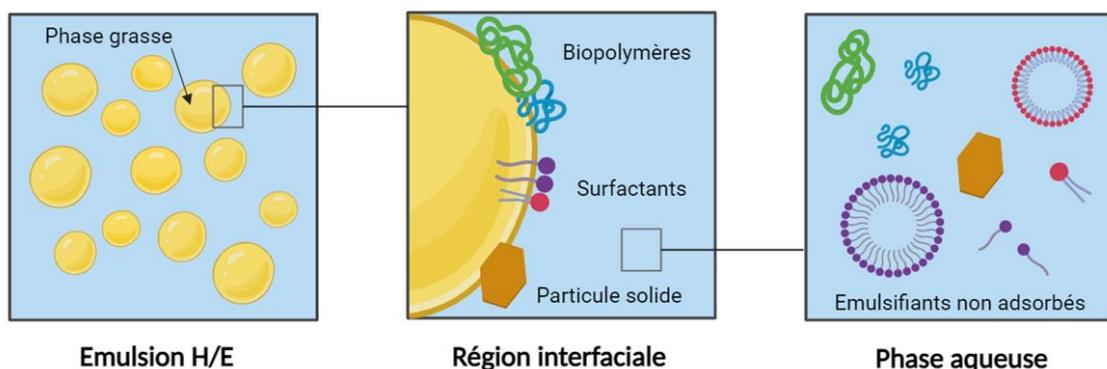


Figure 10 : Représentation schématique des principaux constituants d'une émulsion huile/eau en fonction de la région, d'après Berton-Carabin & Schroën, (2019). Le schéma n'est pas à l'échelle.

### **3.2. Facteurs intrinsèques à l'émulsion influençant le développement microbien**

La structure et la composition des matrices alimentaires ainsi que les conditions de stockage, sont des facteurs clés pour la maîtrise du risque microbien dans les aliments (Mertens et al., 2009). L'étude de l'influence de la structure et de la composition d'émulsions alimentaires sur le comportement et le développement bactérien est donc d'intérêt, notamment dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle, dans le but de garantir la sécurité sanitaire de ces matrices complexes.

#### *3.2.1. La structure*

Les paramètres de croissance microbienne sont modifiés dans des milieux alimentaires structurés, par rapport aux milieux de culture liquide dans lesquels la croissance microbienne est planctonique et homogène (Wilson et al., 2002). La présence d'éléments structurants (de type gélifiants ou épaississants) et/ou de plusieurs phases (gouttelettes d'huile) au sein de matrices alimentaires contraint la mobilité des microorganismes et entraîne un changement de mode de croissance (Robins & Wilson, 1994). La croissance bactérienne passe de l'état planctonique à l'état colonial (Figure 11). La structure du milieu agit alors comme un stress supplémentaire sur la croissance microbienne, immobilisant les cellules et entraînant une diminution du taux de croissance par rapport à la croissance en condition planctonique (Aspridou et al., 2014; Theys et al., 2008). Wilson et al. (2002) ont montré que les cellules de *B. cereus* immobilisées dans un gel de gélatine ont un taux de croissance réduit par rapport aux cellules cultivées en bouillon. L'immobilisation des cellules peut également entraîner une diminution de la population bactérienne maximale atteinte (Zalazar et al., 2016) ainsi qu'un changement des activités métaboliques (Wimpenny et al., 1995).

Par ailleurs, l'immobilisation des cellules et leur croissance à l'état colonial modifient les conditions locales de l'environnement de croissance de la bactérie via une modification de la composition en substrats autour de la colonie et une réduction du pH à l'intérieur de la colonie, qui entraînent l'apparition de gradients de pH dans le milieu (Brocklehurst et al., 1997; Malakar et al., 2002; Wimpenny et al., 1995). Cette baisse de pH peut stimuler la réponse aux stress des bactéries et réduire leur susceptibilité aux agents inhibiteurs de croissance ajoutés au milieu (Wilson et al., 2002). En effet, il est reconnu que les bactéries vivant en communauté ont une physiologie particulière qui leur confèrent une résistance accrue à certains désinfectants (Bridier et al., 2011). Les effets de la structure des aliments sur le développement bactérien sont

également reliés à la distribution et la répartition de l'eau et des composés chimiques dans la matrice (Wilson et al., 2002).

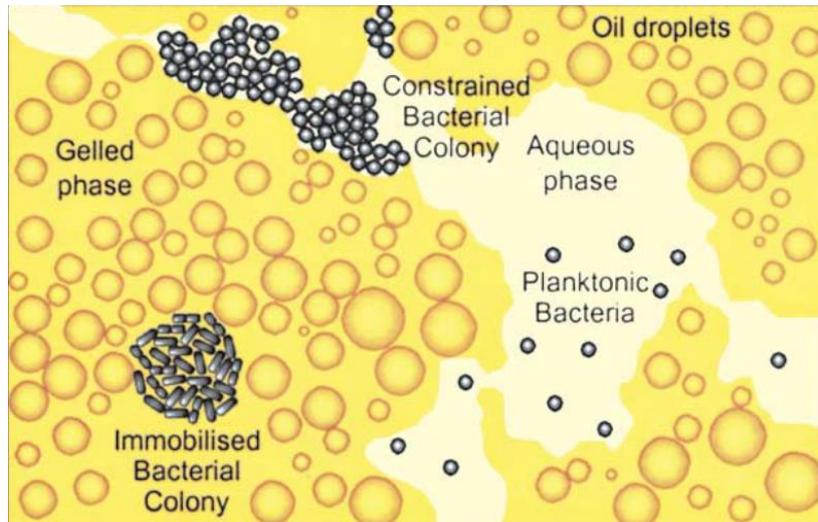


Figure 11 : Schéma représentant les différents environnements et modes de croissance microbiens dans un échantillon de fromage (issu de Wilson et al., (2002))

### 3.2.2. La composition chimique

Dans les émulsions H/E, la phase aqueuse est reconnue comme le lieu de croissance bactérienne (Wilson et al., 2002) et les caractéristiques chimiques de cette phase influencent le développement bactérien. Plusieurs facteurs intrinsèques sont déterminants pour la croissance microbienne et sont généralement utilisés comme facteurs de maîtrise dans l'alimentaire. Il s'agit du pH, de l' $a_w$  ou encore de la présence de composés hydrosolubles inhibiteurs. Le taux de croissance d'un microorganisme est dépendant du pH et de l' $a_w$  du milieu. La présence d'acides, de sels ou de sucres dans la phase aqueuse peut donc entraîner la modification des propriétés physico-chimiques de la phase et impacter ainsi la croissance des microorganismes.

Au sein de systèmes biphasiques, la présence d'une phase grasse influence également la croissance microbienne. Zalazar et al., (2016) ont démontré que la concentration en huile utilisée dans un système émulsionné modifie la croissance de *Zygosaccharomyces bailii* : un pourcentage d'huile plus élevé entraîne une diminution des paramètres de croissance de la levure. En effet, un fort pourcentage d'huile engendre des zones aqueuses non jointives piégeant les bactéries qui ne peuvent se développer que sous forme de colonies et diminuant le taux de croissance comme évoqué précédemment (Naïtali et al., 2017; Robins & Wilson, 1994). Ce phénomène a été observé dans des émulsions contenant un pourcentage de phase grasse supérieur à 80% (Brocklehurst et al., 1995; Parker et al., 1995).

La présence de zones aqueuse non jointives au sein de l'émulsion peut entraîner la formation de micro-environnements chimiques autour de la bactérie. Ces micro-environnements permettent à la bactérie d'interagir de façon privilégiée avec les différents composants de la matrice tels que les protéines, les lipides ou les émulsifiants présents autour d'elle (Figure 10) et ainsi affecter sa croissance (Robins & Wilson, 1994). Ces composants peuvent en effet être métabolisés par le micro-organisme, favorisant son développement, ou ils peuvent former des complexes avec des conservateurs diminuant leur disponibilité (Boons et al., 2015).

De plus, la présence d'huile dans les systèmes biphasiques au contact avec les bactéries modifie la physiologie bactérienne (Naïtali et al., 2009). Les cellules bactériennes portent à leur surface de nombreuses macromolécules (protéines, peptidoglycane, acide teichoïque, polysaccharides) qui sont capables d'interagir avec leur environnement (Ly et al., 2006). Les macromolécules en surface des cellules bactériennes modifient leur hydrophobicité, leur charge de surface, ce qui influence leur attachement aux surfaces et leur comportement aux interfaces (Seale et al., 2008). Ces modifications de propriétés de surface (hydrophobicité et charge) des bactéries sporulées induites par un système émulsionné impacteraient également leur tolérance aux désinfectants (Naïtali et al., 2009). En effet, les bactéries sont capables d'intégrer les acides gras exogènes à leur membrane et réguler leur fluidité membranaire pour s'adapter à des conditions de croissance défavorables (De Sarrau et al., 2012).

Enfin, la présence d'huile dans les systèmes biphasiques contribue également à la redistribution des composés chimiques entre les différentes phases de l'émulsion, pouvant modifier le développement microbien (Brocklehurst & Wilson, 2000; Robins & Wilson, 1994).

### **3.3. Influence des facteurs intrinsèques sur l'activité de composés inhibiteurs**

Un grand nombre d'agent antimicrobiens démontrent d'excellentes activités contre les bactéries pathogènes ou d'altération dans des milieux simples, mais ces derniers ne montrent pas la même efficacité lorsqu'ils sont utilisés dans des aliments complexes, on parle de « paradoxe antimicrobien » (Weiss et al., 2015). La complexité structurale des émulsions module l'activité antibactérienne des composés inhibiteurs. Cette complexité, définie par un large spectre de caractères physico-chimiques entraîne une multitude d'hypothèses sur son impact sur l'efficacité inhibitrice de croissance d'agents antibactériens.

### 3.3.1. Interactions avec la phase grasse

L'un des premiers facteurs impactant l'activité des acides inhibiteurs, dans la formulation des émulsions, est le ratio d'huile. Brocklehurst & Wilson (2000) ont observé que des acides gras inhibiteurs interagissent avec la phase huileuse entraînant une diminution de leur activité antibactérienne. Une augmentation du pourcentage d'huile dans les émulsions conduit à une diminution de la diffusion des acides aux propriétés lipophiles qui se retrouvent séquestrés dans la phase huileuse et ne peuvent être en contact avec les bactéries présentes dans la phase aqueuse (Léonard-Akkari et al., 2018). En effet, la présence et le pourcentage d'huile affecte la distribution de composés liposolubles mais également de composés hydrosolubles en augmentant les chemins de diffusion de ces derniers à travers le système, ce qui participe à réduire leur efficacité antimicrobienne (Weiss et al., 2015).

Dans un second temps, des théories indiquent que la taille des gouttelettes en émulsion modulerait l'action antibactérienne. Terjung et al., (2012) ont montré que l'activité inhibitrice de croissance de deux composés phénoliques (carvacrol et eugénol) augmentait dans des émulsions composées de tailles de gouttelettes plus importantes possédant le même ratio huile/eau (10/90) sur *Escherichia coli* et *Listeria innocua*. Deux hypothèses sont alors émises : i) l'augmentation de la surface interfaciale augmenterait la quantité de composé inhibiteur lipophile placé à cette interface et permettrait la mise en contact avec la membrane bactérienne, expliquant une plus forte efficacité antibactérienne, ou ii) la présence du surfactant en excès sous forme de micelles dans la phase aqueuse diminuerait en présence de petites gouttelettes d'huile, ce qui ne permettrait pas la solubilisation des composés phénoliques (Terjung et al., 2012). Cependant, Donsì et al., (2011) ont constaté que cette baisse d'efficacité antimicrobienne dans les émulsions à plus fines gouttelettes serait due aux contraintes mécaniques appliquées lors de la formation de l'émulsion, entraînant une dégradation des agents antimicrobiens. Pour Kadri et al. (2017), l'hypothèse d'une augmentation de l'efficacité antimicrobienne en fonction de la taille des gouttelettes dépendrait plutôt de l'agent antimicrobien et de la formulation des systèmes étudiés.

### 3.3.2. Interactions avec les émulsifiants (surfactants, protéines, polysaccharides)

Au sein d'une émulsion, les acides peuvent également interagir avec les émulsifiants, impactant ainsi leur activité inhibitrice. Par exemple, une augmentation des concentrations en Tween 80 dans les émulsions empêcherait le contact entre l'acide caprylique et la membrane bactérienne dû aux forces de répulsion exercées par le surfactant pour stabiliser l'émulsion, ce qui entraînerait une baisse d'efficacité inhibitrice (Kadri et al., 2017). Ces résultats sont représentés en image dans la figure 12.

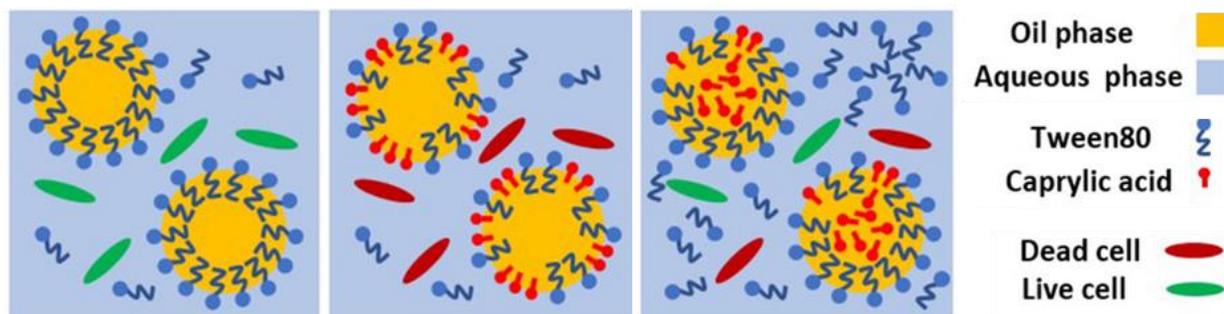


Figure 12 : Représentation schématique d'une émulsion H/E, stabilisée par du Tween 80 dont la concentration varie et avec présence d'acide caprylique (d'après Kadri et al., 2017)

De plus, la présence de fortes concentrations en protéines ou encore de polysaccharides a un impact négatif sur l'activité de composés inhibiteurs. Il a été suggéré que les groupes phénoliques de certains composés antibactériens seraient capables de se lier à la protéine, ou aux polysaccharides, ce qui réduirait la quantité de composé antimicrobien disponible pour l'inhibition de la croissance (Loeffler et al., 2014). Les protéines sont des molécules chargées positivement lorsque le pH de l'environnement est inférieur à leur point isoélectrique et négativement lorsque celui-ci est supérieur. Lorsqu'elles sont chargées négativement, les protéines sont fortement attirées par d'autres composés chargés positivement qui peuvent être des composés antimicrobiens, et forment des complexes solubles ou insolubles. Les antimicrobiens ne sont donc plus distribués de manière homogène dans l'aliment et les microorganismes présents à un endroit dépourvu de ces complexes ne sont donc pas affectés (Weiss et al., 2015). Par ailleurs, le pH joue un rôle dans l'efficacité inhibitrice des acides : un pH faible augmente leur efficacité inhibitrice (Parker et al., 1995), en raison de leur propriétés acide qui entraîne une proportion en forme dissociée plus importante.

En règle générale, plus la structure de l'aliment est complexe, plus il y a de composés interférents donc moins les agents antimicrobiens sont efficaces.

## 4. La microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle a pour but de prédire l'évolution des micro-organismes dans les aliments par des modèles mathématiques (Delhalle et al., 2012). Elle est généralement utilisée pour qualifier la croissance, la survie ou encore l'inactivation de populations microbiennes dans un environnement et permet ainsi de prévoir l'impact d'un procédé de fabrication ou bien de conditions de stockage sur le comportement de microorganismes d'altération ou pathogènes.

### 4.1. Evaluation de la croissance microbienne

#### 4.1.1. Description de la cinétique de croissance microbienne

La croissance microbienne correspond à la multiplication cellulaire des bactéries en conditions de croissance optimales. L'évolution de la population microbienne en fonction du temps est généralement représentée en échelle logarithmique et est distinguée par plusieurs phases de croissance (Figure 13) (Buchanan, 1918) :

- 1) La **phase de latence**, caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Il s'agit de la période d'adaptation de l'inoculum à son nouvel environnement. La durée de la phase de latence ( $\lambda$ ) varie en fonction de la taille de l'inoculum ( $N_0$ ), de l'état physiologique des cellules inoculées et du milieu de culture (Augustin et al., 2000; Pin & Baranyi, 2008; Zhou et al., 2011). Pour les bactéries sporulées, le temps de latence prend en compte le temps de germination des spores dans le milieu de culture.
- 2) L'**accélération** ou phase d'augmentation de la vitesse de croissance. Les bactéries commencent à se multiplier pour atteindre la vitesse maximale de croissance ( $\mu_{max}$ ), plus ou moins rapidement.
- 3) La **phase exponentielle**, pendant laquelle la vitesse de croissance des bactéries est maximale et constante ( $\mu_{max}$ ). Pour une espèce bactérienne donnée, la vitesse maximale de croissance, aussi appelée taux de croissance népérien, dépend des conditions du milieu de culture. Chez *B. cereus sensu lato*, la vitesse maximale de croissance est comprise entre 1,73 et 2,14 h<sup>-1</sup> en conditions optimales et en fonction de l'espèce étudiée (Le Marc et al., 2021).
- 4) Le **ralentissement** ou phase de diminution de la vitesse, qui devient progressivement nulle.

- 5) La **phase stationnaire**, caractérisée par un arrêt de la croissance et par l'atteinte de la concentration maximale bactérienne ( $N_{max}$ ). Les bactéries qui continuent à se multiplier compensent celles qui meurent.
- 6) La phase de décroissance ou de déclin.

Ainsi, les paramètres principaux pour caractériser les différentes phases de la croissance microbienne sont : la concentration bactérienne initiale ( $N_0$ ), le temps de latence ( $\lambda$ ), la vitesse maximale de croissance ( $\mu_{max}$ ) et la concentration bactérienne maximale ( $N_{max}$ ) (Figure 13). Par ailleurs, les courbes de croissance microbienne sont généralement obtenues par des techniques de dénombrements classiques qui visent à dénombrer des unités formant colonies (UFC) sur un milieu solide dans une boîte de Pétri ou bien par des mesures de la densité optique (DO) par spectrophotométrie dans un milieu liquide (Guillier et al., 2017).

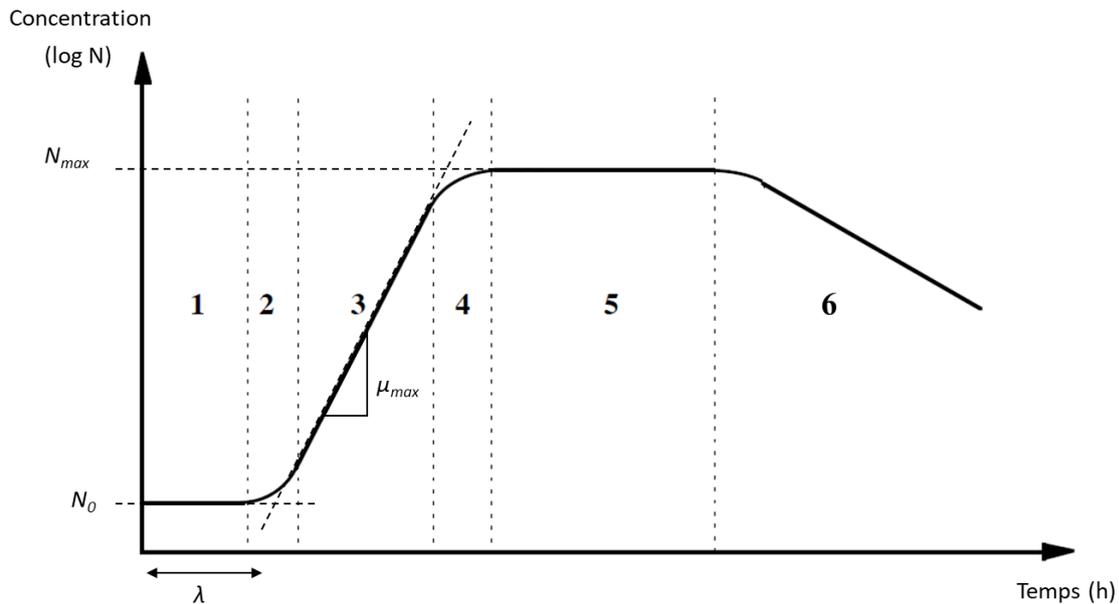


Figure 13 : Courbe de croissance d'une culture bactérienne avec ses différentes phases et ses paramètres caractéristiques

#### 4.1.2. Les modèles primaires décrivant la cinétique de croissance microbienne

Les modèles primaires permettent de décrire la cinétique de croissance des populations microbiennes dans un environnement donné. L'ajustement de ces modèles à des données expérimentales permettent la détermination des quatre paramètres de croissance définis précédemment ( $N_0$ ,  $\lambda$ ,  $\mu_{max}$ ,  $N_{max}$ ). Les cinétiques décrites par les modèles primaires ont des équations de la forme (équation 6):

$$\ln N(t) = f(t, \theta_1) + \varepsilon_t \quad (6)$$

Avec  $N(t)$  la concentration bactérienne à l'instant  $t$ ,

$f$  la fonction de régression,  $\theta_1$  le vecteur des paramètres primaires ( $N_0$ ,  $\lambda$ ,  $\mu_{max}$ ,  $N_{max}$ ),

$\varepsilon_t$  l'erreur ou résidu associé à l'observation.

Les ajustements sont réalisés sur le logarithme de la concentration cellulaire, obtenue par dénombrement (UFC/ml) ou bien sur le logarithme des mesures de DO, car cela permet de stabiliser la variance des résidus (Dalgaard et al., 1994).

Les modèles primaires les plus utilisés sont des modèles dits « déterministes » et sont : les modèles de Gompertz (Zwietering et al., 1990), les modèles de Baranyi (Baranyi et al., 1993; Baranyi & Roberts, 1994) et les modèles logistiques avec délai et rupture (Kono, 1968; Rosso et al., 1995). Rosso et al. (1995) ont montré que le modèle logistique avec délai et rupture était suffisant pour décrire les cinétiques de croissance obtenues par les méthodes classiques de dénombrement. Ce modèle suppose qu'il n'y a pas de croissance lors de la phase de latence et que la transition entre la phase de latence et la phase exponentielle, correspondant à la phase d'accélération, n'existe pas. Il présente donc l'avantage de n'être composé que des quatre paramètres de croissance définis précédemment et possédant tous une signification biologique (Couvert et al., 2006).

Le modèle de Rosso et al. (1995), est défini par l'équation suivante (équation 7) :

$$\ln(N_t) = \begin{cases} \ln(N_0), & t < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0}\right) * e^{-\mu_{max} * (t-\lambda)}}\right), & t \geq \lambda \end{cases} \quad (7)$$

Avec  $N_t$  la concentration bactérienne au temps  $t$ ,

$N_0$  la concentration bactérienne initiale,

$\lambda$  le temps de latence,

$\mu_{max}$  la vitesse maximale de croissance,

$N_{max}$  la concentration bactérienne maximale.

4.1.3. *Les modèles secondaires décrivant l'effet de facteurs environnementaux sur la croissance microbienne*

La croissance microbienne dans les aliments est influencée par de nombreux facteurs environnementaux. Il peut s'agir de i) **facteurs intrinsèques**, liés au produit dans lequel le microorganisme se trouve, tels que le pH, l'activité de l'eau ( $a_w$ ), la composition du produit (présence de composés antimicrobiens) ; ii) de **facteurs technologiques**, qui consistent aux traitements généralement appliqués aux aliments pour inactiver la flore microbienne, tels que la chaleur, des radiations UV, des hautes pressions, etc ; iii) de **facteurs extrinsèques**, appliqués lors de la conservation de l'aliment (température de stockage, atmosphère modifiée...) ; iv) enfin, de **facteurs microbiens**, c'est-à-dire les interactions pouvant exister entre les différentes espèces de microorganisme présentes dans le produit. De plus, des interactions peuvent également exister entre les différents facteurs cités (Augustin, 2005).

En microbiologie prévisionnelle, les modèles secondaires permettent de décrire l'effet des facteurs environnementaux sur les paramètres de croissance des modèles primaires, et notamment sur l'évolution du taux de croissance  $\mu_{max}$  et du temps de latence  $\lambda$  (Delhalle et al., 2012). Zwietering et al. (1992) ont introduit une approche qui consiste à évaluer l'impact de chaque facteur environnemental de façon indépendante sur le taux de croissance microbien, il s'agit de la méthode du « concept gamma ». L'équation s'écrit de la façon suivante (équation 8) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \prod \gamma_X(X_i) + \varepsilon_i \quad (8)$$

Avec  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximal observé aux conditions  $X_i$ ,

$\mu_{opt}$  le taux de croissance maximal observé aux conditions optimales pour chaque facteur  $X_i$ ,

$\gamma_X$  la fonction reflétant l'effet du facteur environnemental  $X$ ,

$\varepsilon_i$  les résidus associés à l'observation.

Les ajustements des modèles secondaires sont réalisés sur la racine carrée du taux de croissance afin de stabiliser la variance des individus (Zwietering et al., 1990). Dans cette approche progressive, l'effet de chaque facteur est représenté par le module « gamma » qui correspond au rapport du taux de croissance estimé sur le taux de croissance maximum estimé en condition optimale (Couvert et al., 2006) (équation 9) :

$$\gamma_X(X_i) = \frac{\mu_{max}(X_i)}{\mu_{opt}} \quad (9)$$

La valeur de la fonction  $\gamma_X$  varie de 0 à 1. Si pour l'un des facteurs la condition  $X_i$  ne permet pas la croissance, la fonction associée à ce facteur  $\gamma_X(X_i)$  est égale à 0, la croissance est inhibée. A l'inverse, si la fonction associée au facteur considéré  $\gamma_X(X_i)$  est égale à 1, le facteur est à un niveau optimal pour la croissance (Coroller, 2015).

La méthode du « concept gamma » offre une simplicité d'utilisation et d'interprétation, c'est pourquoi elle a également été développée pour étudier l'effet de facteurs environnementaux sur les différents états physiologiques des bactéries sporulées, pas seulement leur croissance. L'effet de facteurs environnementaux a pu être quantifié, par exemple, sur des paramètres décrivant : la sporulation (taux de sporulation, résistance) (Baril, et al., 2012; Gauvry et al., 2021), la germination et reprise de croissance (temps et taux de germination) (Trunet et al., 2015; Trunet et al., 2020) ou encore l'inactivation thermique des spores (résistance des spores) (Baril, et al., 2012; Leguerinel & Mafart, 2001).

#### 4.2. Evaluation de l'effet antimicrobien par modélisation

De nombreux modèles ont été développés pour évaluer l'effet de l'acide inhibiteur sur la croissance bactérienne, dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle. Ces modèles secondaires permettent de mieux prédire les réponses des microorganismes (taux de croissance) en fonction de la concentration en inhibiteur afin de maîtriser le développement bactérien dans un milieu. La mise en place de modèles décrivant l'effet des acides sur la croissance de bactéries, généralement combinés avec l'effet de la température ou du pH, est apparu il y a plusieurs années (Houtsma et al., 1994; Zwietering et al., 1992).

De manière générale, l'évaluation de l'effet d'un agent antimicrobien sur la croissance bactérienne passe par la détermination de la **Concentration Minimale Inhibitrice** (CMI) du composé sur le microorganisme étudié. La CMI est la concentration minimale en agent antimicrobien conduisant à l'inhibition complète de la croissance bactérienne.

Par exemple, le modèle suivant est l'un des premiers modèles apparus pour déterminer la CMI d'un acide et l'un des plus simples (Biesta-Peters et al., 2010; Ghose & Tyagi, 1979) (équation 10) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \left(1 - \frac{[AH]}{CMI}\right) \quad (10)$$

Avec  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximal de la souche étudiée,  $\mu_{opt}$  le taux de croissance optimal, [AH] la concentration en acide non-dissocié et CMI la concentration minimale inhibitrice en acide non-dissocié.

La grande majorité des modèles évaluent directement l'effet de la forme non-dissociée (AH) de l'acide sur le taux de croissance bactérien et négligent donc l'effet de la forme dissociée de l'acide (Coroller et al., 2005; Lambert & Stratford, 1999b; Le Marc et al., 2002). Cependant, certains d'entre eux prennent en compte la dépendance du pH sur l'activité inhibitrice des acides et évaluent l'effet de la forme non-dissociée (AH) et dissociée (A<sup>-</sup>) de l'acide sur l'inhibition de la croissance bactérienne, permettant d'étudier le principal mode d'action de l'acide sur les cellules végétatives (Presser et al., 1997; Ross et al., 2003; Tienungoon et al., 2000). Par exemple, le modèle de Presser et al. (1997) est décrit dans l'équation suivante (équation 11) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \left(1 - \frac{[AH]}{CMI_{[AH]}}\right) \times \left(1 - \frac{[A^-]}{CMI_{[A^-]}}\right) \quad (11)$$

Avec  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximal de la souche étudiée,  $\mu_{opt}$  le taux de croissance optimal, [AH] et [A<sup>-</sup>] les concentrations respectives en acide non-dissocié et dissocié et  $CMI_{[AH]}$  et  $CMI_{[A^-]}$  les concentrations minimales inhibitrices respectives en acide non-dissocié et dissocié.

Par ailleurs, l'évolution des modèles prévisionnels a permis de prendre en compte et de déterminer d'autres paramètres importants dans l'évaluation de l'effet antibactérien d'un composé sur la croissance microbienne. L'ajout de ces paramètres permet d'améliorer l'ajustement des modèles aux données expérimentales et ainsi de mieux comprendre le comportement de l'agent antibactérien en fonction de sa concentration dans un milieu. Ces paramètres peuvent avoir une signification biologique ou non. Par exemple, le modèle de Luong (1985), prend en compte le paramètre  $\alpha$  correspondant à l'allure de la courbe (Figure 14A). Il s'agit d'un paramètre non biologique, permettant d'évaluer la réponse et la sensibilité d'une bactérie à de faibles ou de fortes concentrations en acide non dissocié. Ce modèle est décrit dans l'équation suivante (équation 12) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \times \left(1 - \left(\frac{[AH]}{CMI_{[AH]}}\right)^\alpha\right) \quad (12)$$

Avec,  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximal de la souche étudiée,  $\mu_{opt}$  le taux de croissance optimal, [AH] la concentration en acide non-dissocié,  $CMI_{[AH]}$  la concentration minimale inhibitrice en acide non-dissocié, et  $\alpha$  l'allure de la courbe (Figure 14A). Lorsque  $\alpha$  est inférieur à 1, la courbe est concave ce qui signifie que le microorganisme est plus sensible aux variations de faibles concentrations en acide, à l'inverse lorsque  $\alpha > 1$ , la courbe est convexe, ce qui signifie que le microorganisme est plus sensible aux variations de fortes concentrations en acide.

Lorsque  $\alpha = 1$ , la courbe est une droite ce qui signifie que l'inhibition du taux de croissance est constante en fonction de la concentration en acide (Coroller et al., 2005).

De la même manière, le modèle de Lambert & Pearson (2000), est généralement utilisé pour estimer la CMI d'un composé antimicrobien mais également pour estimer sa CNI, **Concentration Non-Inhibitrice** (équation 13). Il s'agit d'un paramètre biologique permettant d'approfondir l'évaluation de l'effet inhibiteur du composé sur la croissance bactérienne (Figure 14B).

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \exp \left( - \left[ \frac{[AH]}{CMI / \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{CNI}{CMI} \right)}{-e} \right)} \right]^{\left[ \frac{-e}{\ln \left( \frac{NIC}{MIC} \right)} \right]} \right) \quad (13)$$

Avec,  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximal de la souche étudiée,  $\mu_{opt}$  le taux de croissance optimal,  $[AH]$  la concentration en acide,  $CMI$  la concentration minimale inhibitrice, et CNI, la concentration non inhibitrice.

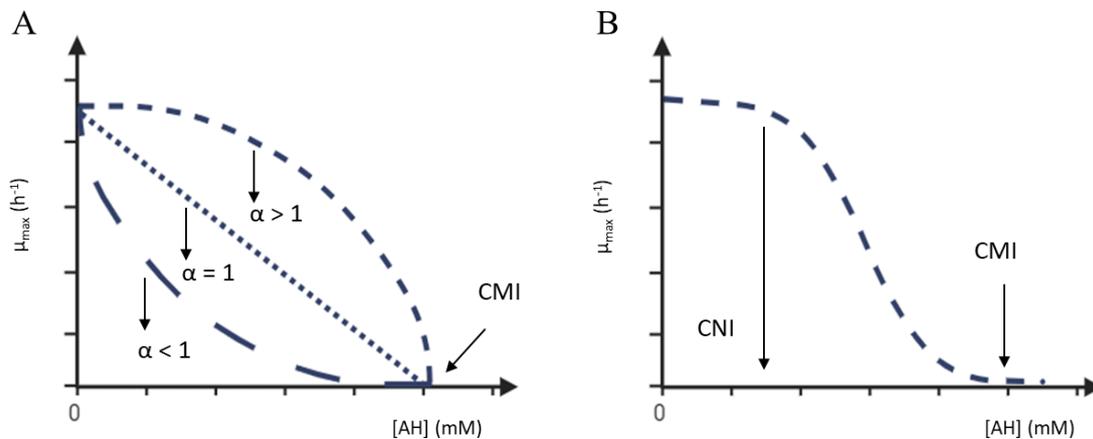


Figure 14 : Exemple d'ajustement du modèle de Luong (1985) (A) et du modèle de Lambert & Pearson (2000) (B) et signification des paramètres estimés

Cependant, au sein des aliments, l'évaluation seule de l'effet d'un acide sur la croissance microbienne n'est pas suffisante. Il est nécessaire de prendre en compte également l'effet des autres conditions environnementales, telles que le pH, la température, l' $a_w$ , ou encore la combinaison d'agents antimicrobiens, et leurs interactions pour garantir la sécurité sanitaire des matrices alimentaires (Leistner & Gorris, 1995).

## 5. Les objectifs de la thèse

La maîtrise de la contamination des aliments par des bactéries sporulées est d'intérêt en raison de leurs conséquences sur la santé du consommateur, mais également en raison du gaspillage et des pertes économiques engendrées par la destruction des matières premières ou des produits finis contaminés. Dans l'industrie alimentaire cette maîtrise du risque sanitaire des produits transformés se caractérise généralement par l'application de traitements thermiques visant à détruire les micro-organismes présents. Ces traitements thermiques peuvent cependant être à l'origine d'altération des propriétés organoleptiques et nutritionnelles des aliments. L'association des traitements thermiques avec de faibles pH ou une faible activité de l'eau au sein de l'aliment vise à limiter leur intensité. Cependant, ces effets barrières ne sont généralement pas suffisants pour éviter la croissance de bactéries sporulées qui ont notamment la capacité de survivre aux traitements thermiques lorsqu'elles sont sous forme de spores. Par ailleurs, la préférence des consommateurs pour des produits alimentaires exempts d'additifs chimiques synthétisés et moins transformés, est un enjeu pour les industriels de l'agroalimentaire. Les consommateurs s'intéressent à la formulation du produit et à sa transformation en raison d'une prise de conscience de leur effet sur leur santé et sur l'environnement (NIQ, 2022).

Pour ces différentes raisons, des stratégies innovantes de lutte contre l'altération et la contamination des aliments par les bactéries sporulées sont encore à développer. C'est pourquoi, les effets antimicrobiens d'acides organiques ont largement été étudiés dans la littérature. Les acides organiques peuvent être produits de manière naturelle (par fermentation bactérienne par exemple) ou sont naturellement présents au sein des aliments et possèdent des propriétés inhibitrices de la germination et de la croissance des bactéries sporulées. L'efficacité inhibitrice de ces composés est en relation avec leurs propriétés physico-chimiques et leur environnement en milieux simplifiés, ce qui entraîne une transférabilité à l'échelle de l'aliment difficile en raison de sa complexité structurelle et compositionnelle. En effet, les propriétés intrinsèques d'un aliment influencent la disponibilité et l'efficacité de composés inhibiteurs sur la croissance de microorganisme. Ce phénomène révèle l'existence d'interactions, entre ces composés, les constituants de l'aliment et les spores et/ou cellules végétatives bactériennes, pour lesquelles il y a un manque de connaissance.

L'objectif principal de la thèse est de mettre en évidence les interactions entre les bactéries sporulées, les composés inhibiteurs et les constituants des aliments afin de mieux comprendre l'impact des propriétés physico-chimiques d'acides inhibiteurs sur leur activité antibactérienne et leur comportement au sein de systèmes biphasiques. Les matrices étudiées sont des émulsions Huile dans Eau, représentant la complexité des aliments de par leurs propriétés dynamiques, structurelles et compositionnelles.

Plusieurs objectifs ont donc été identifiés et traités sous forme de chapitres :

Le **premier objectif** (Chapitre 2) est d'étudier l'efficacité inhibitrice de six acides organiques sélectionnés (ainsi que de la monolaurine) sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4, en relation avec leurs propriétés physico-chimiques en milieu nutritif liquide.

Le **deuxième objectif** (Chapitre 3) est d'évaluer et de comparer l'activité inhibitrice de quatre acides organiques (l'acide acétique, lactique, caprylique et laurique) dans un milieu nutritif liquide et dans une émulsion H/E modèle, sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4. La viabilité cellulaire de la bactérie a également été étudiée au sein de l'émulsion H/E afin de mieux comprendre le phénomène de perte de culturabilité observé sur milieu gélosé BHA.

Le **troisième objectif** (Chapitre 4) est de comprendre l'effet de la matrice sur le comportement et l'activité inhibitrice de deux acides organiques aux propriétés physico-chimiques différentes (l'acide lactique et l'acide caprylique). L'impact du choix de l'émulsifiant et de la matière grasse d'une émulsion H/E modèle est étudié sur l'activité inhibitrice de ces deux acides sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4. Cette étude est également menée au sein d'une matrice fromagère développée en laboratoire, afin de mieux appréhender l'efficacité inhibitrice de ces acides au sein d'une matrice alimentaire réelle et d'étudier la transférabilité des résultats à l'échelle industrielle.

Ce travail a été réalisé sur l'espèce bactérienne *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4, une bactérie psychrotrophe appartenant au groupe *Bacillus cereus sensu lato*, et étudiée en tant que microorganisme responsable d'altérations et d'intoxications alimentaires. Cette bactérie a récemment été reclassée au sein de l'espèce *Bacillus mycoides* par Liu et al. (2018).

## 6. Références

- Ababouch, L., Chaibi, A., & Busta, F. F. (1992). Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. *Journal of Food Protection*, 55(12), 980–984. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.980>
- Ababouch, L. H., Bouqartacha, F., & Busta, F. F. (1994). Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiology*, 11(4), 327–336. <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1037>
- Abraham, M. H. (2004). The factors that influence permeation across the blood-brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(3), 235–240. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2003.12.004>
- Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-the, C., & Albert, I. (2008). Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.028>
- Alongi, K. S., & Shields, G. C. (2010). Theoretical calculations of acid dissociation constants. A review article. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 6(C), 113–138. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(10\)06008-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(10)06008-1)
- ANSES. (2021). *Bacillus cereus. Fiche de Description de Danger Biologique Transmissible Par Les Aliments*, 203–203. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00100-9>
- Arnould, A. (2015). *Dispersion acide myristique-hydroxyde de choline : de la compréhension des mécanismes d'auto-association à l'étude des propriétés moussantes et émulsifiantes*.
- Arslan, S., Eyi, A., & Küçüksari, R. (2014). Toxigenic genes, spoilage potential, and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe*, 25, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.11.006>
- Aspidou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2014). Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, 64, 683–691. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.031>
- Atrih, A., & Foster, S. J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *Journal of Applied Microbiology*, 91(2), 364–372. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01394.x>
- Augustin, J.-C. (2005). *Modélisation de la croissance microbienne et gestion de la sécurité sanitaire des aliments*.
- Augustin, J. C. (2011). Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria. *Food Microbiology*, 28(2), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.003>
- Augustin, J. C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., & Carlier, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1706–1710. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1706-1710.2000>
- Baranyi, J., Roberts, T., & McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*.
- Baranyi, József, & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294.

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

- Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2011). The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology*, *146*(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.042>
- Baril, Eugénie, Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and aw. *Food Microbiology*, *32*(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.011>
- Baril, Eugénie, Coroller, L., Couvert, O., Leguérinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. *Food Microbiology*, *30*(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.017>
- Berton-Carabin, C. C., Sagis, L., & Schroën, K. (2018). Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, *9*(January), 551–587. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012405>
- Berton-Carabin, C., & Schroën, K. (2019). Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. *Current Opinion in Food Science*, *27*, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.06.006>
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. (2010). Comparing nonsynergistic gamma models with interaction models to predict growth of emetic *Bacillus cereus* when using combinations of pH and individual undissociated acids as growth-limiting factors. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(17), 5791–5801. <https://doi.org/10.1128/AEM.00355-10>
- Boons, K., Noriega, E., Verherstraeten, N., David, C. C., Hofkens, J., & Van Impe, J. F. (2015). The effect of medium structure complexity on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in gelatin-dextran systems. *International Journal of Food Microbiology*, *199*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.015>
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., & Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling*, *27*(9), 1017–1032. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Brocklehurst, B. T. F., & Wilson, P. D. G. (2000). *The role of lipids in controlling microbial growth\_Wilson\_2000*. *51*, 66–73.
- Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., & Smith, A. C. (1997). A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, *14*(4), 303–311. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0098>
- Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, *78*(6), 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)

- Buchanan, R. E. (1918). Life Phases in a Bacterial Culture. *The Journal of Infectious Diseases*, 23(2), 109–125.
- Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., Svensson, B., Nguyen-the, C., & Ehling-Schulz, M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1–2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>
- Carlin, F., & Nguyen-The, C. (2013). Pathogen update: *Bacillus* species. In J. Sofos (Ed.), *Advances in Microbial Food Safety* (pp. 70–96). Woodhead Publishing. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780857094384500194>
- Carlin, Frédéric, Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M. H., Auger, S., Sorokine, A., & Nguyen-Thé, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, 43(7), 1885–1894. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>
- Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2022). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(28), 7677–7702. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735>
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R. G., Carballeira, N. M., & Sanabria-Ríos, D. J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, 82(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
- Christie, G., & Setlow, P. (2020). *Bacillus* spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn. *Cellular Signalling*, 74(July), 109729. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109729>
- Coroller, L., Leguérinel, I., & Mafart, P. (2001). Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 317–322. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.317-322.2001>
- Coroller, Louis. (2015). *Ecologie microbienne des aliments : Modélisation du comportement bactérien*.
- Coroller, Louis, Guerrot, V., Huchet, V., Le Marc, Y., Mafart, P., Sohier, D., & Thuault, D. (2005). Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1–3), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.014>
- Couvert, O., Augustin, J. C., Huchet, V., Mafart, P., & Thuault, D. (2006). Sym'Previous la microbiologie prévisionnelle, du laboratoire à l'industrie agroalimentaire. *Sciences Des Aliments*, 26(5), 377–393. <https://doi.org/10.3166/sda.26.377-393>
- Couvert, Olivier, Divanac'h, M. L., Lochardet, A., Thuault, D., & Huchet, V. (2019). Modelling the effect of oxygen concentration on bacterial growth rates. *Food Microbiology*, 77(July 2018), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.005>
- Cowan, A. E., Koppel, D. E., Setlow, B., & Setlow, P. (2003). A soluble protein is immobile in

- dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: Implications for spore dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4209–4214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0636762100>
- Cowan, A. E., Olivastro, E. M., Koppel, D. E., Loshon, C. A., Setlow, B., & Setlow, P. (2004). Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), 7733–7738. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306859101>
- Cronin, U. P., & Wilkinson, M. G. (2008). Physiological response of *Bacillus cereus* vegetative cells to simulated food processing treatments. *Journal of Food Protection*, 71(11), 2168–2176. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.11.2168>
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., & McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 391–404. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90165-1)
- Davidson, M., Taylor, M., & David, J. (2021). *Antimicrobials in Food* (D. M. P., T. M. T., & D. J. R.D. (eds.); Fourth Edi). CRC Press.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Clerté, C., Carlin, F., Giniès, C., & Nguyen-The, C. (2012). Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1715–1723. <https://doi.org/10.1128/AEM.06410-11>
- 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.
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- DGCCRF. (2021). *Conservation des aliments : toutes les techniques*. [https://www.economie.gouv.fr/files/files/directions\\_services/dgccrf/documentation/fiches\\_pratiques/fiches/Conservation-des-aliments.pdf](https://www.economie.gouv.fr/files/files/directions_services/dgccrf/documentation/fiches_pratiques/fiches/Conservation-des-aliments.pdf)
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.08.005>
- Disdier, Z., Savoye, S., & Dagnelie, R. V. H. (2022). Effect of solutes structure and pH on the n-octanol/water partition coefficient of ionizable organic compounds. *Chemosphere*, 304(June). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135155>
- Dittmann, C., Han, H. M., Grabenbauer, M., & Laue, M. (2015). Dormant *Bacillus* spores protect their DNA in crystalline nucleoids against environmental stress. *Journal of Structural Biology*, 191(2), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.019>
- Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1908–1914. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.03.003>
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D., & Koehler, T. M. (2019). The bacillus cereus group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Gram-Positive Pathogens*, 2, 875–902. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch55>

- Eijlander, R. T., Abee, T., & Kuipers, O. P. (2011). Bacterial spores in food: How phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.009>
- Eijlander, R. T., De Jong, A., Krawczyk, A. O., Holsappel, S., & Kuipers, O. P. (2014). SporeWeb: An interactive journey through the complete sporulation cycle of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 685–691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1007>
- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), 383–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02632.x>
- Eklund, T. (1985). Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 2(3), 159–167. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90035-2)
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117–126. <https://doi.org/10.1038/nrmicro750>
- European Food Safety Authority. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- Fameau, A. L., Arnould, A., & Saint-Jalmes, A. (2014). Responsive self-assemblies based on fatty acids. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(5), 471–479. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.08.005>
- Garcia, D., der Voort, M. van, & Abee, T. (2010). Comparative analysis of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores obtained at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2–3), 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.005>
- Gauvry, E., Mathot, A. G., Couvert, O., Leguérinel, I., & Coroller, L. (2021). Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915>
- Ghose, T. K., & Tyagi, R. D. (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 21(8), 1387–1400. <https://doi.org/10.1002/bit.260210807>
- Ghosh, S., & Setlow, P. (2009). Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1787–1797. <https://doi.org/10.1128/JB.01668-08>
- Griepernau, B., & Böckmann, R. A. (2008). The influence of 1-alkanols and external pressure on the lateral pressure profiles of lipid bilayers. *Biophysical Journal*, 95(12), 5766–5778. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.142125>
- Griffiths, K. K., Zhang, J., Cowan, A. E., Yu, J., & Setlow, P. (2011). Germination proteins in the inner membrane of dormant *Bacillus subtilis* spores colocalize in a discrete cluster. *Molecular Microbiology*, 81(4), 1061–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07753.x>
- Grimbergen, A. J., Siebring, J., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2015). Microbial bet-hedging: The power of being different. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.008>

- Guinebretière, M. H., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., de Sarrau, B., de Buyser, M. L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P. E., Lereclus, D., de Vos, P., Nguyen-The, C., & Sorokin, A. (2013). *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), 31–40. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.030627-0>
- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851–865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>
- Henriques, A. O., & Moran, C. P. (2007). Structure, assembly, and function of the spore surface layers. *Annual Review of Microbiology*, 61, 555–588. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093224>
- Higgins, D., & Dworkin, J. (2012). Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(1), 131–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00310.x>
- Houtsma, P. C., Kusters, B. J. M., de Wit, J. C., Rombouts, F. M., & Zwietering, M. H. (1994). Modelling growth rates of *Listeria innocua* as a function of lactate concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1–2), 113–123. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90111-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90111-2)
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A. B., Ramón, D., Martínez, J. F., Codoñer, F. M., & Rosselló-Móra, R. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Kabara, J. J., Swieczowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemistry*, 2(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00292-9>
- Kadri, H. El, Devanthi, P. V. P., Overton, T. W., & Gkatzionis, K. (2017). Do oil-in-water (O/W) nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria? *Food Research International*, 101(June), 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.064>
- Kah, M., & Brown, C. D. (2008). Log D: Lipophilicity for ionisable compounds. *Chemosphere*, 72(10), 1401–1408. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.04.074>
- Khuwijitjaru, P., Adachi, S., & Matsuno, R. (2002). Solubility of saturated fatty acids in water at elevated temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66(8), 1723–1726. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1723>
- Köhler, H. R., Gräff, T., Schweizer, M., Blumhardt, J., Burkhardt, J., Ehmann, L., Hebel, J., Heid, C., Kundy, L., Kuttler, J., Malusova, M., Moroff, F. M., Schlösinger, A. F., Schulze-Berge, P., Panagopoulou, E. I., Damalas, D. E., Thomaidis, N. S., Triebkorn, R., Maletzki, D., von der Ohe, P. C. (2023). LogD-based modelling and  $\Delta\log D$  as a proxy for pH-dependent action of ionizable chemicals reveal the relevance of both neutral and ionic

- species for fish embryotoxicity and possess great potential for practical application in the regulation of chemicals. *Water Research*, 235(March). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119864>
- Kono ,T., 1968. Kinetics of microbial cell growth. *Biotech. Bioeng.*, 10, 105-131.
- Kralova, I., & Sjöblom, J. (2009). Surfactants used in food industry: A review. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 30(9), 1363–1383. <https://doi.org/10.1080/01932690902735561>
- Kujawski, J., Bernard, M. K., Janusz, A., & Kuźma, W. (2012). Prediction of log P: ALOGPS application in medicinal chemistry education. *Journal of Chemical Education*, 89(1), 64–67. <https://doi.org/10.1021/ed100444h>
- Lambert, R. J., & Stratford, M. (1999a). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157–164. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00646.X>
- Lambert, R. J., & Stratford, M. (1999b). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157–164. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00646.X>
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
- 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(2–3), 219–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00640-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00640-7)
- Le Marc, Yvan, Baert, L., Buss da Silva, N., Postollec, F., Huchet, V., Baranyi, J., & Ellouze, M. (2021). The effect of pH on the growth rate of *Bacillus cereus* sensu lato: Quantifying strain variability and modelling the combined effects of temperature and pH. *International Journal of Food Microbiology*, 360(July). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109420>
- Leal-Calderon, F., Thivilliers, F., & Schmitt, V. (2007). Structured emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.003>
- Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, & Scherer S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1 998), 1373–1382.
- Leggett, M. J., McDonnell, G., Denyer, S. P., Setlow, P., & Maillard, J. Y. (2012). Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(3), 485–498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05336.x>
- Leguerinel, I., & Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1–2), 29–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00394-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00394-9)
- Leistner, L., & Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*, 6(2), 41–46. <https://doi.org/10.1016/S0924->

2244(00)88941-4

- Léonard-Akkari, L., Guégan, S., Courand, F., Couvert, O., Lepage, J. F., Rondeau-Mouro, C., Desriac, N., Mathot, A. G., Leguérinel, I., Coroller, L., & Decourcelle, N. (2018). Dispersed phase volume fraction, weak acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Research International*, 109(April), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.016>
- Liu, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 106–112. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>
- Loeffler, M., McClements, D. J., McLandsborough, L., Terjung, N., Chang, Y., & Weiss, J. (2014). Electrostatic interactions of cationic lauric arginate with anionic polysaccharides affect antimicrobial activity against spoilage yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 28–39. <https://doi.org/10.1111/jam.12502>
- Luong, J. H. T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3), 280–285. <https://doi.org/10.1002/BIT.260270311>
- Ly, M. H., Naïtali-Bouchez, M., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Le, T. M., Belin, J. M., & Waché, Y. (2006). Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.022>
- Malakar, P. K., Martens, D. E., Breukelen, W. Van, Boom, R. M., Zwietering, M. H., & Riet, K. Van. (2002). Modeling the Interactions of *Lactobacillus curvatus* Colonies in Solid Medium: Consequences for Food Quality and Safety. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3432–3441. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3432>
- Mathot, A. G., Postollec, F., & Leguérinel, I. (2021). Bacterial spores in spices and dried herbs: The risks for processed food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 840–862. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12690>
- McClements, D. J. (2016). *Food Emulsions*.
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: Assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, 11(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Melly, E., Genest, P. C., Gilmore, M. E., Little, S., Popham, D. L., Driks, A., & Setlow, P. (2002). Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, 92(6), 1105–1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01644.x>
- Mertens, L., Geeraerd, A. H., Dang, T. D. T., Vermeulen, A., Serneels, K., Van Derlinden, E., Cappuyns, A. M., Moldenaers, P., Debevere, J., Devlieghere, F., & Van Impe, J. F. (2009). Design of an experimental viscoelastic food model system for studying *Zygosaccharomyces bailii* spoilage in acidic sauces. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7060–7069. <https://doi.org/10.1128/AEM.01045-09>
- Messelhäuser, U., & Ehling-Schulz, M. (2018). *Bacillus cereus*—a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 120–125. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0095-9>

- Mock, M.; Fouet, A. (2001). Annurev.Micro.55.1.647 Mock E Fouet 2001 Anthracis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55(647–671).
- Moir, A. (2006). How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 526–530. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02885.x>
- Naïtali, M, Guillier, L., & Dubois-Brissonnet, F. (2017). *Risques microbiologiques alimentaires: Vol. Collection.*
- Naïtali, Murielle, Dubois-Brissonnet, F., Cuvelier, G., & Bellon-Fontaine, M. N. (2009). Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.008>
- Nakamura, L. K. (1998). Determine the Phylogenetic Relationship of the Group 2. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 1031–1035.
- Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 548–572. <https://doi.org/10.1128/membr.64.3.548-572.2000>
- NIQ. (2022). *Health and Wellness Consumer Needs in Protective & Urgent Care needs we 're watching.*
- Ontiveros, J. F., Nollet, M., Pierlot, C., & Nardello-Rataj, V. (2018). Revisiting the influence of carboxylic acids on emulsions and equilibrated SOW systems using the PIT-slope method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 536(October 2016), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.07.021>
- Parker, M. L., Brocklehurst, T. F., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I—Methods for investigating the form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 601–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03105.x>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Pin, C., & Baranyi, J. (2008). Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2534–2536. <https://doi.org/10.1128/AEM.02402-07>
- Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., & Carlin, F. (2011). Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties. *Food Microbiology*, 28(2), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.015>
- Postollec, F., Mathot, A. G., Bernard, M., Divanac'h, M. L., Pavan, S., & Sohier, D. (2012). Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.004>
- 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(6), 2355–2360.

- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., In't Veld, P., Denon, Q., Vêrhe, R., & Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology*, 46(5), 536–541. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02350.x>
- Robins, M. M., & Wilson, P. D. G. (1994). Food structure and microbial growth. *Trends in Food Science and Technology*, 5(9), 289–293. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90137-6)
- Rosen, M. J. (1989). Surfactants and interfacial phenomena. In *Colloids and Surfaces* (Vol. 40). [https://doi.org/10.1016/0166-6622\(89\)80030-7](https://doi.org/10.1016/0166-6622(89)80030-7)
- Ross, T., Ratkowsky, D. A., Mellefont, L. A., & McMeekin, T. A. (2003). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 82(1), 33–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00252-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00252-0)
- 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>
- Samapundo, S., Heyndrickx, M., Xhaferi, R., de Baenst, I., & Devlieghere, F. (2014). The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.018>
- Santé publique France. (2023). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). In *Données de la déclaration obligatoire*.
- Seale, R. B., Flint, S. H., McQuillan, A. J., & Bremer, P. J. (2008). Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(3), 731–737. <https://doi.org/10.1128/AEM.01725-07>
- Setlow, B., Loshon, C. A., Genest, P. C., Cowan, A. E., Setlow, C., & Setlow, P. (2002). Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *Journal of Applied Microbiology*, 92(2), 362–375. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01540.x>
- Setlow, P. (2013). Summer meeting 2013 - when the sleepers wake: The germination of spores of *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology*, 115(6), 1251–1268. <https://doi.org/10.1111/jam.12343>
- Setlow, Peter. (2003). Spore germination. *Current Opinion in Microbiology*, 6(6), 550–556. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001>
- Setlow, Peter. (2014a). Germination of spores of *Bacillus* species: What we know and do not know. *Journal of Bacteriology*, 196(7), 1297–1305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>
- Setlow, Peter. (2014b). Spore resistance properties. *The Bacterial Spore: From Molecules to Systems, October 2014*, 201–215. <https://doi.org/10.1128/9781555819323.ch10>
- Setlow, Peter, Wang, S., & Li, Y. Q. (2017). Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales. *Annual Review of Microbiology*, 71, 459–477. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093558>
- Smelt, J. P. P. M., Bos, A. P., Kort, R., & Brul, S. (2008). Modelling the effect of sub(lethal)

- heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.023>
- Sofos, J. N., Pierson, M. D., Blocher, J. C., & Busta, F. F. (1986). Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, 3(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(86\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(86)90036-X)
- Stecchini, M. L., Del Torre, M., & Polese, P. (2013). Survival strategies of *Bacillus* spores in food. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(11), 905–909.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4), 579–606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>
- Stephen, A. M., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2006). Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition. In *Food Polysaccharides and Their Applications: Second Edition*.
- Stratford, M., & Eklund, T. (2003). Organic acids and esters. In *Food Preservatives* (pp. 48–84). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_4)
- Stringer, S. C., Webb, M. D., & Peck, M. W. (2011). Lag time variability in individual spores of *Clostridium botulinum*. *Food Microbiology*, 28(2), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.003>
- Tallent, S. M., A. Knolhoff, E. J. Rhodehamel, S. M. Harmon, and R. W. Bennett. 2019. Chapter 14 : *Bacillus cereus*. In *Bacteriological analytical manual (BAM)*. Food and Drug Administration. Accessed January 04, 2024. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-14-bacillus-cereus>.
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2012). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food and Function*, 3(3), 290–301. <https://doi.org/10.1039/c2fo10198j>
- Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Verhulst, A., Poot, K., Van Bree, I., Devlieghere, F., Moldenaers, P., Wilson, D., Brocklehurst, T., & Van Impe, J. F. (2008). Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.031>
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D. A., McMeekin, T. A., & Ross, T. (2000). Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11), 4979–4987. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.11.4979-4987.2000>
- Todd, S. J., Moir, A. J. G., Johnson, M. J., & Moir, A. (2003). Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3373–3378. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3373-3378.2003>
- 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(2), 562–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-14>
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A., Postollec, F., Leguerinel, I., Couvert, O., Broussolle, V.,

- Carlin, F., & Coroller, L. (2020). Suboptimal *Bacillus licheniformis* and *Bacillus weihenstephanensis* Spore incubation conditions Increase Heterogeneity of Spore Outgrowth Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6).
- Trunet, Clément. (2016). *Germination , émergence et reprise de croissance de spores bactériennes après un traitement thermique.*
- van Beilen, J. W. A., & Brul, S. (2013). Compartment-specific pH monitoring in *Bacillus subtilis* using fluorescent sensor proteins: A tool to analyze the antibacterial effect of weak organic acids. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUN), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00157>
- van Melis, C. C. J., Almeida, C. B., Kort, R., Nierop Groot, M. N., & Abee, T. (2012). Germination inhibition of *Bacillus cereus* spores: Impact of the lipophilic character of inhibiting compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.006>
- van Melis, C. C. J., Nierop Groot, M. N., & Abee, T. (2011). Impact of sorbic acid on germinant receptor-dependent and-independent germination pathways in *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2552–2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.02520-10>
- Veening, J. W., Smits, W. K., & Kuipers, O. P. (2008). Bistability, epigenetics, and bet-hedging in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 62, 193–210. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.163002>
- Warda, A. K., den Besten, H. M. W., Sha, N., Abee, T., & Nierop Groot, M. N. (2015). Influence of food matrix on outgrowth heterogeneity of heat damaged *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.010>
- Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (2015). The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, 4(May), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>
- Wells-Bennik, M. H. J., Eijlander, R. T., Den Besten, H. M. W., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Nierop Groot, M. N., Xiao, Y., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P., & Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 457–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144>
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00660-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00660-2)
- Wimpenny, J. W. T., Leistner, L., Thomas, L. V., Mitchell, A. J., Katsaras, K., & Peetz, P. (1995). Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 299–315. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00065-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00065-8)
- Xu Zhou, K., Wisnivesky, F., Wilson, D. I., & Christie, G. (2017). Effects of culture conditions on the size, morphology and wet density of spores of *Bacillus cereus* 569 and *Bacillus megaterium* QM B1551. *Letters in Applied Microbiology*, 65(1), 50–56. <https://doi.org/10.1111/lam.12745>

- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>
- Zalazar, A. L., Gliemmo, M. F., & Campos, C. A. (2016). Effect of stabilizers, oil level and structure on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* and on physical stability of model systems simulating acid sauces. *Food Research International*, 85, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.040>
- Zhang, P., Setlow, P., & Li, Y. (2009). Characterization of single heat-activated *Bacillus* spores using laser tweezers Raman spectroscopy. *Optics Express*, 17(19), 16480. <https://doi.org/10.1364/oe.17.016480>
- Zheng, C. J., Yoo, J. S., Lee, T. G., Cho, H. Y., Kim, Y. H., & Kim, W. G. (2005). Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 579(23), 5157–5162. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.028>
- Zhou, K., George, S. M., Métris, A., Li, P. L., & Baranyi, J. (2011). Lag phase of *Salmonella enterica* under osmotic stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), 1758–1762. <https://doi.org/10.1128/AEM.02629-10>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>
- Zwietering, Marcel H., Wijtzes, 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(12), 973–979. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-55.12.973>



---

## **Chapitre 2 :**

Relation entre efficacité inhibitrice et propriétés physico-chimiques de six acides organiques et de la monolaurine contre *B. weihenstephanensis* KBAB4 en milieu nutritif liquide

---

L'application de modèles prévisionnels à des données expérimentales permet la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'un agent antibactérien dans un milieu et sur une souche bactérienne en particulier. L'utilisation de ces modèles permet également la description de phénomènes biologiques observés tel que la sensibilité du microorganisme aux variations de concentrations de l'agent antibactérien. En fonction du modèle appliqué, ces phénomènes peuvent être décrits par l'estimation de paramètres non biologiques comme le paramètre  $\alpha$  qui décrit la réponse du microorganisme à de faibles ou fortes concentrations en agent antibactérien (modèle de Luong, 1985) ou par l'estimation de paramètres biologiques tels que la Concentration Non Inhibitrice (CNI) qui définit la concentration en agent antibactérien en dessous de laquelle la croissance du microorganisme n'est pas inhibée (modèle de Lambert & Pearson, 2000).

L'objectif de ce chapitre est de quantifier et caractériser l'activité inhibitrice des composés sélectionnés sur l'inhibition de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans un milieu nutritif simple. Cette caractérisation de l'activité inhibitrice de différents composés sur la souche d'intérêt dans un milieu simple est une étape préalable à la compréhension des interactions entre composés inhibiteurs, microorganismes et les composants de matrices alimentaires. Pour faire le lien en les trois composantes de l'étude (inhibiteurs, microorganismes et matrices alimentaires), la qualification des propriétés des inhibiteurs de croissance et leur mode d'action dans un milieu nutritif de laboratoire, en lien avec leurs caractéristiques physico-chimiques, est d'intérêt, car ces dernières sont des déterminants essentiels de leur fonctionnalité en matrice alimentaire.

Dans ce chapitre, les activités inhibitrices de six acides organiques (l'acide acétique, lactique, propionique, phényllactique, caprylique et laurique) et de la monolaurine sur l'inhibition de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sont évaluées en milieu nutritif à pH 6,0 et 5,5 par modélisation en comparant l'utilisation de deux modèles prévisionnels, le modèle de Luong (1985) et le modèle de Lambert & Pearson (2000). Par la suite, les paramètres estimés par ces modèles (CMI,  $\alpha$  ou CNI) sont mis en relation avec les caractéristiques physico-chimiques des acides afin de comparer l'efficacité inhibitrice des acides en fonction de ces caractéristiques.

Les résultats de ce chapitre sont présentés sous forme d'un article scientifique publié dans le journal *Food Microbiology* en 2024.

**Article 1: Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium**

---

Article publié dans *Food Microbiology*, 121 (2024), <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104498>

Agathe Dutoit<sup>a</sup>, Nicolas Decourcelle<sup>a</sup>, Anne-Gabrielle Mathot<sup>a</sup>, Louis Coroller<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29000 Quimper, France

\*corresponding author: [louis.coroller@univ-brest.fr](mailto:louis.coroller@univ-brest.fr)

Keywords:

Growth inhibition, *Bacillus cereus* group, chemical structure, pKa, lipophilicity, MIC.

Highlights:

- pKa and chemical structure influenced the inhibitory efficacy of a compound
- Predictive models highlighted the mode of action of acid inhibition
- Growth inhibition is not always dictated by the undissociated form of acid
- Low MIC values are linked to greater lipophilicity of the compound

## 1. Abstract

Organic acids are widely used in foodstuffs to inhibit pathogen and spoiler growth. In this study, six organic acids (acetic, lactic, propionic, phenyllactic, caprylic, and lauric acid) and monolaurin were selected based on their physicochemical properties: their molecular structure (carbon chain length), their lipophilicity (logP), and their ability to dissociate in a liquid environment (pKa). The relation between these physicochemical properties and the inhibitory efficacy against *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth was evaluated. After assessing the active form of these compounds against the strain (undissociated, dissociated or both forms), their MIC values were estimated in nutrient broth at pH 6.0 and 5.5 using two models (Lambert & Pearson, 2000; Luong, 1985). The use of two models highlighted the mode of action of an antibacterial compound in its environment, thanks to the additional estimation of the curve shape  $\alpha$  or the Non-Inhibitory Concentration (NIC). The undissociated form of the tested acids is responsible for growth inhibition, except for lauric acid and monolaurin. Moreover, long-carbon chain acids have lower estimated MICs, compared to short-chain acids. Thus, the inhibitory efficacy of organic acids is strongly related to their carbon chain length and lipophilicity. Lipophilicity is the main mechanism of action of a membrane-active compound, it can be favored by long chain structure or high pKa in an acid environment like food.

## 2. Introduction

*Bacillus* spp. are commonly associated with food poisoning and food spoilage (Jovanovic et al., 2021). *Bacillus cereus* is one of the major cause of foodborne illnesses worldwide (European Food Safety Authority, 2016) causing diarrheic and emetic syndromes due to its ability to produce heat-resistant toxins (cereulide) and enterotoxins (Nhe, CytK, Hbl). Within the *B. cereus* group, *B. weihenstephanensis* KBAB4 is a psychrotolerant strain able to grow at 7°C or below, leading to potential sanitary risks in refrigerated food products (Guinebretière et al., 2008; Lapidus et al., 2008).

To prevent the growth of foodborne pathogens or toxin production in food, the use of acids as antimicrobial agents has long been studied (Adams & Hall, 1988; Kabara et al., 1972; Wang & Johnson, 1992). Moreover, due to increasing consumer preference for natural products and concerns about the potential health risks associated with synthesis additives, there has been a growing interest in using naturally occurring acids and/or recognized as safe compounds (GRAS) that possess antibacterial properties to combat pathogens and spoilers bacteria in food. In this context, organic acids or other acids produced by bacterial fermentation have shown

promising results (Ning et al., 2017; Park et al., 2021; Seo et al., 2023). Fatty acids and monoglycerides, which are naturally present in food, are also viable candidates for this purpose (Buňková et al., 2010; Wang et al., 2020). It is largely recognized that the antimicrobial mechanism of organic acids is dependent on their pKa and the pH of the environment. Indeed, due to its lipophilic properties, the undissociated form of organic acids interacts with the bacterial membrane leading to an increase in the intracellular acid concentration and in this way, to the acidification of the cytoplasm by dissociating into the cell. This acidification consequently inhibits the bacterial metabolism and if the stress is too high, it could lead to cell death (Stratford & Eklund, 2003). Compared to organic acid, fatty acids and monoglycerides have high lipophilic properties. They cause damage to the cell membrane leading to complete cell disruption and disorganization (Casillas-Vargas et al., 2021; Desbois & Smith, 2010). Moreover, their activity is due to multiple targets on the cytoplasmic membrane (Churchward et al., 2018). The mechanism of action of short and medium-chain fatty acids (C3-C8) is based on the penetration of the undissociated form into bacterial cells, as weak acids. The antibacterial activity of organic acids is associated with their structural properties, their ability to dissociate (pKa), and also their lipophilicity, assessed by the octanol-water partition coefficient (log P). However, the structure-activity relationships of organic acids against bacteria still need to be further explored.

A variety of models from the literature have described the effects of pH and various acids on microbial growth rates (Coroller et al., 2005; Lambert & Stratford, 1999; Le Marc et al., 2002). Some of them consider the effect of both undissociated and dissociated acid forms especially for organic acids (Presser et al., 1997; Rosso et al., 1997), but few models have been developed to describe the mechanism of action of other antimicrobial agents like fatty acids or monoglycerides (Pernin et al., 2019). Most of the models assess the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the lowest concentration of an antimicrobial compound leading to complete inhibition of bacterial growth during a defined period, which generally reflects the inhibitory activity of a compound against a microorganism.

In this study, the objective was to evaluate the inhibitory efficacy of seven compounds (six organic acids and one monoglyceride) against *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth in a liquid medium. The MIC value and one other complementary parameter value, the curve shape  $\alpha$  or the Non-Inhibitory Concentration (NIC), were assessed using the models suggested by Luong (1985) and Lambert and Pearson (2000). Each acid form was investigated for its antibacterial activity in order to describe the inhibitory activity and made correlations between the efficiency and the physicochemical characteristics of the compound.

### 3. Materials and methods

#### 3.1. Bacterial strain and cell preparation

*B. weihenstephanensis* KBAB4 (kindly provided by INRAE, Avignon, France) is a psychotropic strain belonging to the group VI of *B. cereus sensu lato* (Guinebretiere et al., 2008) and recently reclassified as *B. mycooides* (Liu et al., 2018). A vegetative cell suspension was divided into 1.5 ml aliquots and stored at -80 °C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) diluted in 20% glycerol (v/v). A 100 mL BHI flask was inoculated with 1 mL of one of these aliquots and incubated at 30°C, the optimal growth temperature of the strain. The flasks were shaken at 100 rpm. After 8h of incubation, 1 ml of the culture was diluted in a new 100 ml BHI broth flask and was incubated 16h at the same temperature. The final concentration of this overnight culture was approximately  $1.0 \times 10^8$  CFU/ml.

#### 3.2. Inhibitory compounds

Seven antimicrobial compounds were studied: acetic acid (99% pure), lactic acid (90% pure), propionic acid (99% pure), phenyllactic acid (98% pure), caprylic acid (98% pure), lauric acid (98% pure), and monolaurin (99% pure) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The purpose of selecting these seven compounds was to ensure they represent a range of different physicochemical properties. To begin with, they vary in terms of their chemical composition. Table 1 provides a summary of these properties: four of the compounds are monocarboxylic acids with increasing carbon chain lengths, namely acetic acid (C2), propionic acid (C3), caprylic acid (C8), and lauric acid (C12). Lactic acid (C3) and phenyllactic acid (C9) are both organic acids, with the former containing a hydroxyl group and the latter an aromatic group within their structure. Monolaurin (C15) is an ester composed of glycerol and lauric acid. The lipophilicity (logP) of these compounds ranges from -0.72 to 4.60, while their dissociation constants (pKa) span from 3.86 to 13.10 (as indicated in Table 2). The lipophilicity (logP) is characterized by the octanol-water partition coefficient. Additionally, the pKa values indicate their capacity to dissociate based on the pH of the surrounding environment.

Stock solutions of 1.0 M acetic, lactic and propionic acids, and 0.2 M phenyllactic acid were prepared in distilled water. Lauric acid was mixed in Tween 80 (0.1% w/v) in distilled water at 55°C to a final concentration of 1 mM. Caprylic acid and monolaurin were prepared in ethanol 70% to a final concentration of 1.0 M and 0.02 M respectively. The effects of Tween 80 at 0.1%

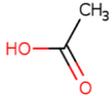
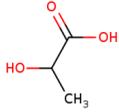
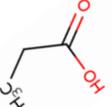
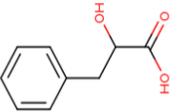
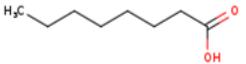
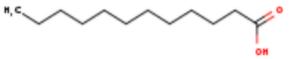
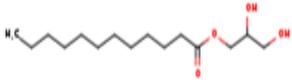
and of ethanol at 0.1% were assessed on *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth in nutrient broth (see part 3.2). The acid stock solutions were added to nutrient broth to reach an appropriate final concentration (Table 2) and pH was adjusted to 5.5 or 6.0 using HCl or NaOH at 1M. The media were then sterilized through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Stericup, Millipore). These two pH values were required to assess the effect of the undissociated or dissociated acid concentration on the bacterial growth.

### 3.3. Bioscreen growth experiments

To investigate the effect of acids at two different pH values (pH 5.5 and pH 6.0) on vegetative cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4, the growth kinetics were acquired in nutrient broth at 30°C with different acid concentrations. Optical density (OD) at 600 nm was measured in two-100-well-honeycomb microplates using a Bioscreen C reader (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland) for 120 hours. An overnight preculture of *B. weihenstephanensis* KBAB4 (see part 2.1) was diluted several times in nutrient broth with different concentrations of inhibitors, to reach a final concentration of  $5 \log_{10}$  (CFU/ml) (named as  $N_0$ ). A volume of 500  $\mu\text{l}$  from those suspensions was then used to fill the first 10-well row of the microplate. For each tested concentration, two-fold dilutions with 250  $\mu\text{l}$  were performed seven times, leading to an 8-well series. The two remaining wells are negative controls, *i.e.* uninoculated wells. The microplates were incubated in the spectrophotometer at 30°C and OD was measured every 10 min with low intensity shaking 20s prior to each measurement. The maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) values were determined by linear regression between the time of detection and the initial contamination yield of the wells ( $[\ln(N_0)/\text{dilution}]$ ), as previously described by Membre et al. (2002). At least two replicates were acquired for each compound concentration.

Table 2 : Physico-chemical characteristics of tested organic acids and monolaurin, and experimental conditions

<sup>a</sup> Molecular structure and logP were obtained with SwissADME (SIB)

Name (CAS)	Chemical formula	Molecular structure <sup>a</sup>	logP <sup>a</sup>	pK <sub>a</sub>	Molar mass (g/mol)	pH	Tested concentration range (mM)
Acetic acid (64-19-7)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		-0.21	4.76	60.05	5.5 6.0	0 - 40 0 - 80
Lactic acid (79-33-4)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		-0.72	3.86	90.08	5.5 6.0	0 - 150 0 - 300
Propionic acid (79-09-4)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		0.33	4.75	74.08	5.5 6.0	0 - 20 0 - 60
Phenyllactic acid (828-01-3)	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>		1.13	4.02	166.17	5.5 6.0	0 - 20 0 - 40
Caprylic acid (124-07-2)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		3.05	4.89	144.21	5.5 6.0	0 - 0.2 0 - 2.0
Lauric acid (143-07-7)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		4.20	5.30	200.32	5.5 6.0	0 - 0.15 0 - 0.20
Monolaurin (142-18-7)	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>		4.16	13.10	274.39	5.5 6.0	0 - 0.05 0 - 0.07

### 3.4. Investigating the acid form responsible for *B. weihenstephanensis* growth inhibition

The experimental  $\mu_{max}$  for both pH values were plotted as a function of the undissociated, dissociated or the total concentration of acid calculated thanks to the Henderson-Hasselbach equation (equation 14):

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (14)$$

where pH is the measured pH of the medium, pKa is the acid dissociation constant (Table 2),  $[A^-]$  is the concentration of dissociated acid and  $[HA]$  is the concentration of undissociated acid, deduced by the total acid concentration which is equal to the sum of both forms-(as discussed section 3.1, note that monolaurin is not influenced by pH in the media used for this study).

The form of the tested compounds leading to bacterial growth inhibition can be identified from graphical observations. When increasing the concentration of each acid form, the growth rate should decrease toward the same minimum inhibitory concentration whatever the pH, thus indicating that this form is responsible for inhibition independently of the pH. This observation can be validated by studying the quality of fit of the models below.

### 3.5. Modelling the effect of acid concentration on growth rate

Two models were compared to evaluate the effect of the undissociated form or total form concentrations on the growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 and to estimate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each tested acid. The first model is from Luong, (1985) (equation 15).

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \left[ 1 - \left( \frac{[HA]}{MIC} \right)^\alpha \right] \quad (15)$$

Where  $\mu_{opt}$  is the *B. weihenstephanensis* KBAB4 specific growth rate in nutrient broth at pH 6.0 or 5.5 at 30°C without acid.  $[HA]$  is the concentration of the studied acid form (dissociated, undissociated or total acid concentration).  $\alpha$  is a shape parameter, that reflects the general behavior of microorganisms (Coroller et al., 2005):  $\alpha < 1$  means the curve is upward so bacteria are sensitive to variations at low concentration of acid,  $\alpha = 1$  means the curve is linear so the sensitiveness of bacteria is constant and  $\alpha > 1$  means the curve is downward so bacteria are sensitive to variation at high acid concentrations (close to the MIC). MIC is the Minimum Inhibitory Concentration of the studied acid form.

The second model is from Lambert & Pearson, (2000) (equation 16) :

$$\mu_{max} = \mu_{opt} * \exp \left( - \left[ \frac{[HA]}{MIC / \exp \left( \frac{\ln \left( \frac{NIC}{MIC} \right)}{-e} \right)} \right] \left[ \frac{-e}{\ln \left( \frac{NIC}{MIC} \right)} \right] \right) \quad (16)$$

Where  $\mu_{opt}$  is the *B. weihenstephanensis* KBAB4 specific growth rate in nutrient broth at pH 6.0 or 5.5 at 30°C without acid. [HA] is the concentration of the studied acid form (dissociated, undissociated or total acid concentration). NIC is the Non-Inhibitory Concentration of the studied acid form, i.e., the concentration above which the inhibitor begins to affect growth negatively and MIC is the Minimum Inhibitory Concentration.

### 3.6. Model fitting and statistical analysis

The models were fitted on the square root of the growth rates ( $\mu_{max}$ ) by minimizing the sum of squared errors (lsqcurvefit function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). The square root is recommended to have a homogeneous variance of the residuals. The 95% confidence intervals of the estimated parameters were calculated using the Jacobian matrix (nlparci function, Matlab2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). The goodness of fit of the models was evaluated and compared by the corrected Akaike information criterion (AICc) and the RMSE (root mean square error) (Huet et al, 2004; Scherrer et al, 2009). The lowest RMSE indicates the best-fitting model and a low AICc value indicates the most parsimonious model.

## 4. Results

### 4.1. Effect of the compound form on *B. weihenstephanensis* growth rate

To determine which form of the compound is mainly responsible for the inhibitory activity on *B. weihenstephanensis* growth, experimental  $\mu_{max}$  were first plotted as a function of the undissociated, dissociated and total acid concentrations (examples are shown for acetic and lauric acid in Figure 15). Growth rates at pH 5.5 and 6.0 decrease when acid concentration increases. For one of the acid forms, when increasing the concentration, the inhibition of the growth rate converges toward the same minimum inhibitory concentration whatever the pH, indicating that this form is responsible for growth inhibition independently of pH.

In Fig15.1, the concentration of undissociated acetic acid at which no further growth is observed seems to be the same at pH 5.5 and 6.0 while the concentration of total or dissociated acid limiting growth are different for the two pH values. For lauric acid (Fig15.2), the first concentration (0.15 mM) at which no growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 occurred is the same for pH 5.5 and 6.0 when acid is in its total form, meaning that both forms (undissociated and dissociated) act on bacterial growth within this pH range. The form responsible for growth rate inhibition on *B. weihenstephanensis* KBAB4 is the undissociated form for acetic, lactic, propionic, phenyllactic and caprylic acids. Both the undissociated and dissociated forms of lauric acid affect growth rate inhibition, so to take the two forms into account, we considered that the active form of lauric acid is the total form within this pH range. Concerning monolaurin, its molecular structure, composed of lauric acid covalently bonded to a glycerol molecule, means that no dissociation could occur, so the monolaurin activity is not pH-dependent. We considered that the active form of monolaurin is the total form.

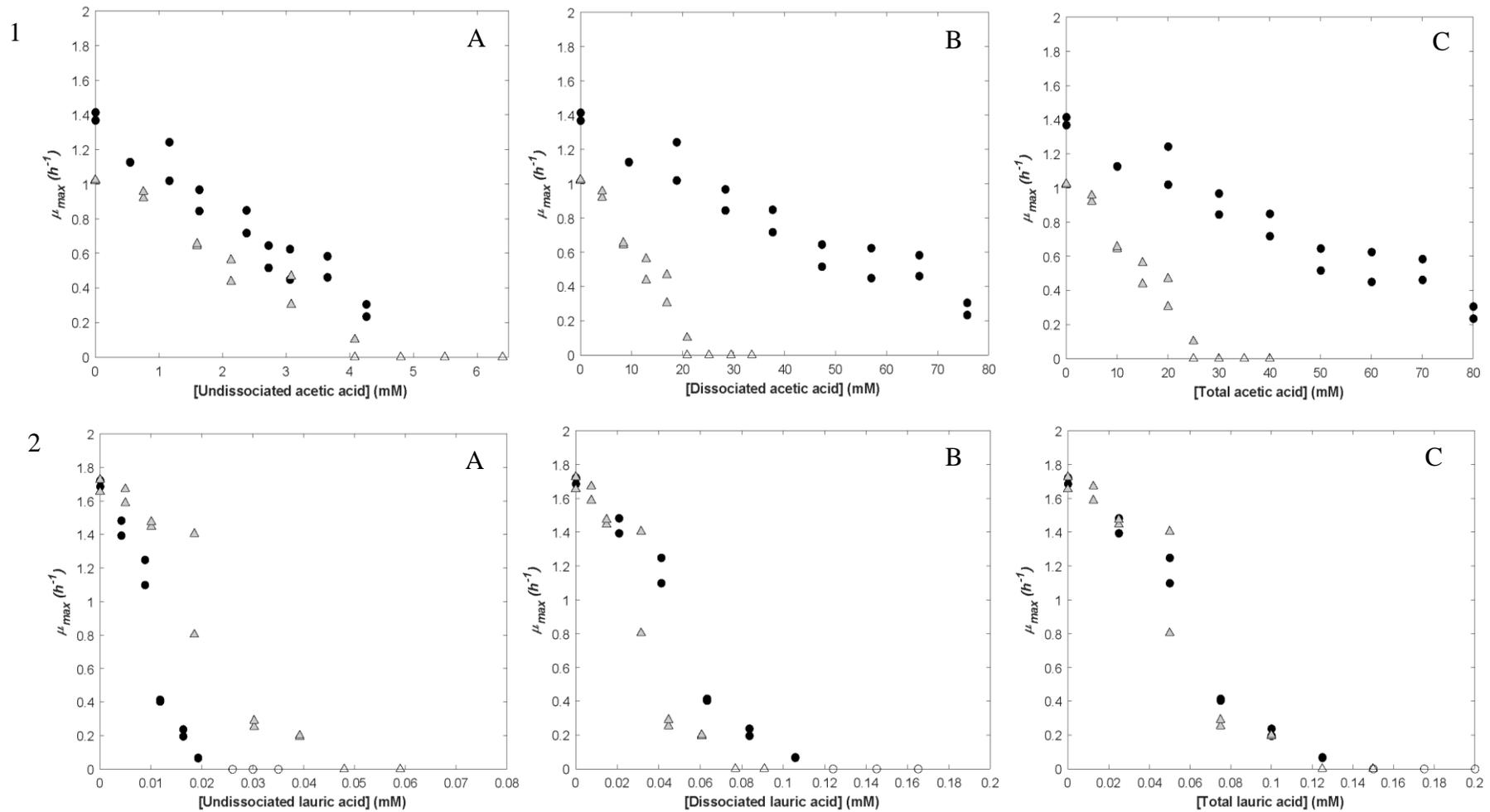


Figure 15 : Experimental growth rates of *B. weihenstephanensis* KBAB4 at pH 6.0 (circle) and pH 5.5 (triangle) as a function of undissociated (A), dissociated (B) and total (C) acid concentration for acetic acid (1) and lauric acid (2).

#### 4.2. Selection of the best-fitting model to describe *B. weihenstephanensis* growth inhibition by organic and fatty acids

The models of Luong (1985) and Lambert & Pearson (2000) were fitted to the data sets of *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth rate as a function of the undissociated acetic (HAce), lactic (HLac), propionic (HPro), phenyllactic (HPLac) and caprylic acid (HCap) concentration or the total lauric acid (Lau) and monolaurin (ML) concentration, at pH 5.5 and pH 6.0. Both models included four parameters:  $\mu_{\text{opt pH6.0}}$ ,  $\mu_{\text{opt pH5.5}}$ , MIC and  $\alpha$  or NIC value. Table 3 reports the parameter estimates, their standard deviation (SE), and the RMSE values, expressing their fitting performance. A linear model derived from the Luong model, where  $\alpha$  is replaced by 1, was also tested on each acid. AICc values of models fitting HAce, HLac and Lau are lower when the shape parameter is not estimated and equal to 1 indicating a linear answer of the strain to undissociated acetic and lactic acid and to total lauric acid concentrations.

The linear model of Luong seems to better describe the behavior of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in the presence of acetic and lactic acid compared to the Lambert and Pearson model. On the contrary, for phenyllactic, caprylic, and lauric acids the model of Lambert and Pearson has a better fitting performance than the Luong model. Indeed, their RMSE values are lower with the Lambert and Pearson than with the Luong model. Those observations were confirmed with AICc values (data not shown) following the same tendency, they are lower with the Luong model for acetic and lactic acid and with the Lambert and Person model for phenyllactic, caprylic and lauric acids. Moreover, although the RMSE values of both models are identical and correct (RMSE = 0.069) as well as the AICc values, the fitting of the *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth rate to undissociated propionic acid concentration is better with the Luong model than the Lambert and Pearson model because of the obtention of higher standard deviations than the estimated parameter itself for the latter (NIC value =  $0.003 \pm 0.004$  mM). The accuracy of using both growth inhibition models to fit the total concentration of monolaurin is questionable. It is observed that the inhibitory effect of monolaurin is stronger at pH 5.5 compared to pH 6.0 (Fig 16G), but a single estimated value of the MIC is retained for both pH levels. This feature is supported by the larger standard deviations of the MIC value than the estimated value (MIC =  $1.11 \pm 2.19$  or  $0.54 \pm 0.85$  mM). Growth/No growth tests were performed in nutrient broth at pH 6.0 - 0.10 mM of total monolaurin, and at pH 5.5 - 0.020 mM. No growth occurred after 5 days at 30°C, supporting this MIC value is overestimated. Figure 16 represents the experimental growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 fitted with

the Luong model for HAce, HLac, and HPro, and fitted with the Lambert and Pearson model for HPLac, HCap and Lau, and ML concentration.

Estimates of optimum growth rates at pH 5.5 range from 0.45 to 1.14 h<sup>-1</sup> (Table 3), due to strain growth variability at pH below 6 (Baril et al., 2012). Moreover, the addition of 0.1% of Tween 80 significantly impacts the growth rate ( $\mu_{\text{opt pH5.5}} = 1.76$  and 1.68 h<sup>-1</sup> for Luong and Lambert and Pearson models respectively), indicating that Tween 80, used for dissolving lauric acid in the medium, affects *B. weihenstephanensis* growth at 30°C in nutrient broth, without lauric acid, as shown in Nielsen et al. (2016). However, a concentration of 0.1% of ethanol 70% has no effect on the optimum growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in nutrient broth, at either pH.

Table 3 : Estimated parameters and their standard deviation of *B. weihenstephanensis* KBAB4 fitted with Luong and Lambert and Pearson models depending on the active concentration form of the acids. <sup>a</sup> RMSE is on a square root scale.

Model	Nb of parameters	Compounds	Nb of data	$\mu_{\text{opt pH6.0}}$ (h <sup>-1</sup> ) (SE)	$\mu_{\text{opt pH5.5}}$ (h <sup>-1</sup> ) (SE)	MIC (mM) (SE)	$\alpha$ (SE)	NIC (mM)	RMSE <sup>a</sup>
Luong (1985)	4	HAce	29	1.37 (0.06)	0.97 (0.05)	5.17 (0.16)	1.00		0.059
		HLac	21	1.37 (0.09)	0.49 (0.06)	2.50 (0.12)	1.00		0.080
		HPro	20	1.31 (0.13)	1.03 (0.11)	4.52 (1.08)	0.12 (0.04)		0.069
		HPLac	26	1.51 (0.15)	1.01 (0.12)	0.37 (0.02)	1.48 (0.37)		0.106
		HCap	29	1.63 (0.17)	0.58 (0.09)	0.13 (0.03)	0.11 (0.03)		0.088
		Lau	24	1.80 (0.17)	1.73 (0.14)	0.11 (0.01)	1.00		0.122
		ML	24	1.48 (0.17)	1.14 (0.14)	1.11(2.19)	0.05 (0.03)		0.088
Lambert & Pearson (2000)	4	HAce	29	1.38 (0.09)	0.97 (0.07)	6.19 (0.55)		0.98 (0.20)	0.060
		HLac	21	1.26 (0.12)	0.45 (0.07)	2.64 (0.30)		0.71 (0.19)	0.084
		HPro	20	1.31 (0.13)	1.02 (0.11)	2.77 (0.61)		0.003 (0.004)	0.069
		HPLac	26	1.43 (0.11)	0.94 (0.09)	0.36 (0.02)		0.16 (0.02)	0.092
		HCap	29	1.65 (0.16)	0.56 (0.07)	0.07 (0.02)		3.7x10 <sup>-5</sup> (3.9x10 <sup>-5</sup> )	0.080
		Lau	24	1.77 (0.13)	1.68 (0.11)	0.11 (0.01)		0.027 (0.004)	0.077
		ML	24	1.49 (0.17)	1.13 (0.14)	0.54 (0.85)		1.2x10 <sup>-8</sup> (8.5x10 <sup>-8</sup> )	0.087

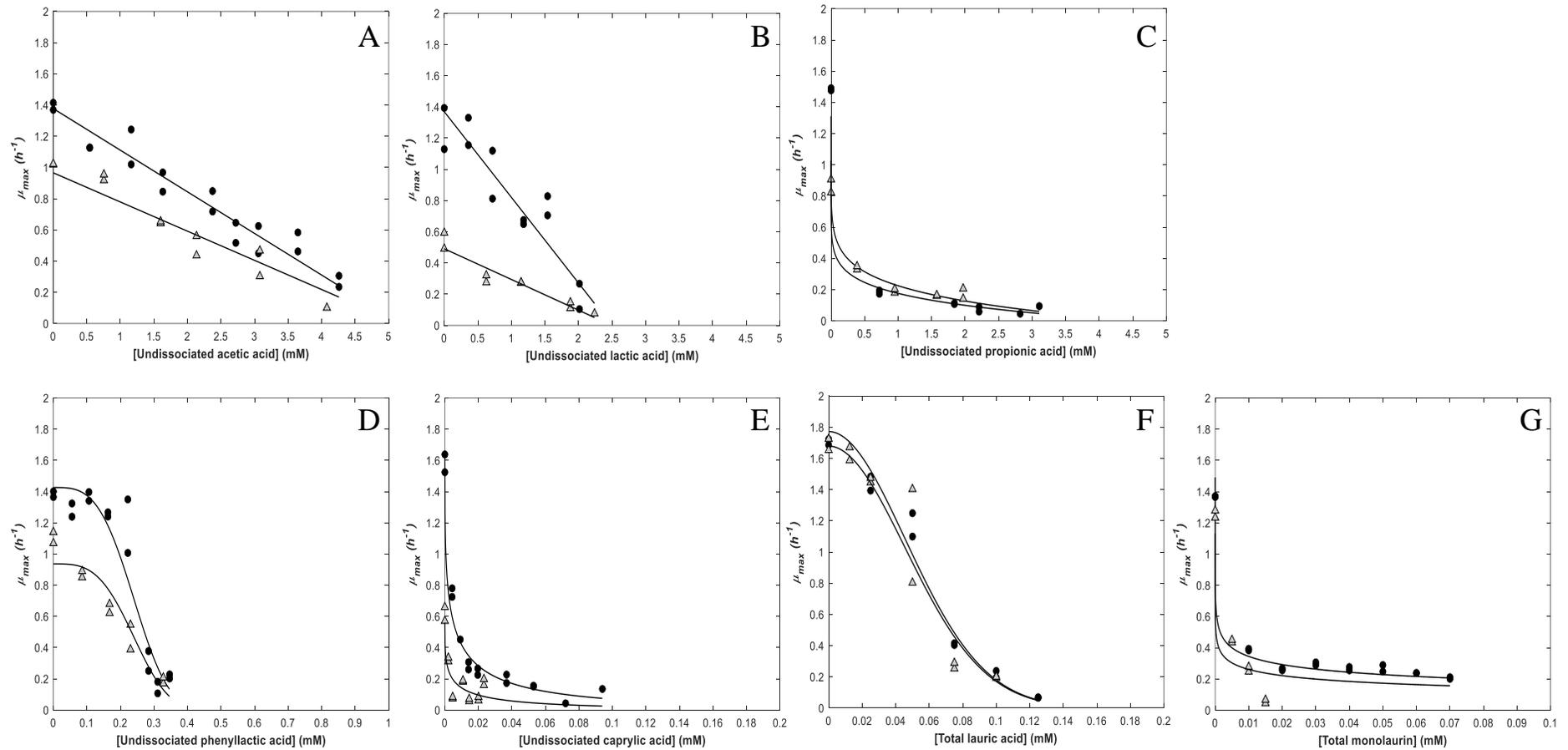


Figure 16 : Experimental growth rates of *B. weihenstephanensis* KBAB4 at pH 6.0 (black circle) and pH 5.5 (grey triangle) as a function of undissociated acetic, lactic, propionic, phenyllactic, and caprylic acids (A,B,C,D,E) or total lauric acid and monolaurin (F,G)

### 4.3. Evaluation of acid inhibitory efficacy according to their physicochemical characteristics

The inhibitory efficacy of acids on *B. weihenstephanensis* growth was evaluated through the determination of two complementary parameters depending on the model used for fitting the growth rate. For each acid, the MIC was quantitatively determined using two models with an associated standard deviation allowing a better estimation than with experimental techniques. A second parameter was also determined, the  $\alpha$  or NIC according to the model, to better characterize the inhibitory efficacy of the acids. Figure 17 represents the MIC estimated by the Luong model (A) and the Lambert and Pearson model (B) for each acid as a function of the corresponding second parameter estimates ( $\alpha$  or NIC). In Fig17A, the two estimated parameters are independent, the MIC value of acids is not linked to the curve shape parameter  $\alpha$ . Working with the Luong model, the acids modeled can be divided into three groups, according to their estimated parameters: (i) compounds with high MIC and relatively sensitive to low concentrations ( $\alpha < 1$  or  $\alpha = 1$ ) (propionic and acetic acid), (ii) compounds with low MIC and relatively sensitive to high concentrations ( $\alpha > 1$  or  $\alpha = 1$ ) (phenyllactic, lactic, and lauric acid), and (iii) compounds with low MIC and highly sensitive to low concentrations ( $\alpha < 1$ ) (caprylic acid and monolaurin). Working with the model of Lambert and Pearson (Fig 17B), the MIC and NIC parameter values are correlated: when the MIC value of acids decreases, so does the NIC value. The tested acids can be represented by three different groups, modeled by the Lambert and Pearson model: (i) low efficacy acids = high MIC and NIC values (acetic and lactic acid), (ii) moderate efficacy acid = high MIC but low NIC value (propionic acid), and (iii) high efficacy acids = low MIC and NIC values (phenyllactic, caprylic, lauric and monolaurin). Depending on the model chosen and the correlation between the estimated parameters, the inhibitory efficacy of an acid is expressed differently. For Luong, an effective acid is one with a low MIC, the curve shape parameter is less significant. Whereas, according to the Lambert and Pearson model, the inhibitory activity of an acid is reflected by a low MIC and a low NIC value.

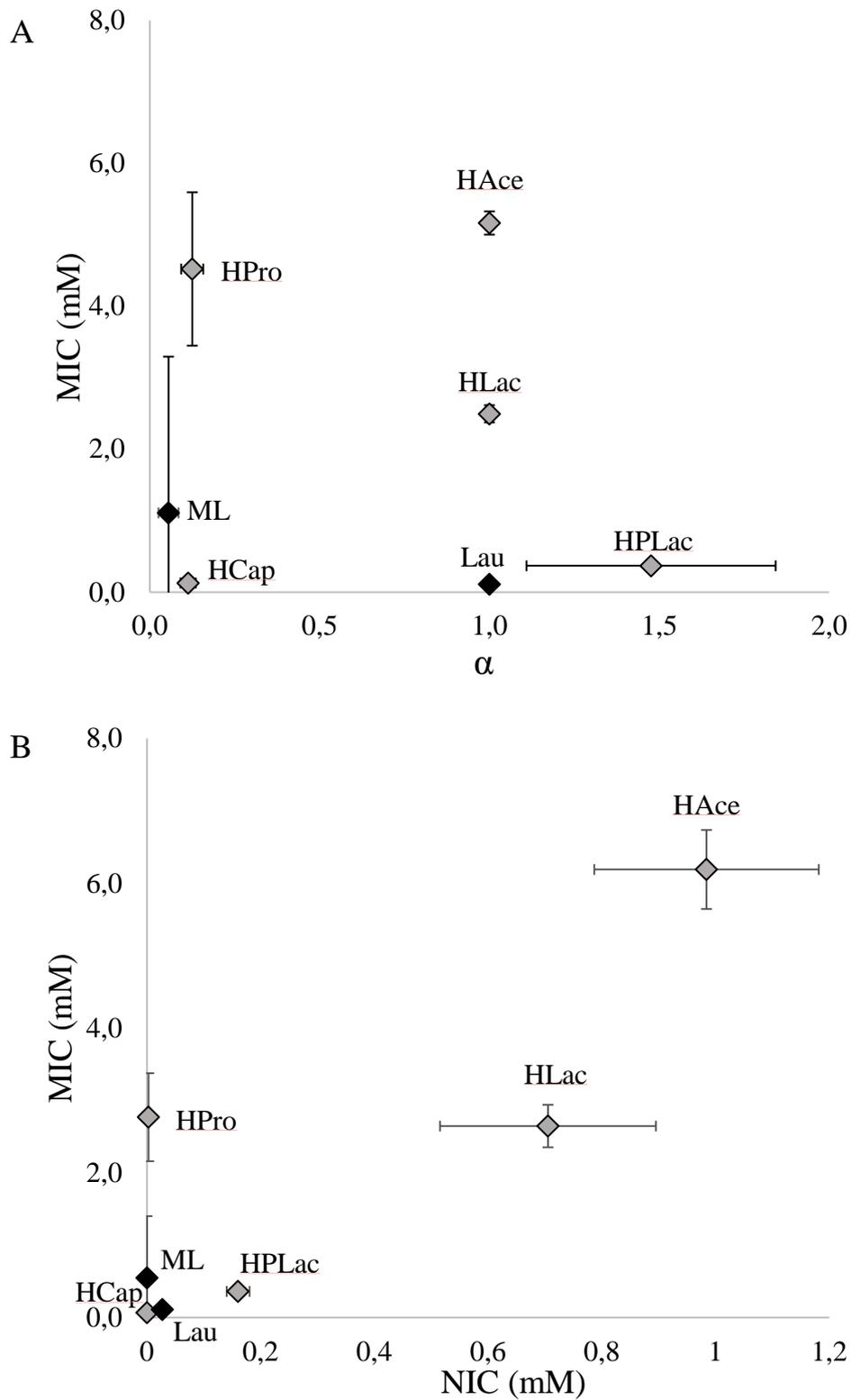


Figure 17 : Estimated MIC as a function of alpha (Luong model, A) or as a function of NIC (Lambert & Pearson model, B) for the undissociated (grey) or total (black) form of acids.

## 5. Discussion

In the present study, the inhibitory efficacy against *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth of seven antimicrobial compounds was evaluated using two different models. MIC values were estimated depending on the inhibitory acid forms, for each compound. The undissociated form of short or medium-chain carboxylic acids is responsible for *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth inhibition (i.e. HAc, HLac, HPro, HPLac, and HCap). These results are in agreement with the literature (Lambert & Stratford, 1999; Presser et al., 1997) and confirm that their inhibitory action would increase with decreasing pH depending on their dissociation constant pKa. Indeed, decreasing pH would imply a higher proportion of the undissociated acid form in the environment which will easily diffuse across the cell membrane and then dissociate inside the cell causing a decrease in the intracellular pH and preventing bacterial growth (Theron & Lues, 2011). However, the results show that for long-chain fatty acids such as lauric acid, the forms responsible for the inhibitory effect are both the undissociated and the dissociated forms of the acid, i.e., the total form (Fig15.2). These results mean that lauric acid could be an efficient antimicrobial agent whatever the pH of the environment. In this trial, at pH 6.0 and 5.5, the concentration of undissociated lauric acid is 1.5 or 5 times smaller respectively than the dissociated concentration. Most studies do not separate the specific inhibitory effect of dissociated and undissociated forms of lauric acid or other fatty acid derivatives on a microorganism (Mbandi et al., 2004; Nobmann et al., 2009). As an exception, a few studies have demonstrated that sorbic, benzoic acid, p-coumaric and ferulic acid also show an inhibitory efficacy of the dissociated form (Eklund, 1983, 1985; Pernin et al., 2019). The cell membrane is poorly permeable to dissociated acid, which is therefore transported by a membrane carrier (Kashket, 1987; Narendranath et al., 2001). Sofos et al. (1986) proposed that inhibition of bacterial growth by dissociated sorbic acid may result from the alteration of cell membranes, inhibition of transport systems and key enzymes, or the creation of a proton flux into the cell. Moreover, concerning monolaurin, as monoglycerides are pH-independent, they do not dissociate and are equally soluble in the tested pH range. The growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 decreases when the concentration of total monolaurin increases at pH 5.5 ( $\mu_{\max} = 0.055$  for 0.015 mM of monolaurin) but at pH 6.0 growth rates are stable ( $\bar{\mu}_{\max} \sim 0.255 \text{ h}^{-1}$ ) for concentrations of total monolaurin ranging from 0.02 to 0.07 mM, indicating that the antibacterial effect of monolaurin is stronger at pH 5.5 than at pH 6.0. This feature, confirmed by Wang & Johnson (1992), is important for choosing environmental conditions for the application of monolaurin as an antimicrobial agent. Wang et al. (2020) showed that

monoglycerides killed gram-positive bacteria by disintegration of the cell membrane leading to a leakage of cellular components.

Two models were then used to fit the growth rates of *B. weihenstephanensis* KBAB4 to the inhibitory form of the acids and they gave different adjustment performances depending on the acid chain length (Table 3). Undissociated weak organic acids (HAce, HLac, and HPro) are better fitted with the Luong model, while long carbon chain acids (HPLac, HCap, and Lau) have a better adjustment with the Lambert and Pearson model on growth rate inhibition of *B. weihenstephanensis* KBAB4 (Fig16). Thus, the MIC of undissociated acetic, lactic, and propionic acids were estimated with the model of Luong and are equal to 5.17, 2.50, and 4.52 mM respectively. In the literature, Biesta-Peters et al. (2010) also used the Luong model to describe the effect of undissociated acid on the maximum specific growth rate of *B. cereus* F4810/72 and obtained similar values for those three acids (MIC = 7.46, 2.58, and 4.59 for acetic, lactic and propionic acid respectively). Higher antibacterial activities of acetic and propionic acids would be expected, as reported in the literature, compared to lactic acid (Antone et al., 2023; Tirloni et al., 2021), because of their higher pKa value (4.76 and 4.75 vs 3.86 for lactic acid). Indeed, although the concentration of undissociated acid at pH 6.0 and pH 5.5 are about 7.5 and 6.8 times lower than concentrations of acetic and propionic acid, it has a greater inhibitory activity. The pKa of these three organic acids seem not to be the only factor responsible for their inhibiting effect on *B. weihenstephanensis* KBAB4, because this effect does not follow the same order as their pKa values. The difference could be due to the presence of the alcohol group in the molecular structure of lactic acid, which can affect biological processes. We can hypothesize that an undissociated form of lactic acid penetrating through the cell membrane is not the only mechanism responsible for the growth inhibition of *B. weihenstephanensis* KBAB4. The antimicrobial effect of lactic acid could also be caused by the leakage of intracellular K<sup>+</sup> and damage to membrane permeability and integrity (Wang et al., 2014) as well as the inhibition of phosphorus transport or the disturbance of ribosome functions leading to cell death in the *B. cereus* strain, as related in Ning et al. (2021). However, lactic acid has a higher MIC value than phenyllactic acid on *B. weihenstephanensis* KBAB4 (MIC<sub>HPLac</sub> = 0.036 mM). The MIC value obtained for phenyllactic acid is similar to that against other pathogens such as *B. cereus* or *E. coli* in previous studies (Ning et al., 2017, 2021). Thus, the addition of a phenyl group on a carboxylic chain leads to a greater antibacterial activity.

The lowest MIC values estimated, against *B. weihenstephanensis* KBAB4, are obtained with undissociated caprylic and total lauric acid, both fatty acids (MIC<sub>HCap</sub> = 0.07 mM and MIC<sub>Lau</sub>

= 0.11 mM with the Lambert and Pearson model). The MIC value of lauric acid is similar to literature values (Ababouch et al., 1994; Chaibi et al., 1996; Zhang et al., 2009) but the MIC value of caprylic acid is about 5 to 50 times higher in previous studies against the *B. cereus* strain (Batovska et al., 2009; Hsiao & Siebert, 1999). This is probably due to the MIC assessment method used in these publications, which are less accurate than modelling and to the fact that the active form and pH are not specified, making comparison difficult. Moreover, in the literature, monoglycerides have greater activity against microorganisms compared to their corresponding fatty acids (Nobmann et al., 2009; Schlievert & Peterson, 2012), but in our study lauric acid has a lower MIC than monolaurin against *B. weihenstephanensis* KBAB4 ( $MIC_{ML}=0.54$  mM). This difference is due to the poor fit of the model with monolaurin data.

These two models allowed us not only to estimate the MIC value for each acid but also a second parameter, to define their inhibitory efficacy. The second parameter is the curve shape parameter  $\alpha$  for the Luong model or the NIC value for the Lambert and Pearson model. These parameters are also important factors in selecting an effective antimicrobial compound because they consider the shape of the inactivation curve. Indeed, a bacterial strain can produce different shapes of inhibition curve, as seen in Fig 17, indicating more pronounced heterogeneity of growth rate response according to the intensity of the stress. By estimating  $\alpha$ , the Luong model distinguishes the inhibitor sensitivity to low, constant or high concentrations resulting in convex (Fig16C), linear (Fig16A, B) or concave inhibition curves. The Lambert and Pearson model can describe a more or less pronounced sigmoidal shape (Fig16D, E, F, G) that may reflect the strain's non-sensitivity to variation of low concentrations, above a threshold concentration of inhibitor. Thus, the two models can highlight different mechanisms of action of an antibacterial compound within its environment considering more than just the MIC value. For example, in our study, propionic acid has a high MIC but is highly effective at the lowest concentrations tested for inhibiting *B. weihenstephanensis* KBAB4 growth. However, depending on the correlation or non-correlation between the MIC value and the second estimated parameter, effective acids were defined for both models: (i) an acid with a low MIC value only, such as HLac, HPLac, HCap, Lau, and ML for the Luong model and (ii) an acid with low MIC and NIC values such as HPLac, HCap, Lau and ML for the Lambert and Pearson model (Fig17). Figure 17 also highlights that compounds with longer chain length displayed a stronger effect on growth inhibition than the short chain compounds. This effect is largely influenced by the lipophilic character of the compound, defined by the octanol-water partition coefficient ( $\log P$ ). Indeed, increasing the number of carbons on the carbon chain induces a more hydrophobic

compound (Table 2), which leads to a stronger tendency to accumulate in the lipid membrane (Stratford & Eklund, 2003). The fact that the most lipophilic compounds (phenyllactic, caprylic and lauric acids) displayed lower MIC values indicates that their inhibitory activity can be influenced by both their acidity and their lipophilic character (van Melis et al., 2012) suggesting an additional inhibitory role as a membrane active compound (Stratford & Anslow, 1998).

Further experiments should be conducted on different strains of the group *B. cereus* to assess sensitivity variability to organic acids, to confirm the relationship between the inhibitory efficiency of an acid and its physicochemical properties. Park et al. (2021) already showed that there was no significant difference in the MIC values of acetic acid against seven isolates of psychrotolerant *B. cereus* group strains. Additionally, when these acids are integrated into food products, the complexity of the environment, such as structure, multiphase systems, interactions with other components, may influence their effectiveness (Weiss et al., 2015).

## 6. Conclusion

The inhibitory efficacy of six organic acids (acetic, lactic, propionic, phenyllactic, caprylic and lauric acid) and monolaurin against the growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 was assessed in a liquid medium, using predictive models. This study shows that the predictive models used help explain the mode of action of the acid in its environment thanks to the MIC value but also by the curve shape parameter  $\alpha$  and NIC value estimation. Those two parameters are important and not necessarily correlated with the MIC.

On one hand, the active form of a compound is associated with its carbon chain length, with short and medium chain monocarboxylic acids inhibiting bacterial growth through their undissociated form. These acids are strongly influenced by the pH of the environment and their pKa to exhibit antimicrobial effects. On the other hand, lauric acid and monolaurin are not affected by pH since their total form is responsible for the inhibition, in the tested conditions. Furthermore, increasing the number of carbons in the molecular structure or incorporating an aromatic group reduces the MIC values of the molecule and thus increases its antibacterial efficiency, emphasizing the role of the chemical structure and the lipophilicity. The physicochemical parameters of a compound (chemical structure, constant dissociation, lipophilicity) and the environmental pH are important factors in selecting an efficient antimicrobial agent, along with the choice of a suitable model for predicting its behavior in inhibiting microorganism growth.

## **7. Acknowledgements**

This work is part of A. Dutoit's PhD thesis which is financially supported by the "Conseil Régional de Bretagne" and "Quimper Bretagne Occidentale". The authors wish to thank our partners which also support the IGAB project, the "Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière" (CNIEL, France). This work was carried out as part of the UMT ACTIA 19.03 ALTER'iX which brings together ADRIA Food Expertise and the "Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne" (LUBEM, Univ Brest, INRAE).

## 8. References

- Ababouch, L. H., Bouqartacha, F., & Busta, F. F. (1994). Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiology*, *11*(4), 327–336. <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1037>
- Adams, M. R., & Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, *23*(3), 287–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00581.x>
- Antone, U., Ciprovica, I., Zolovs, M., Scerbaka, R., & Liepins, J. (2023). Propionic Acid Fermentation—Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties. *Fermentation*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation9010026>
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2012). Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus spp.* as a function of temperature, pH and aw. *Food Microbiology*, *32*(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.011>
- Batovska, D. I., Todorova, I. T., Tsvetkova, I. V., & Najdenski, H. M. (2009). Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: Individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology*, *58*(1), 43–47.
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. (2010). Comparing nonsynergistic gamma models with interaction models to predict growth of emetic *Bacillus cereus* when using combinations of pH and individual undissociated acids as growth-limiting factors. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(17), 5791–5801. <https://doi.org/10.1128/AEM.00355-10>
- Buňková, L., Buňka, F., Janiš, R., Krejčí, J., Doležálková, I., Pospíšil, Z., Růžička, J., & Tremlová, B. (2010). Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Vet Brno*, *80*, 29–39. <https://doi.org/10.2754/avb201180010029>
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R. G., Carballeira, N. M., & Sanabria-Ríos, D. J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in Lipid Research*, *82*(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>
- Chaibi, A., Ababouch, L. H., & Busta, F. F. (1996). Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*, *59*(7), 716–722. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.7.716>
- Churchward, C. P., Alany, R. G., & Snyder, L. A. S. (2018). Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(5), 561–570. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467875>
- Coroller, L., Guerrot, V., Huchet, V., Le Marc, Y., Mafart, P., Sohier, D., & Thuault, D. (2005). Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, *100*(1–3), 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.014>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>

- Eklund, T. (1983). The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3), 383–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1983.tb02632.x>
- Eklund, T. (1985). Inhibition of microbial growth at different pH levels by benzoic and propionic acids and esters of p-hydroxybenzoic acid. *International Journal of Food Microbiology*, 2(3), 159–167. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90035-2)
- European Food Safety Authority. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, 14(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- Guinebrière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851–865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>
- Hsiao, C. P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3), 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00012-4)
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Kabara, J. J., Swieczowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemistry*, 2(1), 23–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00292-9>
- Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews*, 46, 233–244. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02463.x>
- Lambert, R. J., & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157–164. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00646.X>
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
- Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Ségurens, B., Dossat, C., Land, M. L., Broussolle, V., Brillard, J., Guinebrière, M. H., Sanchis, V., Nguen-the, C., Lereclus, D., Richardson, P., Wincker, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D., & Sorokin, A. (2008). Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 171(2), 236–249. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.03.003>
- 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(2–3), 219–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00640-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00640-7)
- Liu, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 106–112.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>

- Luong, J. H. T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 27(3), 280–285. <https://doi.org/10.1002/BIT.260270311>
- Mbandi, E., Brywig, M., & Shelef, L. A. (2004). Antilisterial effects of free fatty acids and monolaurin in beef emulsions and hot dogs. *Food Microbiology*, 21(6), 815–818. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.12.005>
- Narendranath, N., Thomas, K., & Ingledew, W. (2001). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 171–177. <https://academic.oup.com/jimb/article/26/3/171/5990600>
- Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
- Ning, Y., Fu, Y., Hou, L., Ma, M., Wang, Z., Li, X., & Jia, Y. (2021). iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of synergistic antibacterial mechanism of phenyllactic acid and lactic acid against *Bacillus cereus*. *Food Research International*, 139(April 2020), 109562. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109562>
- Ning, Y., Yan, A., Yang, K., Wang, Z., Li, X., & Jia, Y. (2017). Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms. *Food Chemistry*, 228, 533–540. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.112>
- Nobmann, P., Smith, A., Dunne, J., Henahan, G., & Bourke, P. (2009). The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria spp.* and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.008>
- Park, K. M., Kim, H. J., Choi, J. Y., & Koo, M. (2021). Antimicrobial effect of acetic acid, sodium hypochlorite, and thermal treatments against psychrotolerant *Bacillus cereus* group isolated from lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Foods*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/foods10092165>
- Pernin, A., Guillier, L., & Dubois-Brissonnet, F. (2019). *Inhibitory activity of phenolic acids against Listeria monocytogenes: Deciphering the mechanisms of action using three different models*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.010>
- 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(6), 2355–2360.
- Rosso, L., Zuber, E., Pichat, C., & Flandrois, J. P. (1997). Simple relationship between acid dissociation constant and minimal pH for microbial growth in laboratory medium. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 75–81.
- Schlievert, P. M., & Peterson, M. L. (2012). Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040350>
- Seo, Y., Sung, M., Hwang, J., & Yoon, Y. (2023). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Propionic Acid, Sorbic Acid, and Benzoic Acid against Food Spoilage Microorganisms in Animal Products to Use MIC as Threshold for Natural Preservative Production. *Food Science of Animal Resources*, 43(2), 319–330. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e79>

- Sofos, J. N., Pierson, M. D., Blocher, J. C., & Busta, F. F. (1986). Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. *International Journal of Food Microbiology*, 3(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(86\)90036-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(86)90036-X)
- Stratford, M., & Anslow, P. A. (1998). Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic “weak acid preservative.” *Letters in Applied Microbiology*, 27(4), 203–206. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00424.x>
- Stratford, M., & Eklund, T. (2003). Organic acids and esters. In *Food Preservatives* (pp. 48–84). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_4)
- Theron, M. M., & Lues, J. F. R. (2011). *Organic acids and Food Preservation*.
- Tirloni, E., Bernardi, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., & Stella, S. (2021). Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *Lwt*, 151(July), 112170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112170>
- van Melis, C. C. J., Almeida, C. B., Kort, R., Nierop Groot, M. N., & Abee, T. (2012). Germination inhibition of *Bacillus cereus* spores: Impact of the lipophilic character of inhibiting compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.006>
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., & Cui, M. (2014). Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control*, 46, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.024>
- Wang, L., & Johnson, E. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(2), 624–629.
- Wang, W., Wang, R., Zhang, G., Chen, F., & Xu, B. (2020). In Vitro Antibacterial Activities and Mechanisms of Action of Fatty Acid Monoglycerides against Four Foodborne Bacteria. *Journal of Food Protection*, 83(2), 331–337. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-259>
- Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (2015). The antimicrobial paradox: Why preservatives lose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, 4(May), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>
- Zhang, H., Wei, H., Cui, Y., Zhao, G., & Feng, F. (2009). Antibacterial interactions of monolaurin with commonly used antimicrobials and food components. *Journal of Food Science*, 74(7). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01300.x>



---

## **Chapitre 3 :**

L'exposition à une émulsion H/E et la concentration en acides impactent l'inhibition de croissance et la culturabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4

---

Dans le chapitre précédent (Chapitre 2), les propriétés inhibitrices de composés inhibiteurs sélectionnés ont été caractérisés, par modélisation, envers la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans un milieu nutritif liquide et mises en relation avec leur caractéristiques physico-chimiques (structure, pKa, log P). L'efficacité inhibitrice des acides acétique, lactique, propionique, phényllactique, et caprylique est largement influencée par le pH de l'environnement et leur pKa. Leurs propriétés antimicrobiennes sont dépendantes de leur forme indissociée, contrairement à l'acide laurique et à la monolaurine pour lesquels la forme totale de l'acide est responsable de l'inhibition de la croissance bactérienne. La structure chimique et la lipophilicité (log P) des acides jouent également un rôle important dans les propriétés inhibitrices des acides : une augmentation du nombre de carbone sur la chaîne carbonée ou l'ajout d'un groupement fonctionnel entraînent une diminution du coefficient de partage (log P) de la molécule et est lié à la détermination d'une CMI plus faible pour ces acides.

Les caractéristiques physico-chimiques de composés inhibiteurs impactent donc leurs propriétés inhibitrices dans un milieu nutritif simple, mais qu'en est-il au sein d'un milieu biphasique, tel qu'une émulsion Huile dans Eau ? La présence d'une phase grasse dispersée sous forme de gouttelettes au sein du bouillon nutritif influence-t-elle le comportement et l'activité inhibitrice de ces acides aux caractéristiques physico-chimiques différentes ?

Le chapitre 3 a donc pour objectif de comparer l'inhibition de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 au sein d'un milieu nutritif simple et d'un milieu biphasique modèle, une émulsion H/E, à pH 6,0 et pH 5,5, par quatre acides organiques présentant des propriétés physico-chimiques variées (structure, pKa, log P). Ces quatre acides organiques sont l'acide acétique, l'acide lactique, l'acide caprylique et l'acide laurique. La dynamique de croissance de *B. weihenstephanensis* au sein des bouillon nutritifs et des émulsions H/E modèles en présence de concentrations en acides a été déterminée par énumération sur milieu BHA ainsi que par cytométrie en flux afin d'évaluer la viabilité cellulaire de la souche directement au sein du système biphasique.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique qui a été soumis pour publication dans *Applied and Environmental Microbiology*.

L'élaboration d'une émulsion H/E stable et utilisée en tant que système modèle de matrices alimentaires, a nécessité une justification de sa formulation et la vérification de l'effet des différents composants du système (phase aqueuse, phase grasse, émulsifiants) sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur les activités inhibitrices des composés sélectionnés. Ces travaux sont présentés dans une partie « Focus » à la suite du chapitre.

## **Article 2: Oil-in-water emulsion and acid concentrations impact *B. weihenstephanensis* KBAB4 inhibition and culturability**

---

Article soumis dans *Applied and Environmental Microbiology*

Agathe Dutoit<sup>a</sup>, Clément Trunet<sup>a</sup>, Nicolas Decourcelle<sup>a</sup>, Anne-Gabrielle Mathot<sup>a</sup>, Louis Coroller<sup>a#</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, F-29000 Quimper, France

Running head: Oil-in-water emulsion impacts *B. weihenstephanensis* KBAB4 cell culturability on BHA

#Address correspondence to: L. Coroller, louis.coroller@univ-brest.fr

Keywords:

Growth inhibition, acids, non-culturability, flow cytometry, viability, VBNC, *Bacillus cereus* group

Highlights:

- Bacterial growth in O/W emulsion coincides with loss of culturability on BHA medium.
- The loss of culturability is followed by a sudden rise in CFU on BHA medium.
- Intact membrane vegetative cells are in the majority in an oil-in-water emulsion
- Adding anti-ROS agents restores strain ability to recover on BHA.
- Decreasing pH increases lag time in nutrient broth and inactivation time in emulsion.

## 1. Abstract

Organic acids have long been used to limit microbial growth and preserve food products from spoilage and pathogens. However, the food complexity can affect the efficiency of preservatives in inhibiting bacterial growth. The inhibitory activity of acetic, lactic, caprylic and lauric acid in nutrient broth and in a model food system, i.e. an oil-in-water (O/W) emulsion at two pH levels, were compared using the plate count method. The fate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells incubated in O/W emulsions revealed a loss of culturability on BHA medium, occurring at different times according to the tested conditions. Cell viability was assessed through flow cytometry measurements which confirmed that a large majority of cells possessed an intact membrane when incubated in O/W emulsion, despite only 3% being able to recover on BHA. Decreasing the pH of the emulsions delayed the time at which cells lost their culturability as well as the time at which it was restored. Moreover, using lactic acid in the emulsions led to strain recovery on BHA, whereas using acetic acid seemed to increase the physiological state heterogeneity (time scattering), and using lauric acid seemed to decrease the proportion of non-culturable cells. The culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells incubated in an O/W emulsion without acid has been restored using other recovery media, highlighting ROS involvement and limited strain catalase activity in the recovery ability.

### Importance

When comparing growth inhibition of organic acids in nutrient broth and a model food matrix, an O/W emulsion led to unexpected kinetics in the emulsified system characterized by a decrease followed by a sudden rise in cell concentration enumerated on BHA. The cell viability was monitored by flow cytometry in the emulsion, highlighting the loss of culturability of the strain on BHA. A model was suggested describing i) the maximum proportion of cells that are unable to grow on BHA, ii) the time at which loss of culturability occurred and its dispersion and iii) the time at which strain culturability was restored. The major insights of this study lie in the understanding and simulation of this loss of culturability due to cell exposure to complex matrices and the use of BHA medium for cell enumeration.

## 2. Introduction

Organic acids including fatty acids are commonly employed as antimicrobials to guarantee the safety of food items (1, 2). Naturally occurring or naturally produced compounds in food have gained popularity in the food industry, as they meet consumer expectations for more transparency and naturalness in their daily food (3, 4). While the inhibitory effects of organic acids against various foodborne pathogens have been well-established in liquid laboratory media (5–8), there is a growing demand to optimize their utilization in food and to assess their inhibitory potential in these complex environments.

Foods are complex systems composed of different microenvironments with distinct physicochemical properties, such as oil-in-water emulsion (O/W emulsion). The chemical composition, structure, and storage conditions of food play a significant role in microbial growth and survival (9). The impact of the composition and structure of an O/W emulsion on bacterial growth has long been studied (10–12) and it is recognized that microbial growth occurs in the aqueous phase of an O/W emulsion in planktonic form (9). The intrinsic environment of an O/W emulsion is therefore important for a microorganism because it allows bacterial mobility but also transport of nutrients to the cell and diffusion of metabolites into the medium, which can all influence bacterial growth (13). Indeed, the physicochemical properties of inhibiting acids, and their interactions with components of the food matrix, can modify their distribution and thus their ability to inhibit microbial development in an oil-in-water emulsion (14, 15). Léonard-Akkari et al., (2018) showed that the efficiency of hexanoic acid in inhibiting bacterial germination and outgrowth decreases as the concentration of the oil phase increases. This decline is attributed to the lipophilic character of hexanoic acid. On the other hand, Kadri et al. (2017) found that the inhibitory efficiency of caprylic acid in oil-in-water emulsion, against four bacterial species, is determined by the concentration of surfactant rather than the oil droplet size. Few studies have been performed on organic acid activity in O/W emulsion against spore-forming bacteria such as *Bacillus cereus* group species, although they are necessary to better understand the impact of the physicochemical properties of acid on their antimicrobial activity in a complex matrix.

The main objective of this study was to evaluate the inhibitory activity of acetic, lactic, caprylic, and lauric acids on *B. weihenstephanensis* KBAB4, reclassified as *B. mycoides* KBAB4 (18), in nutrient broth and a complex system, i.e. O/W emulsion, chosen to represent a model food matrix. These four acids were selected because they are characterized by a wide range of different physicochemical properties: chemical structure, dissociation constant, and

partition coefficient (log P). The fate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in nutrient broth or model O/W emulsion at 30°C was monitored using the plate count method for various acid additions and by flow cytometry.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Bacterial strain and spore production**

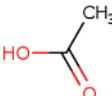
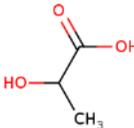
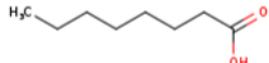
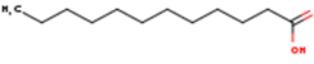
*B. weihenstephanensis* KBAB4, reclassified as *B. mycoides* KBAB4 (18), (INRAE, Avignon, France) was isolated from forest soil. The strain (in the form of vegetative cells) was stored at -80 °C, as 1 mL aliquots in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Condalab, Madrid, Spain) diluted in 20% glycerol (v/v). A 1 mL aliquot was inoculated in 100 mL BHI broth contained in 250 mL flasks and incubated for 8 h at 30°C, the optimal growth temperature of the strain. Flasks were shaken at 100 rpm. Then, 1 ml of this culture was diluted in 100 ml BHI broth and was incubated overnight. The final cell concentration of the second culture was approximately  $1 \times 10^8$  CFU/ml.

Sporulation of *B. weihenstephanensis* KBAB4 was performed in a two-step process. First, 100 ml of BHI broth was inoculated with 0.1 ml of the overnight preculture of *B. weihenstephanensis* KBAB4 and incubated at 30°C. After 6h, cells were harvested by centrifugation at 6000 g for 15 min at 12°C and then resuspended in 100 ml of sporulation mineral buffer (SMB) as described in (43). Spores were collected in 5 ml of sterile distilled water and stored at 4°C. The final concentration of the spore suspension was approximately  $1 \times 10^8$  spores/ml and corresponded to the number of cells recovering on BHA at 30°C after a 10-minute heat treatment at 80°C.

#### **3.2. Tested acids and solution preparation**

Two weak acids and two fatty acids were studied as antimicrobial compounds: acetic acid (99% pure), lactic acid (90% pure), caprylic acid (98% pure), and lauric acid (98% pure, all the acids were purchased from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). The tested acids were chosen for their physicochemical properties: their hydrophobicity (logP), their ability to dissociate (pKa), and their carbon chain length (molar mass), as shown in Table 4. Stock solutions of 1 M acetic and lactic acids were prepared in distilled water. Caprylic acid was prepared in ethanol 70% to a final concentration of 1 M. The final ethanol concentration in the medium had no impact on bacterial growth. Lauric acid was mixed at 55°C in Tween 80 (0.1% p/v), then added to the nutrient broth to reach a final concentration of 0.075 mM.

Table 4 : Physicochemical properties of acetic, lactic, caprylic and lauric acid and their concentrations in the medium.

Name (CAS)	Chemical formula	Molecular structure	logP	pKa	Molar mass (g/mol)	Medium condition		
						pH	Total form (mM)	Undissociated form (mM)
Acetic acid (64-19-7)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		-0.21	4.76	60.05	5.5	20	3.000
						6.0	60	3.000
Lactic acid (79-33-4)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		-0.72	3.86	90.08	5.5	80	1.800
						6.0	250	1.800
Caprylic acid (124-07-2)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		3.05	4.89	144.21	5.5	0.090	0.020
						6.0	0.250	0.020
Lauric acid (143-07-7)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		4.20	5.30	200.32	5.5	0.075	0.030
						6.0	0.075	0.012

### **3.3. Emulsion preparation**

The aqueous phase of the emulsion consisted of nutrient broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) supplemented with 3% (w/v) Tween 80. Appropriate amounts of stock solutions of acetic, lactic, and caprylic acid, were added to the aqueous phase to obtain a final concentration of 3.000 mM, 1.800 mM, and 0.020 mM of undissociated acetic, lactic, and caprylic acid. The final concentration of lauric acid was equal to 0.075 mM of total acid. These concentrations of undissociated and total acids were selected in accordance with a previous study (44), because they are below the MIC value against *B. weihenstephanensis* KBAB4 so growth can be visualized but growth inhibition is caused in nutrient broth of about 40%. Aqueous phases were then adjusted to pH 5.5 or 6.0 using HCl or NaOH 1 M. The oil phase of the emulsion consisted of hexadecane (99% pure) supplemented with 3% (w/v) Span 80. The oil and aqueous phases were filtered through a 0.22 µm filter (Stericup, Millipore). Then, 50 ml of the aqueous phase was mixed with 50 ml of the oil phase using a 19 mm diameter sonication probe for 1 min at 60% amplitude with a Branson 450W-20kHz digital sonifier. A temperature probe and an ice bath were added to control temperature variation in the medium during sonication. The temperature was recorded below 40°C for each sample.

### **3.4. Particle size determination and stability**

The emulsion particle size distributions were measured by laser granulometry with a Malvern MS3000, in 0.1% SDS dispersant at 2000 rpm. The mean volume diameters and the particle size dispersions were monitored for 24 h after emulsion preparation with storage at 30°C which was the temperature used for the microbial assay. The optical parameters selected were: oil globule absorbance of 0.01, dispersed phase refractive index of 1.53, dispersant liquid refractive index of 1.33 and laser obscuration between 5% and 15%.

The emulsion stability (flocculation, creaming, clarification) was monitored by multiple light scattering with a Turbiscan (Formulation, France). The destabilization phenomena were monitored for 10 days at 30 °C, without bacteria. Particle size and stability measurements were performed in triplicate for the oil-in-water emulsion without inhibitors at pH 6.0 and 5.5 and oil-in-water emulsions with acids at pH 6.0.

### **3.5. Enumeration of viable cells in nutrient broth and emulsion medium with plate counting**

To study the growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in O/W model emulsions and their corresponding nutrient broth at pH 6.0 and 5.5, media were inoculated with a heat-treated (10 min/80°C) suspension of spores to reach a final concentration of  $10^5$  CFU/ml in 100 ml nutrient broth or emulsion. The same concentrations of acids were present in the oil-in-water emulsions and the nutrient broth (Table 4). Erlenmeyer flasks were incubated at 30°C with 110 rpm stirring for a maximum of 35 h. Viable cells were enumerated at regular intervals by collecting 150 µl of nutrient broth or 300 µl of emulsion (ratio 50/50) in 1350 µl of 9 g/L saline water and then serially diluted and plated using a spiral plater (easySpiral Dilute, Interscience, France) on BHI agar plates (Condalab, Madrid, Spain). Colony forming units were enumerated after 24 h of incubation at 30°C and log(CFU/ml) values were calculated. Experiments were performed in duplicate for each condition.

### **3.6. Flow cytometry measurements**

To study the viability of vegetative cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 grown in oil-in-water emulsion, flow cytometry analysis was carried out using the Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA). SYTO9 and Propidium Iodide (PI) are nucleic acid dyes, SYTO9 stains all cells green and PI penetrates the non-intact cell membrane and stains them red. Double staining was used to identify and quantify the percentage of the different subpopulations within the sampled cell population: in green, cells presenting an intact membrane, in red, the permeable membrane cells and a transient state with green and red characteristics, assumed to be “damaged cells”. To prepare flow cytometry samples, 200 µl of oil-in-water emulsion were added to 900 µl of demineralized water (sterilized by filtration on 0.22 µm, Stericup, Millipore) and immediately stained with 1.500 µM of SYTO9 and 20.00 µM of PI. Measurements were then performed using a flow cytometer (Cyflow space, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany) equipped with a 488 nm excitation laser and four detectors: FSC, SSC (detecting light emission at 488 nm) and two fluorescence light detectors. Green fluorescence is detected by a 536/40 nm filter (FL1) and red fluorescence by a 610 nm high-pass filter (FL2). The trigger was set for the SSC and events were absolutely enumerated in 0.2 mL as the instrument allows. Compensation was applied in order to correct fluorescence spillover, based on the median fluorescence value of the negative population. For this, dead cells were prepared by heat inactivation at 80°C for 10 min, as a negative control.

Experiments were repeated three times and analysed using Flow Max software (Cyflow Space, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Germany). The subpopulations of cells with intact, damaged or permeable membranes were identified and gated on dot plots of FL1 versus FL2 and quantified by counting the number of events inside the corresponding gate (Figure 18).

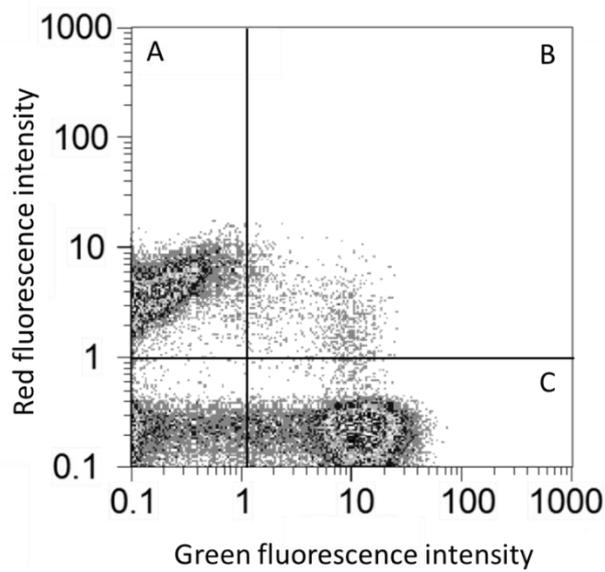


Figure 18 : Flow cytometry dot plots of a control oil-in-water emulsion previously inoculated with dead and viable cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4. Populations with a permeable membrane appeared in quadrant A and intact membrane cells appeared in quadrant C, damaged double-stained cells appeared in quadrant B.

### 3.7. Effect of the recovery medium on culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 incubated in emulsion

Three media were used to investigate the recovery ability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 following its exposure to a model emulsion without acid. First, an agar medium was developed from the liquid O/W emulsion. This medium consisted of mixing 80 ml of sterile oil-in-water model emulsion pre-heated to 55°C with 20 ml of autoclaved agar solution to obtain a final concentration of 15 g/L. Then, 1 ml of 0.05% filter sterilized solution of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) was plated on Petri dishes before adding the agar-emulsion mixture and carefully mixing. TTC was used to facilitate the visualization of colonies by dyeing them red. Then, two modified BHI agars were used to study the recovery. These media were supplemented by ROS scavengers, either with catalase or dimethylthiourea (DMTU). Solutions of catalase and DMTU (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) were sterilized by filtration and overlaid (100 µl) onto BHI agar plates, to reach a final concentration of 2000 units/ml and 25 mM respectively. The fate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in O/W model emulsion without acid was determined in triplicate using these three media.

### 3.8. Model development

A model was developed to describe the loss of culturability on BHA during the growth in oil-in-water emulsions. This model can be divided into two modules. First, the growth of vegetative cells ( $Y_{tot}$ ) was described by Rosso's model (45) (equation 17) thanks to growth parameters estimated in corresponding nutrient broth or in oil-in-water emulsion recovered in supplemented media (see results section).

$$Y_{tot} = \ln[N(t_i)] = \begin{cases} \ln(N_0), t_i < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0}\right) * e^{-\mu_{max} * (t_i - \lambda)}}\right), t_i \geq \lambda \end{cases} \quad (17)$$

with  $N(t_i)$  the bacterial concentration at time  $t_i$  (CFU/ml),  $N_0$  the initial cell concentration (CFU/ml),  $N_{max}$  the maximum cell concentration (CFU/ml),  $\lambda$  the lag period (h), and  $\mu_{max}$  the maximum specific growth rate ( $h^{-1}$ ).

To assess the population of assumed viable cells over time ( $Y_{viable}$ ), the total vegetative cells ( $Y_{tot}$ ) was considered as the sum of two subpopulations: viable cells ( $Y_{viable}$ ) and inactivated cells ( $Y_{inactivated}$ ), which are not culturable-then-growing cells on BHA, as shown in equation (18):

$$Y_{tot} = Y_{viable} + Y_{inactivated} \quad (18)$$

The subpopulation of  $Y_{inactivated}$  cells was defined as the proportion of cells that are inactivated and assumed to represent the probability of the cells being inactivated when growing on BHA at a given time, meaning the cells that are viable but not culturable on BHA. This probability follows a normal distribution described by three parameters: i) the maximum proportion of vegetative cells that can be inactivated ( $P_{max}$ ), ii) the time ( $t_{ina}$ ) at which this maximum proportion is reached and iii) the probability scattering ( $\sigma$ ) corresponding to the speed of appearance of the inactivated cells over time (Figure 19). Another parameter was defined as  $t_{rec}$ , which corresponds to the time at which the inactivated cell population regains its culturability on BHA. No scattering was needed on  $t_{rec}$ .

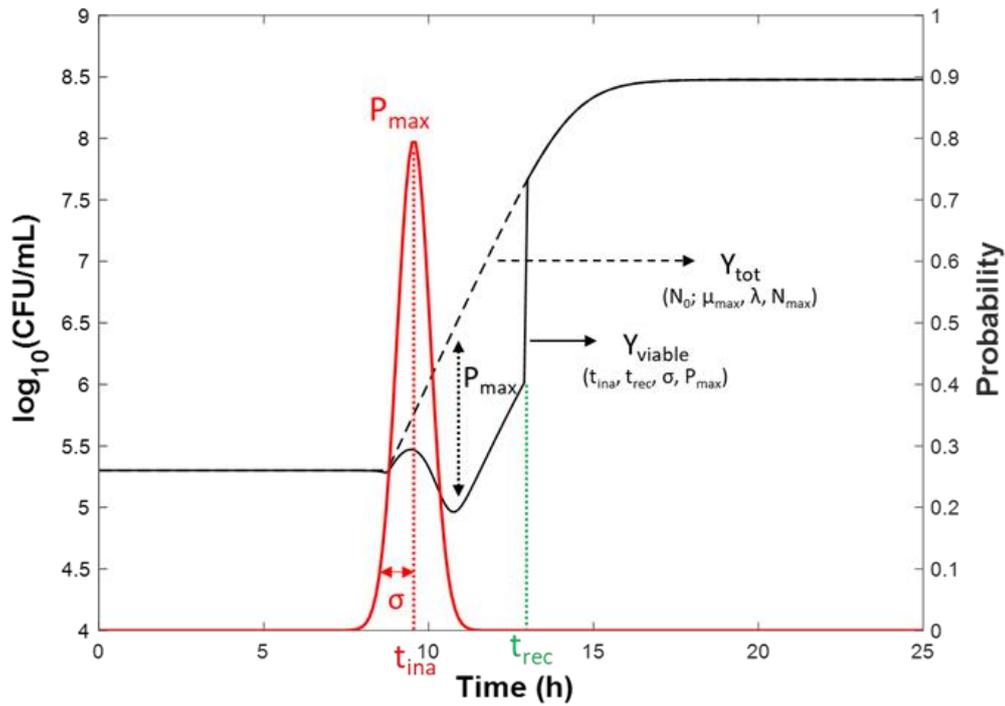


Figure 19 : Theoretical modelling diagram of the impact of viability loss on BHA used for bacterial enumeration due to an exposure to O/W emulsion where growth occurs. The black dotted line represents the supposed kinetics in O/W emulsion (total cells, characterized by 4 parameters of the growth model). The red line is the probability density over time when the cells lose their ability to grow on BHA used for enumeration. The time  $t_{rec}$ , in green, corresponds to the time at which the proportion of inactivated cells can fully recover on BHA. This inactivation time is characterized by the maximum proportion of cells losing their ability to grow on BHA ( $P_{max}$ ), the mean time ( $t_{ina}$ ) and the dispersion within the population ( $\sigma$ ). The black continuous line represents the evolution of the population of viable cells ( $\log(\text{CFU/ml})$ ) enumerated on BHA in O/W emulsion.

### 3.9. Statistical analysis

The growth parameters, i.e. the lag phase ( $\lambda$ ) and the maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ), were estimated using Rosso's model by minimizing the sum of squared errors (SSE; lsqcurvefit function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). The 95% confidence intervals were assessed using the nlparci function (nlparci function, Matlab2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). Finally, the goodness of the fit of the model was evaluated by the root mean square error (RMSE), determined using equation 19.

$$RMSE = \sqrt{\frac{ESS}{n-p}} \quad (19)$$

with  $ESS$  the sum of squared errors,  $n$  the number of experimental data and  $p$  the number of parameters of the model. The smaller the RMSE was, the better the model was fitted on the data.

One-way analysis of variance (ANOVA) was performed with the F-statistic test to compare particle size dispersion or bacterial concentration (log(CFU/ml)) obtained on the different recovery media over time and also to compare estimated growth parameters ( $\mu_{max}$  and  $\lambda$ ) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 on those media. ANOVA was performed using Matlab software (anova1 function, Matlab2020a, MathWorks, Natick, MA, USA) with a p-value equal to 0.05.

## 4. Results

### 4.1. Particle size determination and stability

The model O/W emulsion at pH 6.0 was characterized in terms of oil droplet size by laser granulometry. Measurements showed that the O/W emulsion without an inhibitor, or with acetic, caprylic and lauric acid added at pH 6.0, presented a monomodal distribution of oil droplets with a diameter equal to  $0.717 \pm 0.070 \mu\text{m}$ ,  $0.626 \pm 0.013 \mu\text{m}$ ,  $0.727 \pm 0.038 \mu\text{m}$  and  $0.634 \pm 0.010 \mu\text{m}$  respectively. However, the oil droplet diameter of the O/W emulsion with lactic acid is significantly different from the other four and equal to  $1.194 \pm 0.238 \mu\text{m}$ , reflecting a different emulsion structure. The emulsion stability measurements conducted with a Turbiscan confirmed this observation. The Turbiscan Stability Index (TSI) was used to compare O/W emulsions after 24h of storage at 30°C. The emulsions (without acid or with acetic, caprylic and lauric acid) did not exhibit any creaming or sedimentation after 24h (TSI < 0.5) except for the emulsion containing lactic acid. The TSI value of this latter emulsion was found to be  $0.53 \pm 0.40$ , indicating the occurrence of a destabilization phenomenon.

### 4.2. Growth kinetics of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in nutrient broth and in O/W emulsion, with organic acids

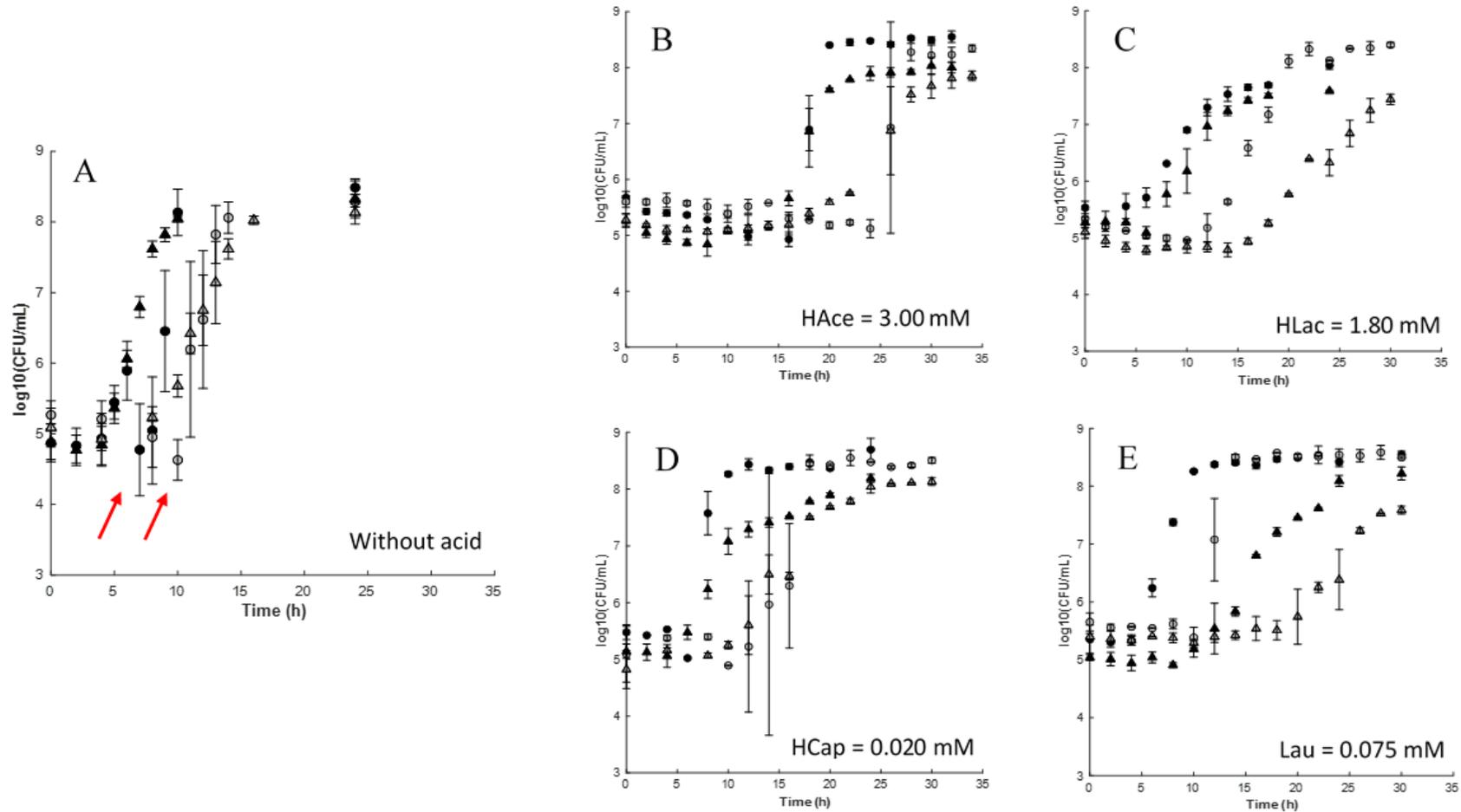
To investigate the inhibition of *B. weihenstephanensis* KBAB4 by organic acids in an O/W emulsion, the experimental cell fates in O/W emulsion at pH 6.0 and pH 5.5 were compared to the cell fates in nutrient broth in the same conditions (Figure 20). The conditions tested are without weak or fatty acid (Fig 20A), and in presence of a specific concentration of undissociated acetic acid (HAce = 3.000 mM – Fig 20B), undissociated lactic acid (HLac = 1.800 mM – Fig 3C), undissociated caprylic acid (HCap = 0.020 mM – Fig 20D) and total lauric acid (Lau = 0.075 mM – Fig 20E). The strain growth parameters were estimated in nutrient broth for each condition (Table 5). RMSE values indicated a good fitting property of the model to the experimental data. The addition of organic acids to the nutrient broth significantly decreases the  $\mu_{max}$  at both pH levels.  $\mu_{max}$  estimated in nutrient broth with undissociated acetic, undissociated caprylic and total lauric acid are similar at both pH values. Lactic acid appeared to be more effective at pH 5.5 than at pH 6.0 in nutrient broth, as the  $\mu_{max}$  of *B. weihenstephanensis* KBAB4 with 1.800 mM of lactic acid was equal to  $0.46 \text{ h}^{-1}$  and  $0.74 \text{ h}^{-1}$  respectively. Moreover, decreasing the pH increased the strain lag time ( $\lambda$ ) for each tested condition.

However, the kinetics in O/W emulsion shown a drop in log(CFU/ml) over time, followed by a sudden return to higher concentration, close to 8 log(CFU/ml) at the end of the kinetics (Fig 20A). This pattern made it difficult to estimate reliable parameters. This phenomenon was observed during the exposure to O/W emulsions and with the use of BHA as enumeration media, at both pH levels but at different times during the kinetics and different intensity, according to the acid used. For example, the decrease appeared at 6h in the O/W emulsion without an inhibitor at pH 6.0 but it appeared at 10 h at pH 5.5. Only the emulsion with added lactic acid did not show any drop in concentration in log(CFU/ml) over time on BHA (Fig 20C). Thus, the O/W emulsions studied here have an impact on the fate of *B. weihenstephanensis* KBAB4, resulting in its inactivation over time on BHA medium.

Table 5 : Growth parameters of *B. weihenstephanensis* KBAB4 estimated in nutrient broth for each tested condition and their standard deviations.

pH	Growth parameters	Without acid	[HAce] = 3.00 mM	[HLac] = 1.80 mM	[HCap] = 0.02 mM	[Lau] = 0.075 mM	RMSE
6.0	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	1.59 ± 0.29	0.68 ± 0.07	0.74 ± 0.10	0.69 ± 0.07	0.57 ± 0.04	0.430
	$\lambda$ (h)	3.89 ± 1.04	11.27 ± 0.52	6.49 ± 0.59	4.28 ± 0.56	9.61 ± 0.43	
5.5	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	1.32 ± 0.14	0.60 ± 0.06	0.46 ± 0.05	0.63 ± 0.05	0.57 ± 0.09	0.382
	$\lambda$ (h)	8.75 ± 0.34	19.04 ± 0.55	12.87 ± 0.98	9.15 ± 0.48	18.81 ± 0.67	

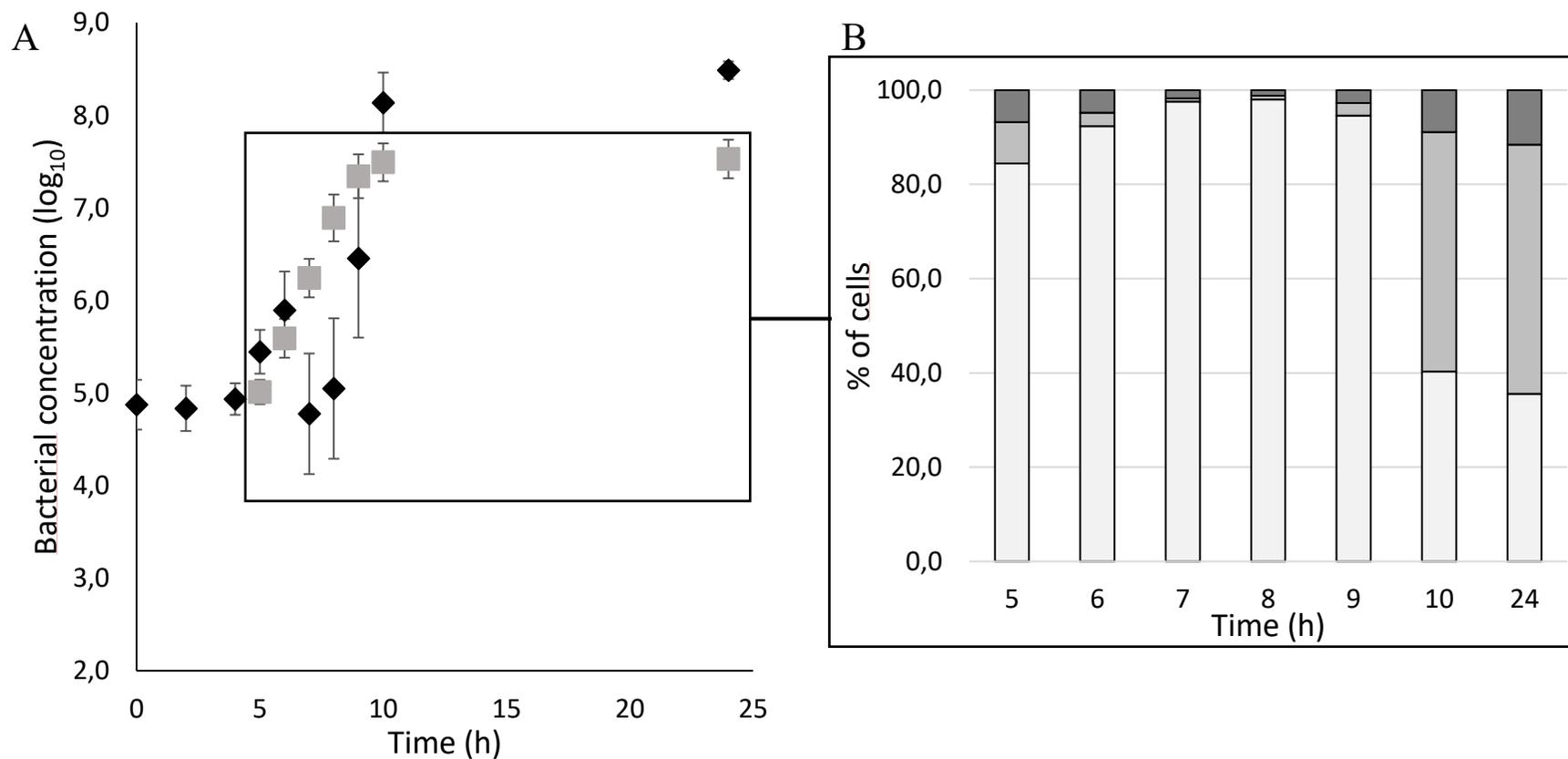
Figure 20 : Experimental growth kinetics of *B. weihenstephanensis* KBAB4, monitored by enumeration on BHA during their exposure to oil-and-water emulsion (circle), and in nutrient broth (triangle) without acid (A) or in presence of acetic (B), lactic (C), caprylic (D) or lauric (E) acid at pH 6.0 (black) or pH 5.5 (grey). Symbols with error bars represent the data average value and respective standard deviation due to replicates. The red arrows point to the drop in cell concentration in optimal conditions (without acid).



#### **4.3. Viability assessment of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells during growth by flow cytometry**

To further assess the physiological state of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells, cell viability was measured by flow cytometry during exposure to an O/W emulsion without an inhibitor at pH 6.0. SYTO9/PI were used for the staining procedure (see Materials and Methods section). Figure 21A shows the evolution of the cell population in O/W emulsion without acid at pH 6.0 quantified by flow cytometry and also enumerated on BHA. The appearance of a population of vegetative cells was shown by flow cytometry (FSC/FL1) to occur from 5h of incubation in the emulsion and increased steadily up to 10h. Before 5h, the concentration of vegetative cells in the emulsion was difficult to detect because of the oil droplet background, preventing cell population detection below 4 log. The concentration of cells quantified by flow cytometry is 1.5 log, 1.8 log and 0.9 log higher than the concentration enumerated on BHA at 7h, 8h and 9h respectively, indicating that about 3%, 1.4% and 13% of the total cells present in the emulsion are able to recover on BHA. Figure 21B represents the percentage of intact, damaged and permeable membrane cells (FL1/FL2) among the population of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells between 5h and 24h in O/W emulsion without acid at pH 6.0. A large majority of the population possessed an intact membrane during the decrease in log(CFU/ml) on BHA (between 7h and 9h). The percentage of cells with a damaged or permeable membrane increased after 10h of growth in O/W emulsion. These observations confirmed that cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 are viable and growing in O/W emulsion at pH 6.0, thus the decrease observed in log(CFU/ml) is a decrease in cell culturability on BHA plates.

Figure 21 : Intact membrane cell population evolutions of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in oil-in-water emulsion (A), quantified by flow cytometry (■) and enumerated on BHA (◆). (B) Proportion of intact (□), damaged (▒), and permeable (■) membrane cells in oil-in-water emulsion between 5 and 10h of incubation at 30°C.



#### **4.4. Effect of the recovery medium on culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells in emulsion**

Cells exposed to O/W emulsion at pH 6.0 without acid were plated on a medium with an identical composition to the O/W emulsion but supplemented with 15 g/L of agar and TTC (30 mg/ml). Cells were also plated onto BHI agar containing catalase or DMTU. Figure 22 shows the culturable cell concentration in log(CFU/ml) during their exposure to O/W emulsion at pH 6.0 on BHA, BHA supplemented with catalase or DMTU and O/W emulsion agar medium. It was observed that the culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 during exposure to O/W emulsion is enhanced on the modified media compared to BHA. Indeed, log(CFU/ml) between 7h and 9h of incubation in emulsion is significantly lower when cells are cultivated on BHA. Thus, the use of a solid O/W emulsion as a recovery medium as well as the use of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-degrading agents on BHA enabled the strain to fully regain its ability to recover.

The growth parameters of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in O/W emulsion at pH 6.0 free from organic acid were estimated from the kinetics of log(CFU/ml) over time obtained on each recovery medium. The  $\mu_{max}$  and  $\lambda$  estimated for each recovery media (BHA+catalase, BHA+DMTU and O/W emulsion agar) were not significantly different (data not shown). The growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in O/W emulsion at pH 6.0, without inhibitor, was  $1.46 \pm 0.11 \text{ h}^{-1}$  and the lag time was equal to  $3.85 \pm 0.57 \text{ h}$ . No difference was observed between growth parameters in nutrient broth and in O/W emulsion at pH 6.0 without acid.

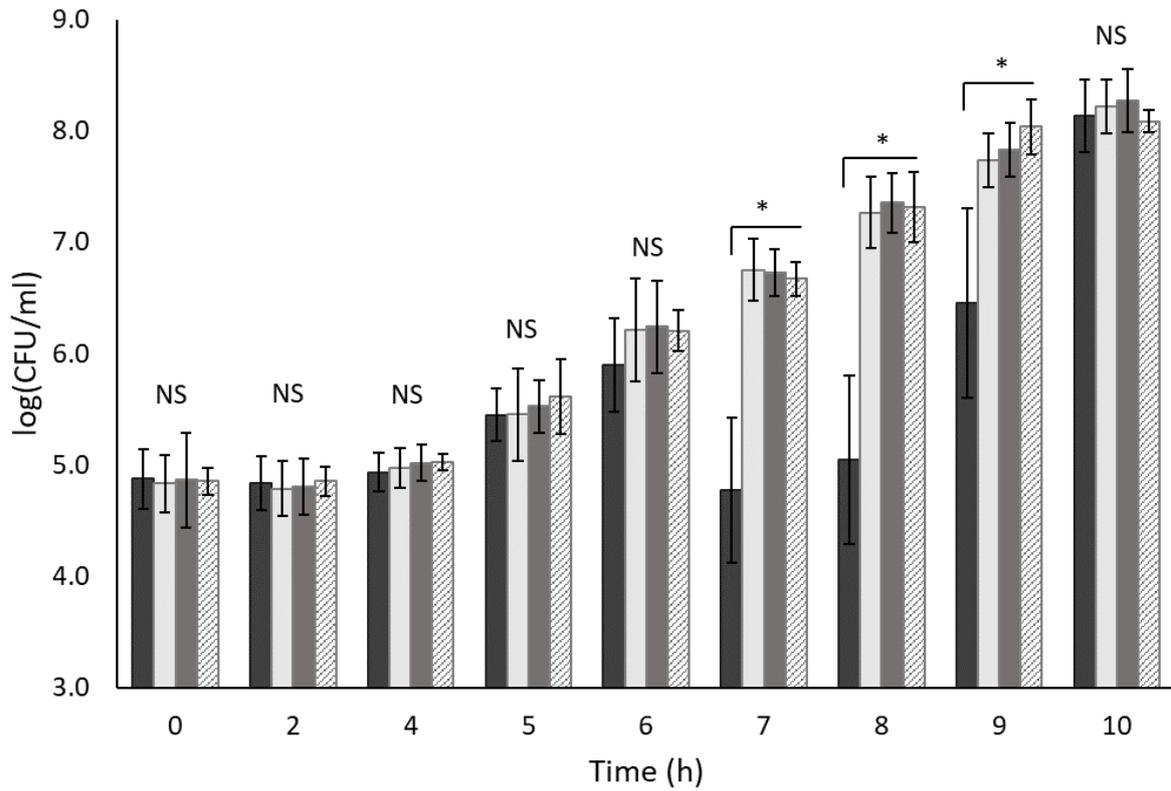


Figure 22 : Recovery of *B. weihenstephanensis* KBAB4 during their incubation in oil-in-water emulsion at pH 6.0. Colonies were enumerated on BHA (black), BHA supplemented with catalase (light grey), BHA supplemented with thiourea (dark grey) and O/W emulsion agar medium (hatched grey). Error bars correspond to standard deviations between replicates. Asterisks represents a significant difference between the concentrations ( $\log(\text{CFU/ml})$ ) ( $p$  value = 0.05), NS means non-significant difference.

#### 4.5. Simulating the temporary loss of culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 on BHA

As previously shown, growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells did occur in O/W emulsion without acid at pH 6.0 and growth parameters were estimated for this condition. The evolution of culturable cells on BHA was then described by a model derived from the logistic Rosso model, in order to compare cell inactivation parameters of *B. weihenstephanensis* KBAB4 for all tested conditions in O/W emulsions (Figure 23). Four parameters ( $P_{max}$ ,  $t_{ina}$ ,  $\sigma$  and  $t_{rec}$ ) were used to describe and compare the evolution of the viable cell population in O/W emulsion with or without acid and enumerated on BHA. To simulate the evolution of the viable cell population ( $Y_{viable}$ ), it was necessary to estimate the growth of the total vegetative cell population ( $Y_{tot}$ ) previously and to define growth parameters ( $N_0$ ,  $N_{max}$ ,  $\mu_{max}$  and  $\lambda$ ) (see equation 18). To do so, we tested several hypotheses and then assumed that i) growth parameters ( $\mu_{max}$  and  $\lambda$ ) of the strain are similar in nutrient broth and in O/W emulsion without acid, as shown previously; ii) growth kinetics in O/W emulsions containing weak acids (acetic and lactic acid) follow the same kinetics (same parameters) as in nutrient broth with the same acid concentrations and the same pH levels, and iii) growth kinetics in O/W emulsion containing fatty acids (caprylic and lauric acid) follow the same kinetics (same parameters) as in O/W emulsion without acid.

As showed in Figure 23, the evolution of viable cells on BHA can be described considering the assumption on the growth parameters, obtained in nutrient broth, except for emulsions with lactic acid. In this condition, cells were able to recover on the medium so there is no appearance of inactivated cells ( $P_{max} = 0$ ) and the simulation of the viable cell population over time is therefore not reliable. Figure 23 also shows that lowering pH did not seem to have an impact on the proportion of inactivated cells in O/W emulsion, except with acetic acid ( $P_{max} = 0.93$  at pH 6.0 and  $P_{max} = 0.82$  at pH 5.5). Moreover, the presence of lauric acid seemed to decrease this proportion at both pH levels, compared to other conditions ( $P_{max} = 0.67$  and  $0.62$ ). However, decreasing pH delayed the time at which inactivation occurred ( $t_{ina}$ ) and the time at which cells regained their recovery capacity ( $t_{rec}$ ) for all tested conditions.

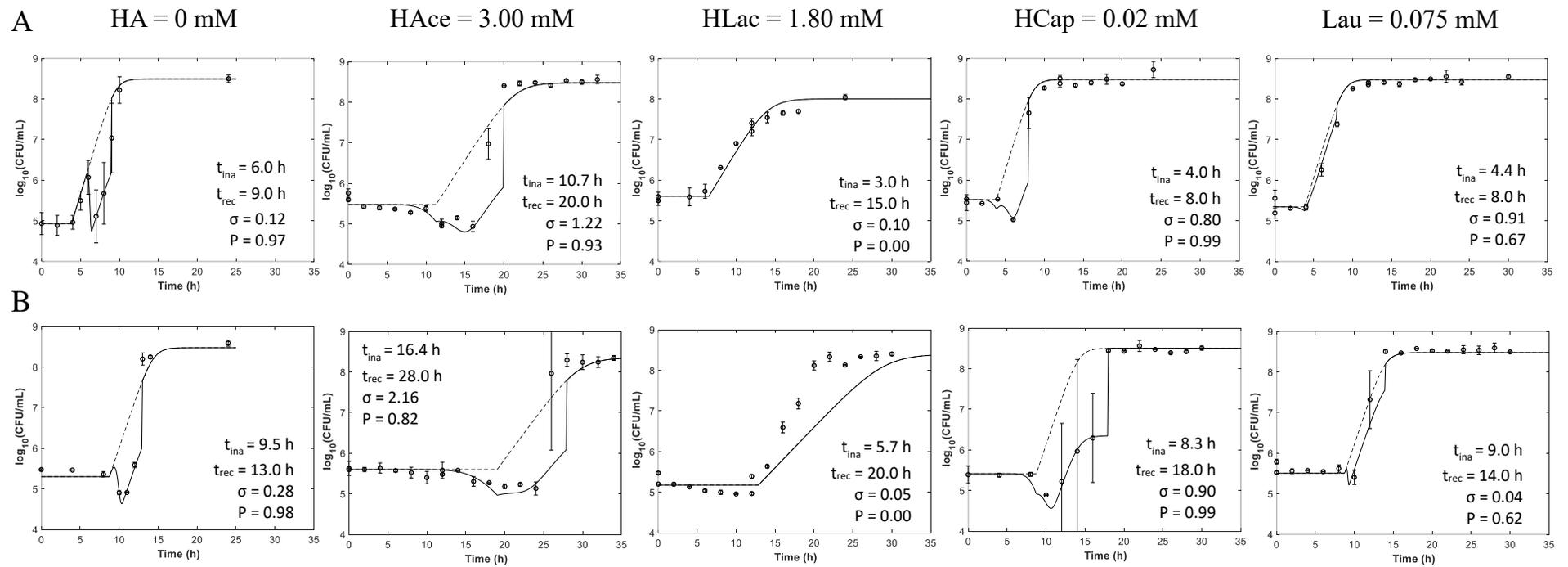


Figure 23 : Monitoring the viable cells on BHA (circles) of *B. weihenstephanensis* KBAB4 exposed to O/W emulsion at pH 6.0 (A) or pH 5.5 (B) with 5 different conditions. The evolution over time of the theoretical viable cell population on BHA is fitted with a black line and the simulated growth kinetics in O/W emulsion are represented with a dotted line. Symbols with error bars represent the data average value and respective standard deviation due to replicates. The parameters correspond to the parameters described in Figure 19.

## 5. Discussion

The main objective of this study was to evaluate and compare the inhibitory activity of two weak acids (acetic and lactic acid) and two fatty acids (caprylic and lauric acid) against *B. weihenstephanensis* KBAB4 in nutrient broth and an O/W emulsion. The results showed that adding 3.000 mM of undissociated acetic acid, 1.800 mM of undissociated lactic acid, 0.020 mM of undissociated caprylic acid and 0.075 mM of total lauric acid to nutrient broth caused growth inhibition, by decreasing the growth rate and increasing the lag time of the strain compared to the conditions without acid at both pH levels (Table 5), as expected. It is known that weak or short chain fatty acids (C4-C8) in their undissociated form can easily diffuse across bacterial cell membranes, causing acidification of the cytoplasm and cell death (19). On the other hand, long chain fatty acids have a lipophilic character, resulting in a greater affinity for bacterial cell membranes and leading to cell damage such as disruption or disorganization (20, 21).

However, the comparison of acid inhibition in a more complex system, i.e. an O/W emulsion, was not reliable because of the sudden decrease in cell concentration enumerated on BHA over time (Figure 20). The fate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 was thus impacted by the complex system and the presence of oil droplets, leading to a loss of culturability of cells on BHA for all tested conditions except in O/W emulsions with lactic acid where no drop in cell concentration was observed on BHA. A larger oil droplet size was the only difference observed concomitantly and could perhaps play a role in this phenomenon.

This plate count method has therefore shown its limits for measuring bacterial growth and assessing bacterial inhibition in O/W emulsion. Flow cytometry offers an alternative method for determining the physiology of individual cells by providing data on cell survival and viability, directly within a complex matrix (22–24). In this study, cellular viability was assessed by using nucleic acid dyes and defined as an intact cell membrane: when the permeability barrier of the cell is lost, the presence of the PI dye in the cell is correlated with cell damage and cell death. The results showed that cell multiplication did occur in the O/W emulsion without acid over time, and membrane integrity was intact during the loss of culturability on BHA (Figure 21). The cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 have therefore entered a Viable But Non Culturable (VBNC) state on BHA following their exposure to the O/W emulsion. Bacteria in the VBNC state are no longer able to grow on a routine culture medium, but are still alive, maintaining their metabolic activities, gene expression capacities and integrated

cytoplasmic membranes (25). This phenomenon is adopted by a microorganism as a survival strategy in response to a stressful environment, but resuscitation can occur with appropriate environmental conditions (26, 27). Stressful environments inducing the VBNC state are varied and include nutrient starvation, incubation outside the growth temperature range, inappropriate osmotic concentrations, oxygen concentrations, etc. (27). Very few studies have been reported on the VBNC state of *Bacillus cereus* species (28–30). The presence of a subpopulation of metabolically viable cells in matrices, but with no ability to be cultured on media, represents a threat to public health and food safety (31). The determination of the conditions required to regain full strain culturability is thus valuable.

Catalase and DMTU have long been studied in bacteria media for the recovery of stressed cells because they are effective and specific scavengers of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (32–34). Cells of *B. weihenstephanensis* KBAB4 totally regain their ability to recover on BHA supplemented with catalase and DMTU, after being exposed to O/W emulsion, underlining the potential impact of hydrogen peroxide on the culturability of stressed cells. Similar results were obtained for other microorganisms (30, 35, 36). Moreover, using a recovery medium with an identical composition to the O/W emulsion with added agar and free of ROS, also enabled the strain to fully recover, showing that cell culturability depends on their ability to neutralize ROS concentrations generated on BHA. This pattern should be verified by testing further culture media, used as a control to guarantee the health risk posed by the *B. cereus* group.

Indeed, transferring VBNC cells directly to nutrient media will likely lead to their demise given that dormant cells attempting to resuscitate poorly withstand the oxidative stress imposed by nutrient media (37). However, the antioxidant defense system of *B. cereus* species is constituted by an elaborate network of enzymes including peroxide dismutase (SOD) and catalase (38). Several studies have indicated that despite VBNC cells continuing to maintain their membrane integrity, the cells exhibit a lower metabolic activity. Morawska et al. (2022) showed a decreased induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in VBNC cells of *B. subtilis* compared to culturable cells. Similarly, Kong et al. (2004) demonstrated that *Vibrio vulnificus* cells in the VBNC state are nonculturable on laboratory media largely due to reduced catalase activity. This pattern prevents replication of these cells on media containing ROS.

In our study, the loss of culturability of *B. weihenstephanensis* KBAB4 cells incubated in O/W emulsion was affected differently by the different organic acids. It occurred at an early growth phase, during the assumed lag time and before the exponential phase for the majority of the conditions (between 4 and 16h) except for the O/W emulsion at pH 6.0 without acid, where the cell concentration on BHA started to increase at 5h then suddenly decrease during the

exponential growth between 7h and 9h. Cells may encounter difficulties adapting to the nutritive agar media during exponential phase, and thus enter in a dormancy state to survive. However, cell capacity to recover on BHA was instantaneous and occurred during the stationary phase between 8h and 28h depending on the tested condition. It is recognized that the expression of catalase increases as cells of *B. cereus* species enter the stationary growth phase due to the establishment of a stress adaptative response induced by the lack of nutrients (40, 41). Thus, it may induce a higher resistance to oxidative stress and restore cell culturability on BHA. Moreover, it was found that VBNC cells resuscitate in response to a quorum sensing signal produced by cells when permissive conditions are reached (42), thus cells incubated in the emulsions may be more sensitive to the quorum sensing signal when the maximal cell concentration is reached.

## 6. Conclusion

This work underlined the limits of comparing growth inhibition by acids in nutrient broth and in an emulsified system using a plate count method and a routine laboratory medium. An unexpected decrease in cell concentrations of *B. weihenstephanensis* KBAB4 followed by a sudden rise were observed when cells were incubated in emulsion and recovered on BHA. The cytometric method allows the quantification of viable cells and confirmed the membrane integrity of the cells incubated in the emulsion. Therefore, the complex matrix, i.e. an oil-in-water emulsion, allowed bacterial growth, did not impact cell survival and cell viability, but induced a physiological state of the cells leading to their non-culturability on a routine medium. The addition of anti-ROS agent on the medium enabled the strain to regain its ability to recover. This work may be relevant for studying the occurrence of non-culturable cells following their exposure to complex matrices, especially spore-forming bacteria. The underestimation of pathogenic bacteria cells of the *B. cereus* group is a significant issue in food safety controls. This may lead to false negative results in microbiological quality indicators and compromising public health. Determination of catalase activity or proteomic analyses on cells incubated in the oil-in-water emulsion could provide valuable insights into the cause of their non-culturability on BHA medium.

## **7. Acknowledgments**

This work is a part of Agathe Dutoit's PhD project, funded by the "Conseil Régional de Bretagne" and "Quimper Bretagne Occidentale". The authors wish to thank our partners which also financially support the IGAB project, the "Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière" (CNIEL, France). This work was supported by the UMT ACTIA ALTER'IX (Joint Technological Unit - French Ministry responsible for Food). The authors gratefully acknowledge Noémie Cossec for her technical support, and Fabienne Courand (ADRIA Food Expertise) for her help with the granulometry experimentations.

## 8. References

1. Davidson M, Taylor M, David J. 2021. Antimicrobials in Food Fourth Edi. CRC Press.
2. Theron MM, Lues JFR. 2011. Organic acids and Food Preservation.
3. Coban HB. 2020. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess Biosyst Eng* 43:569–591.
4. Lucera A, Costa C, Conte A, Del Nobile MA. 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Front Microbiol* 3:1–13.
5. Hsiao CP, Siebert KJ. 1999. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int J Food Microbiol* 47:189–201.
6. Coroller L, Guerrot V, Huchet V, Le Marc Y, Mafart P, Sohier D, Thuault D. 2005. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *Int J Food Microbiol* 100:167–178.
7. Ababouch LH, Bouqartacha F, Busta FF. 1994. Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiol* 11:327–336.
8. Batovska DI, Todorova IT, Tsvetkova I V., Najdenski HM. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: Individual effects and synergistic relationships. *Polish J Microbiol* 58:43–47.
9. Wilson PDG, Brocklehurst TF, Arino S, Thuault D, Jakobsen M, Lange M, Farkas J, Wimpenny JWT, Van Impe JF. 2002. Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach. *Int J Food Microbiol* 73:275–289.
10. Parker ML, Brocklehurst TF, Gunning PA, Coleman HP, Robins MM. 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I—Methods for investigating the form of growth. *J Appl Bacteriol* 78:601–608.
11. Brocklehurst TF, Parker ML, Gunning PA, Coleman HP, Robins MM. 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *J Appl Bacteriol* 78:609–615.
12. Robins MM, Wilson PDG. 1994. Food structure and microbial growth. *Trends Food Sci Technol* 5:289–293.
13. Alisherovich MA, Olimjon o'g'li CJ, Hidoyatillo qizi AS. 2023. The effect of food structure on microbial activity. *IQRO Jurnal* 2:2023.
14. Brocklehurst BTF, Wilson PDG. 2000. The role of lipids in controlling microbial growth\_Wilson\_2000 51:66–73.
15. Weiss J, Loeffler M, Terjung N. 2015. The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. *Curr Opin Food Sci* 4:69–75.
16. Léonard-Akkari L, Guégan S, Courand F, Couvert O, Lepage JF, Rondeau-Mouro C, Desriac N, Mathot AG, Leguérinel I, Coroller L, Decourcelle N. 2018. Dispersed phase volume fraction, weak acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Res Int* 109:288–297.
17. Kadri H El, Devanthi PVP, Overton TW, Gkatzionis K. 2017. Do oil-in-water (O/W)

- nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria? *Food Res Int* 101:114–128.
18. Liu Y, Lai Q, Shao Z. 2018. Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* 68:106–112.
  19. Stratford M, Eklund T. 2003. Organic acids and esters, p. 48–84. *In* *Food Preservatives*.
  20. Casillas-Vargas G, Ocasio-Malavé C, Medina S, Morales-Guzmán C, Del Valle RG, Carballeira NM, Sanabria-Ríos DJ. 2021. Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Prog Lipid Res* 82.
  21. Desbois AP, Smith VJ. 2010. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:1629–1642.
  22. Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* 73:3283–3290.
  23. Wilkinson MG. 2018. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends Food Sci Technol* 78:1–10.
  24. Raymond Y, Champagne CP. 2015. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiol* 46:176–183.
  25. Oliver D J. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*.
  26. Pan H, Ren Q. 2023. Wake Up! Resuscitation of Viable but Nonculturable Bacteria: Mechanism and Potential Application. *Foods* 12.
  27. Oliver JD. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:415–425.
  28. Rowan NJ. 2004. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? *Trends Food Sci Technol* 15:462–467.
  29. Karmakar S, Roychoudhury K. 2017. Induction to Viable but Non Culturable State and Resuscitation of *Bacillus cereus* and *E. coli*. *Essence J VIII*:11–19.
  30. Morawska LP, Kuipers OP. 2022. Antibiotic tolerance in environmentally stressed *Bacillus subtilis*: physical barriers and induction of a viable but nonculturable state. *microLife* 3:1–18.
  31. Ayrapetyan M, Oliver JD. 2016. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Curr Opin Food Sci* 8:127–133.
  32. Kong IS, Bates TC, Hülsmann A, Hassan H, Smith BE, Oliver JD. 2004. Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol* 50:133–142.
  33. Martin SE, Flowers RS, Ordal ZJ. 1976. Catalase : its effect on Catalase : Its Effect. *Appl Environ Microbiol* 32:731–734.
  34. O'Donoghue B, NicAogáin K, Bennett C, Conneely A, Tiensuu T, Johansson J, O'Byrne C. 2016. Blue-light inhibition of *Listeria monocytogenes* growth is mediated by reactive oxygen species and is influenced by  $\sigma_B$  and the blue-light sensor Lmo0799. *Appl Environ Microbiol* 82:4017–4027.

35. Hong Y, Zeng J, Wang X, Drlica K, Zhao X. 2019. Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10064–10071.
36. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida SI. 2000. A comparison of solid and liquid media for resuscitation of starvation- and low-temperature-induced nonculturable cells of *Aeromonas hydrophila*. *Arch Microbiol* 173:307–310.
37. Ayrapetyan Mesrop, Williams Tiffany OJ. 2018. Relationship between the Viable but Nonculturable State and. *J Bacteriol* 200:1–15.
38. Duport C, Jobin M, Schmitt P. 2016. Adaptation in *Bacillus cereus*: From stress to disease. *Front Microbiol* 7:1–18.
39. Morawska LP, Kuipers OP. 2022. Transcriptome analysis and prediction of the metabolic state of stress-induced viable but non-culturable *Bacillus subtilis* cells. *Sci Rep* 12:1–14.
40. den Besten HMW, Effraïmidou S, Abee T. 2013. Catalase activity as a biomarker for mild-stress-induced robustness in *Bacillus weihenstephanensis*. *Appl Environ Microbiol* 79:57–62.
41. Bol DK, Yasbin RE. 1994. Analysis of the dual regulatory mechanisms controlling expression of the vegetative catalase gene of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 176:6744–6748.
42. Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. 2014. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol* 80:2478–2483.
43. Baril E, Coroller L, Postollec F, Leguerinel I, Boulais C, Carlin F, Mafart P. 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *Int J Food Microbiol* 146:57–62.
44. Dutoit A, Decourcelle N, Mathot A, Coroller L. 2024. Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium. *Food Microbiol* 121.
45. Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol* 61:610–616.



---

## **FOCUS Chapitre 3 :**

Précisions sur la formulation de  
l'émulsion Huile/Eau 50/50 modèle

---

## 1. Définition de l'émulsion modèle : prérequis et exigences

Dans ce chapitre, le milieu biphasique développé est une émulsion huile dans eau (H/E) dite modèle. Il s'agit d'un milieu artificiel simplifié, proposé comme référence pour « imiter » les propriétés physico-chimiques et la structure d'une émulsion alimentaire plus complexe. L'objectif de l'émulsion modèle est donc d'être un support de croissance optimal pour *B. weihenstephanensis* KBAB4, dans le but ensuite d'étudier les activités inhibitrices des acides sélectionnés. En effet, la coexistence d'une phase hydrophile et d'une phase hydrophobe dans des émulsions permet d'étudier la localisation et la distribution des composés inhibiteurs en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et leur impact sur le développement bactérien. Cependant, il est connu que le milieu dans lequel se trouve une bactérie peut influencer son développement, c'est pourquoi il est nécessaire de prendre en compte certaines contraintes lors de l'élaboration de cette émulsion modèle :

- i) L'émulsion modèle est un milieu de croissance donc elle doit être stérile et fabriquée dans des conditions aseptiques vérifiées.
- ii) L'émulsion modèle ne doit pas présenter d'instabilité sur une période d'incubation inférieure ou égale à celle de la croissance de la souche, à la température d'étude, c'est-à-dire à 30°C.
- iii) Il est nécessaire d'évaluer et de tenir compte des effets des divers ingrédients qui composent l'émulsion sur la croissance de la souche et sur l'activité inhibitrice des composés inhibiteurs sélectionnés.

Pour cela, la formulation et la fabrication de l'émulsion modèle a été réalisée à partir d'un modèle existant, précédemment publié en 2018 (Léonard-Akkari et al., 2018). L'émulsion modèle H/E de ratio 50/50 est stable sur une période de 10 jours à 30°C, et les conditions aseptiques de fabrication ont été vérifiées et confirmées. Les deux premières contraintes énoncées sont donc respectées.

Ce focus s'intéressera donc à la justification du choix des constituants de l'émulsion en tant que « modèles » d'un système alimentaire plus complexe et à l'évaluation de leur effet sur la croissance de *B. weihenstephanensis* et sur l'activité inhibitrice des acides organiques, en particulier l'effet du Tween 80.

## 2. Justification de la formulation de l'émulsion modèle

### 2.1. La phase aqueuse

La phase aqueuse d'une émulsion est le lieu de croissance bactérienne (Wilson et al., 2002). C'est pourquoi, la phase aqueuse de l'émulsion modèle est composée d'un milieu de culture, du bouillon nutritif à 20 g/L. L'utilisation d'un milieu de culture comme phase aqueuse permet l'apport des nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes, ici un mélange de tryptone (10 g) et d'extrait de viande (5 g). Le chlorure de sodium présent dans le milieu (5 g) permet de fournir les ions chlorures et sodium nécessaires aux processus physiologiques des bactéries et permet également de maintenir l'équilibre ionique du milieu de culture, permettant l'ajustement et le maintien du pH à 6,0 ou 5,5.

La composition précise du bouillon nutritif en acides organiques et en acides gras n'étant pas connue, des analyses physico-chimiques ont été réalisées par un laboratoire prestataire sur du bouillon nutritif à 20 g/L. Les concentrations en acide acétique, lactique, propionique et en acide gras saturés déterminées dans le bouillon nutritif sont reportées dans le tableau suivant.

Tableau 6 : Concentrations en acide acétique, lactique, propionique et en acides gras saturés dans du bouillon nutritif à 20 g/L

Acides	Résultats	Unités	Concentration en acide total (mM)	Concentration en acide non dissocié (mM)	
				pH = 6,0	pH = 5,5
Acide acétique	1 ± 0,1	mg/100g	0,17 ± 0,02	0,009 ± 0,001	0,026 ± 0,003
Acide lactique	45 ± 9	mg/kg	5,00 ± 1,00	0,036 ± 0,007	0,112 ± 0,022
Acide propionique	<0,25	mg/100g	-	-	-
Acides gras saturés	<0,01	g/100g	-	-	-

Les concentrations en acide propionique et en acides gras saturés sont inférieures à la limite de détection des méthodes de détermination utilisées. On considère donc que les concentrations des acides propionique, caprylique et laurique dans le bouillon nutritif sont négligeables, et n'impactent pas la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4. En ce qui concerne l'acide acétique et l'acide lactique, leurs concentrations en acide non dissocié calculées à pH 6,0 et 5,5 sont inférieures aux concentrations non inhibitrices déterminées grâce au modèle de Lambert & Pearson, (2000) dans le chapitre 2 ( $CNI_{HAce} = 0,98 \pm 0,20$  mM et  $CNI_{HLac} = 0,71 \pm 0,19$  mM) (Dutoit et al., 2024). Les concentrations en acide acétique et acide lactique présentes dans le bouillon nutritif n'affectent donc pas la croissance de la souche et n'ont pas été prises en compte lors de l'ajout de ces acides au milieu.

## 2.2. La phase grasse

La phase grasse de l'émulsion modèle est composée d'hexadécane (99% pureté, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier, France). L'hexadécane est un alcane avec 16 atomes de carbone sur sa chaîne hydrocarbonée saturée. Sa densité est égale à 0,773 g/ml à 25°C et son point de fusion est de 18°C. Bien que l'hexadécane soit un produit dangereux (Cancérogène, Mutagène, et toxique pour la Reproduction) et qu'il ne soit jamais utilisé dans les produits alimentaires, son utilisation en tant que phase grasse dans l'émulsion modèle permet d'éviter toutes traces d'acides gras saturés ou polyinsaturés dans le milieu qui pourrait affecter le comportement et la croissance des microorganismes (Mvou Lekogo et al., 2010, 2013). De plus, l'hexadécane pur est régulièrement utilisé pour la formulation d'émulsions dans la littérature scientifique, pour des applications cosmétiques ou pharmaceutiques (Castellani et al., 2010; Kalyanram & Gupta, 2022) mais également dans le domaine de l'industrie alimentaire pour obtenir des émulsions stables (Ghosh et al., 2006; Kim et al., 2004; D. J. McClements et al., 1993) et visualiser la croissance de microorganismes (Brocklehurst et al., 1995; J. Li et al., 2001; Parker et al., 1995; Prachaiyo & McLandsborough, 2003). Dans ces études, il a été montré que la croissance bactérienne dans des émulsions composées d'hexadécane est similaire à celle observée dans un milieu nutritif témoin mais que des ratios élevés en hexadécane limitent la croissance de microorganismes en raison de la limitation des nutriments ou de l'espace pour les bactéries présentes dans la phase aqueuse (Brocklehurst et al., 1995; Prachaiyo & McLandsborough, 2003). Dans notre cas, à un ratio unique de 50% d'hexadécane dans l'émulsion modèle formulée, les cinétiques de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 n'ont pas été impactées comparées au bouillon nutritif seul lorsque l'énumération est réalisée sur du milieu GN (Gélose Nutritive), comme le montre la figure 24. Par ailleurs, les différences observées sur les concentrations finales : une plus grande concentration en cellules semble être obtenue lors de la croissance en émulsion modèle, est la cause d'une inoculation en cellules plus élevée dans ce milieu (Figure 24).

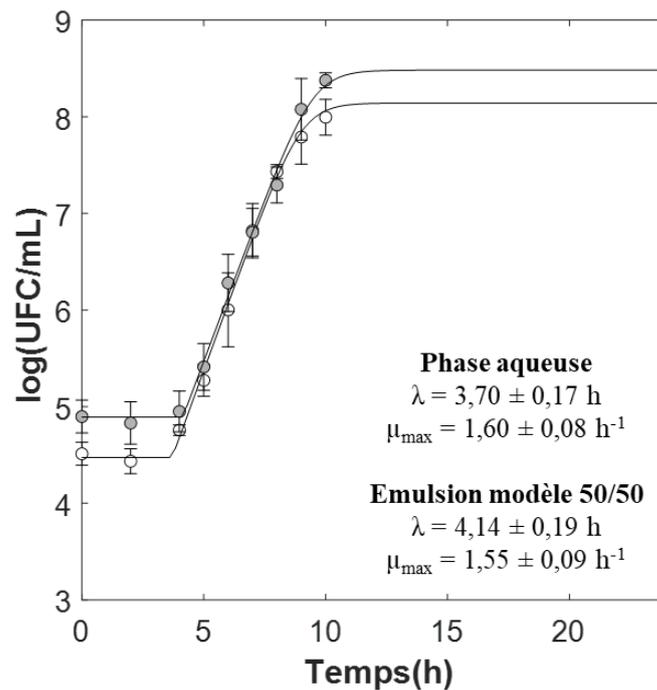


Figure 24 : Cinétique de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4, inoculé à partir d'une suspension de spores traitée thermiquement, dans la phase aqueuse de l'émulsion (Bouillon nutritif) (ronds vides) et dans l'émulsion modèle H/E 50/50 (ronds gris) ajustés à pH 6,0. Les lignes noires correspondent à l'ajustement du modèle de Rosso sur les données expérimentales et les temps de latence ( $\lambda$ ) et taux de croissance ( $\mu_{max}$ ) estimés sont indiqués sur la figure en fonction des milieux.

### 2.3. La phase interfaciale

La surface séparant la phase aqueuse de la phase grasse d'une émulsion est appelée phase interfaciale et est, en général, stabilisée par des molécules émulsifiantes (Berton-Carabin et al., 2018). Les émulsifiants utilisés pour stabiliser l'émulsion modèle H/E 50/50 sont un mélange de deux tensioactifs non ioniques, le Tween 80 et le Span 80 à une concentration finale de 1,5 % (p/v) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

- Le Tween 80 ou polysorbate 80 (monooléate de polyoxyéthylène sorbitane) est une molécule amphiphile constituée d'acide oléique (queue) et de sorbitol et d'oxyde d'éthylène (tête) (Figure 25A). Son utilisation dans les produits alimentaires tels que le chewing-gum, les produits laitiers, les produits de boulangerie est autorisée par l'EFSA et la FDA. Sa Dose Journalière Admissible (DJA) a été fixée à 25 mg/kg de poids corporel /jour (EFSA ANS, 2015). La HLB (Balance Hydrophile Lipophile) du Tween 80 est de 15. Il s'agit donc d'un émulsifiant hydrophile qui se retrouve dans la phase aqueuse des émulsions, pouvant ainsi facilement interagir avec les microorganismes.

- Le Span 80 ou monoléate de sorbitane est un ester de sorbitane avec un acide gras, l'acide oléique (Figure 25B). Son utilisation est autorisée dans un grand nombre de produits alimentaires définis par l'EFSA et la FDA comme les produits laitiers ou les produits de boulangerie. Sa dose journalière admissible est évaluée à 10 mg/kg de poids corporel/jour (EFSA ANS, 2017). La HLB du Span 80 est égale à 4,3. Il s'agit d'un émulsifiant lipophile, généralement utilisé pour stabiliser les émulsions Eau dans Huile, il est donc principalement situé dans la phase grasse des émulsions. En raison de son caractère lipophile et de sa localisation dans l'émulsion, l'effet du Span 80 sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 n'a pas été évalué et a été considéré comme négligeable.

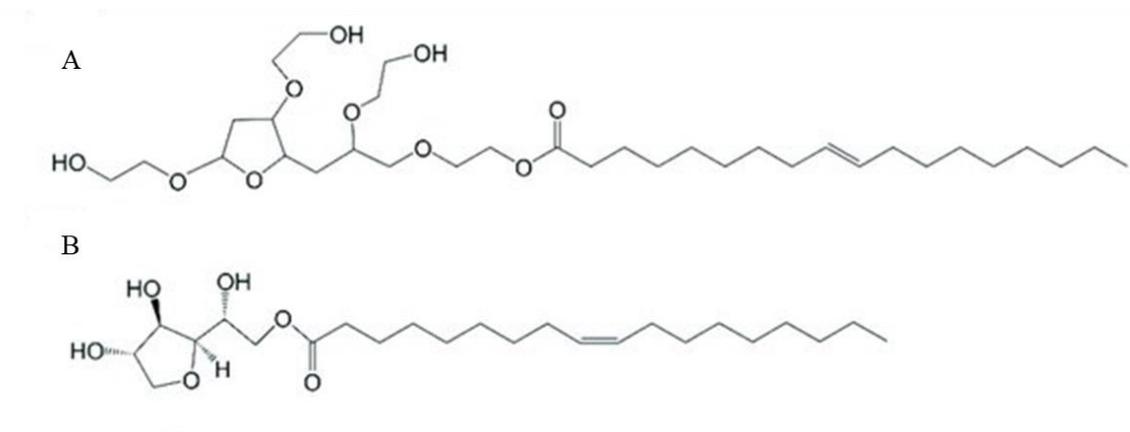


Figure 25: Structure chimique du Tween 80 (A) et du Span 80 (B) (Li et al., 2021)

Ces deux tensioactifs sont très généralement utilisés en combinaison pour stabiliser des émulsions dans la littérature scientifique en raison de leurs caractéristiques complémentaires. En effet, dans la formulation d'émulsion, la combinaison d'un émulsifiant à haute HLB avec un émulsifiant à faible HLB mène à l'obtention d'une émulsion plus stable qu'avec un seul émulsifiant (Lv et al., 2014; Takamura et al., 1979). Dans l'émulsion modèle 50/50 composées à 1,5% (p/v) de Tween 80 et de Span 80, la HLB finale de l'émulsion est égale à 9,65 ce qui est caractéristique d'une émulsion Huile dans Eau (Hong et al., 2018).

Des essais préliminaires ont mis en évidence l'importance de la présence des deux tensioactifs pour stabiliser l'émulsion modèle dès 24 h de stockage à 30°C et il a été observé que leur concentration ne peut être réduite sans compromettre la stabilité de l'émulsion après 10 jours de stockage à la même température (Tableau 7). Bien que la durée maximale de croissance de la souche, selon les conditions de pH et d'acides étudiées, est comprise entre 24 h et 35 h à 30°C, les déstabilisations ont été suivies sur une période maximale de 10 jours afin d'analyser leur évolution dans le temps et de garantir une stabilité de l'émulsion modèle prolongée. Lors de ces essais, deux ratios huile/eau ont été étudiés, un ratio de 50/50 et un ratio de 35/65 afin

de prendre en compte l'effet du ratio d'huile sur les propriétés stabilisantes des tensioactifs non ioniques. Les stabilités des émulsions formulées ont été mesurées par diffusion statique de la lumière multiple (SMLS) grâce au Turbiscan LAB (Formulaction, France) et comparées à l'aide des valeurs de TSI (Turbiscan Stability Index), plus le TSI est élevé, plus l'émulsion est instable (Figure 26). Une émulsion est considérée comme stable sur une période donnée lorsque la valeur du TSI est inférieure à 3.

Tableau 7: Valeurs moyennes de TSI et leur écart-types des émulsions modèles ajustées à pH 6,0, après & jour (A) et 10 jours (B) de stockage à 30°C en fonction de la concentration en Tween 80 (lignes) et en Span 80 (colonnes) et du ratio volumique. Les couleurs correspondent au niveau de déstabilisation (Figure 26).

A		Durée de stockage = 24 h	Concentration en Span 80 (% p/v)			
			0	0,5	1,0	1,5
Concentration en Tween 80 (% p/v)	0	50/50 : 51,9 ± 1,97			50/50 : 4,48 ± 2,55	
		35/65 : 49,3 ± 6,72			35/65 : 24,9 ± 7,22	
	0,5					
	1,0			50/50 : 1,15 ± 0,47		
				35/65 : 0,52 ± 0,08		
	1,5	50/50 : 1,07 ± 0,39	50/50 : 1,38 ± 0,34	50/50 : 1,18 ± 0,15	50/50 : 0,45 ± 0,16	
35/65 : 0,80 ± 0,06		35/65 : 1,47 ± 0,29	35/65 : 1,67 ± 0,76	35/65 : 0,37 ± 0,05		

B		Durée de stockage = 10 j	Concentration en Span 80 (% p/v)			
			0	0,5	1,0	1,5
Concentration en Tween 80 (% p/v)	0	50/50 : 76,6 ± 6,50			50/50 : 18,0 ± 10,5	
		35/65 : 86,4 ± 5,91			35/65 : 41,6 ± 3,15	
	0,5					
	1,0			50/50 : 5,87 ± 1,08		
				35/65 : 4,40 ± 0,38		
	1,5	50/50 : 4,30 ± 0,69	50/50 : 3,57 ± 0,43	50/50 : 2,63 ± 0,32	50/50 : 2,78 ± 0,17	
35/65 : 5,93 ± 0,40		35/65 : 4,52 ± 0,31	35/65 : 4,68 ± 0,83	35/65 : 2,65 ± 0,16		

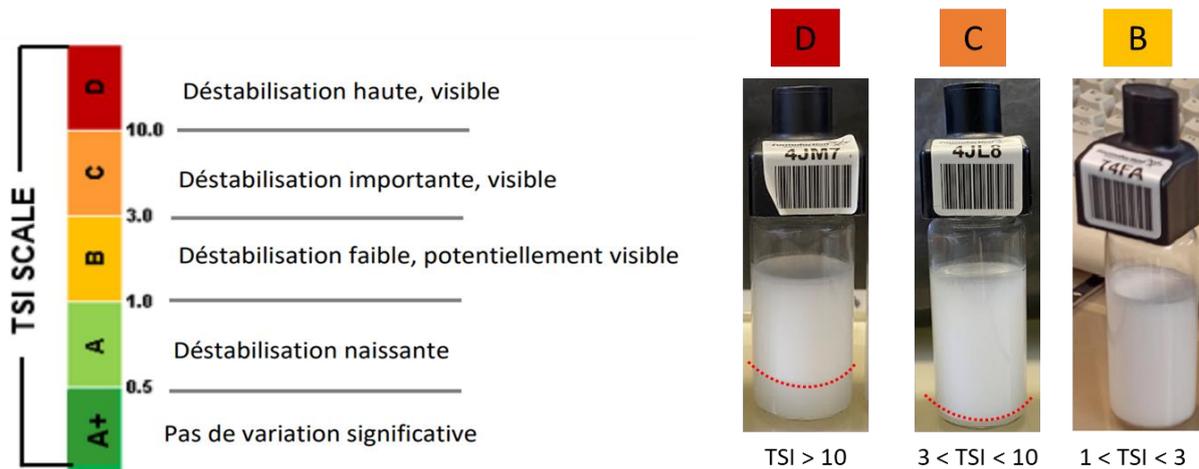


Figure 26: Echelle du Turbiscan Stability Index et sa signification en termes de niveaux de déstabilisations (gauche) (Turbiscan Lab User Guide) et exemple d'émulsions modèles avec les déstabilisations correspondantes (droite). Photos personnelles.

### 3. Vérification de l'effet du Tween 80 sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur l'activité inhibitrice des composés

#### 3.1. Effet du Tween 80 sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4

Il est reconnu, dans la littérature scientifique, que le Tween 80 possède des effets sur la croissance bactérienne en fonction de sa concentration dans un milieu. Le Tween 80 peut soit stimuler la croissance bactérienne à des concentrations appropriées en fournissant des substrats nutritifs pour la prolifération des bactéries (Partanen et al., 2001; Taoka et al., 2011) ou bien inhiber la croissance à des concentrations élevées en perturbant et augmentant la perméabilité de la membrane cellulaire (Brown & Winsley, 1969; Noh et al., 1997). C'est pourquoi il est important de prendre en compte et caractériser cet effet pour son application dans l'émulsion modèle.

Dans un milieu aqueux, le Tween 80 est capable de former des micelles lorsque sa concentration est supérieure à la CMC. La CMC du Tween 80 est égale à 0,015 mM à 25°C soit environ 0,020 g/L (Mahmood & Al-koofee, 2013). A une concentration finale de 1,5 % (p/v) soit 15 g/L dans le milieu nutritif, la concentration en Tween 80 est largement supérieure à la CMC donc il se trouve sous forme de micelles. La formation de micelles à une concentration en Tween 80 de 1,5% (p/v) dans de l'eau, ajustée à pH 6,0 et 5,5, a été vérifiée par des mesures de diffusion dynamique de la lumière (DLS). Des micelles de Tween 80 dont les diamètres sont égaux à  $12,48 \pm 1,19$  nm et  $12,71 \pm 0,94$  nm ont été observées à pH 6,0 et 5,5 dans de l'eau.

Ces valeurs sont en cohérence avec les valeurs de la littérature (Bide et al., 2021; Weiszár et al., 2012).

Afin de vérifier l'effet de la formation de micelles de Tween 80 sur la croissance des cellules végétatives en phase aqueuse, des suivis de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ont été réalisés en absence et en présence de 1,5% (p/v) de Tween 80 dans du bouillon nutritif à 20g/L, à pH 6,0 et 5,5. Ces suivis de croissance ont été effectués par mesure de la densité optique (Bioscreen C reader, Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland) et les taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans ces milieux ont été déterminés par régression linéaire selon la méthode de Membre et al. (2002). Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau suivant (Tableau 8).

Tableau 8: Taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 en bouillon nutritif à pH 6,0 et 5,5 en fonction de la concentration en Tween 80 (% p/v)

Concentration en Tween 80 (% p/v)	Taux de croissance (h <sup>-1</sup> )	
	pH = 6,0	pH = 5,5
0	1,380 ± 0,111	0,883 ± 0,233
1,5	1,431 ± 0,041	0,720 ± 0,108

Les taux de croissance de *B. weihenstephanensis* en présence de Tween 80 à 1,5 % (p/v) ne sont pas significativement différents des taux de croissance en absence de Tween 80, à pH 6,0 et 5,5 ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ). Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par Léonard-Akkari et al. (2018). L'étude a montré que le Tween 80 diminuait significativement le taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 au-delà d'une concentration de 5% à pH 6,0 et 2% à pH 5,5. A une concentration de 1,5%, le Tween 80 n'affecte donc pas la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans la phase aqueuse et donc dans l'émulsion modèle 50/50, comme le montre également la figure 24.

### 3.2. Effet du Tween 80 sur l'activité inhibitrice des acides organiques

L'ajout de Tween 80 dans un milieu peut également diminuer l'activité inhibitrice de composés antibactériens (Nielsen et al., 2016; Pernin et al., 2019). En effet, les micelles de Tween 80 formées créent des environnements hydrophobes capables d'encapsuler certaines molécules hydrophobes actives (Berton-Carabin et al., 2014) et ainsi réduire leur concentration disponible pour agir sur la membrane bactérienne (Juven et al., 1994). Par exemple, Nielsen et al. (2016) ont montré que la présence de Tween 80 dans le milieu augmente les concentrations en isoeugénol et en rifampicine nécessaires pour éradiquer les biofilms de *S. aureus*. Cet effet

n'a pas été évalué en milieu aqueux mais peut être caractérisé au sein de l'émulsion modèle 50/50 en calculant la quantité de Tween 80 dite en excès dans la phase aqueuse.

Au sein d'une émulsion, les agents tensioactifs vont s'adsorber à l'interface lors de l'émulsification et diminuent la tension interfaciale entre la phase aqueuse et la phase grasse (McClements, 2016). Les agents tensioactifs sont définis par leur « surface couvrante », c'est-à-dire la quantité d'émulsifiant nécessaire pour couvrir une surface d'interface donnée à l'équilibre. En fonction de la concentration en agent tensioactif introduite dans l'émulsion, il se peut que celle-ci soit supérieure à la surface couvrante et en conséquence, une fraction d'émulsifiant reste non adsorbée. Selon le HLB de la molécule tensioactive, la fraction non absorbée ou en excès va rester dans la phase dans laquelle elle est la plus soluble (Berton-Carabin et al., 2014) et va pouvoir interagir avec les composés antibactériens présents dans cette phase. D'après Terjung et al. (2012), la surface couvrante du Tween 80 à saturation est égale à  $2.10^{-6}$  mol/m<sup>2</sup>.

En prenant en compte la surface couvrante du Tween 80 et le diamètre moyen des gouttelettes de l'émulsion, il est possible de calculer la quantité de Tween 80 non adsorbée ou résiduelle en phase aqueuse (Berton-Carabin et al., 2014). Dans l'émulsion modèle 50/50, avec 1,5 % (p/v) de Tween 80 et un diamètre moyen des gouttelettes égal à  $0,717 \pm 0,070$  µm, la concentration résiduelle en Tween 80 dans la phase aqueuse est nulle. Cela signifie que toutes les molécules de Tween 80 sont situées à l'interface (Léonard-Akkari et al., 2018), limitant leurs interactions avec les agents antibactériens présents dans la phase aqueuse. La présence de Tween 80 dans l'émulsion modèle 50/50 ne semble donc pas influencer l'activité inhibitrice des acides organiques sélectionnés. Cependant, ces calculs sont basés sur l'hypothèse que seul le Tween 80 est capable de s'adsorber à la surface et ne prend pas en compte l'adsorption du Span 80 également utilisé dans la formulation. La prédiction de la quantité d'émulsifiants en excès dans la phase aqueuse au sein d'une émulsion stabilisée par deux tensioactifs est compliquée en raison des interactions intramoléculaires entre les tensioactifs, entraînant une adsorption synergique ou compétitive de ces tensioactifs à l'interface (Posocco et al., 2015). De plus, l'adsorption des tensioactifs à l'interface est dépendante de plusieurs facteurs tels que la température, le ratio volumique des phases, le procédé d'émulsification, ce qui peut également entraîner des variations dans les propriétés interfaciales (Lv et al., 2014).

#### 4. Conclusion

Pour conclure, l'émulsion modèle développée, c'est-à-dire une émulsion H/E 50/50 composée de bouillon nutritif supplémenté par du Tween 80 (1,5% p/v) en tant que phase aqueuse et d'hexadécane supplémenté par du Span 80 (1,5 % p/v) en tant que phase grasse, répond aux différents critères évoqués. Elle est stérile et stable sur une période de 24 heures à 10 jours lors d'un stockage à 30°C. De plus, elle permet la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les conditions optimales sans perturber les caractéristiques physico-chimiques du milieu. Cependant, son utilisation en tant que système de référence pour des matrices alimentaires peut susciter des controverses en raison de diverses limites. C'est pourquoi la justification de sa formulation et de son utilisation comme « matrice modèle » a été nécessaire. Dans un premier temps, l'emploi de l'hexadécane est discutable. Il ne s'agit pas d'un produit alimentaire mais permet néanmoins d'élaborer un système stable et neutre où aucune trace d'acides gras exogènes susceptibles d'interagir avec la souche et les composés inhibiteurs sélectionnés n'est présente. Par ailleurs, bien que les effets du Tween 80 sur la croissance bactérienne et l'activité antibactérienne de composés inhibiteurs soient connus, ces effets ont été évalués et sont considérés comme négligeables dans le système modèle.

## 5. Références

- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H., & Genot, C. (2014). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945–977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>
- Berton-Carabin, C. C., Sagis, L., & Schroën, K. (2018). Formation, Structure, and Functionality of Interfacial Layers in Food Emulsions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(January), 551–587. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012405>
- Bide, Y., Fashapoyeh, M. A., & Shokrollahzadeh, S. (2021). Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination. *Scientific Reports*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96199-6>
- Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x>
- Brown, M. R., & Winsley, B. E. (1969). Effect of Polysorbate 80 on cell leakage and viability of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to rapid changes of pH, temperature and tonicity. *Journal of General Microbiology*, 56(1), 99–107. <https://doi.org/10.1099/00221287-56-1-99>
- Castellani, O., Al-Assaf, S., Axelos, M., Phillips, G. O., & Anton, M. (2010). Hydrocolloids with emulsifying capacity. Part 2 - Adsorption properties at the n-hexadecane-Water interface. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.07.006>
- Dutoit, A., Decourcelle, N., Mathot, A., & Coroller, L. (2024). Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium. *Food Microbiology*, 121(February). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104498>
- EFSA ANS, P. on F. A. and N. S. added to F. (2015). Scientific Opinion on the re-evaluation of polyoxyethylene sorbitan monolaurate (E 432), polyoxyethylene sorbitan monooleate (E 433), polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (E 434), polyoxyethylene sorbitan monostearate (E 435) and polyoxyethylene sorbita. In *EFSA Journal* (Vol. 13, Issue 7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4152>
- EFSA ANS, P. on F. A. and N. S. added to F., Mortensen, A., Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Leblanc, J., Lindtner, O., Moldeus, P., Mosesso, P., Parent-Massin, D., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., Lambré, C. (2017). Scientific opinion on the re-evaluation of sorbitan monostearate (E 491), sorbitan tristearate (E 492), sorbitan monolaurate (E 493), sorbitan monooleate (E 494) and sorbitan monopalmitate (E 495) when used as food additives. In *EFSA Journal* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4788>
- Ghosh, S., Cramp, G. L., & Coupland, J. N. (2006). Effect of aqueous composition on the freeze-thaw stability of emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 272(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.07.013>
- Hong, I. K., Kim, S. I., & Lee, S. B. (2018). Effects of HLB value on oil-in-water emulsions: Droplet size, rheological behavior, zeta-potential, and creaming index. *Journal of*

- Industrial and Engineering Chemistry*, 67, 123–131.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.06.022>
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*, 76(6), 626–631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x>
- Kalyanram, P., & Gupta, A. (2022). *Organic & Medicinal Chem IJ Aerosol-Ot Stabilized Micro and Nano-Scale Emulsions for Pharmaceutical Formulations*. December 2017, 6–10. <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2017.04.555646>
- Kim, H. J., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2004). Comparison of droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin at pH 3 and 7. *Langmuir*, 20(14), 5753–5758. <https://doi.org/10.1021/la048899b>
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
- Léonard-Akkari, L., Guégan, S., Courand, F., Couvert, O., Lepage, J. F., Rondeau-Mouro, C., Desriac, N., Mathot, A. G., Leguériel, I., Coroller, L., & Decourcelle, N. (2018). Dispersed phase volume fraction, weak acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Research International*, 109(April), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.016>
- Li, J., McClements, D. J., & McLandsborough, L. A. (2001). Interaction between emulsion droplets and *Escherichia coli* cells. *Journal of Food Science*, 66(4), 570–657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04603.x>
- Li, R., Fang, Q., Li, P., Zhang, C., Yuan, Y., & Zhuang, H. (2021). Effects of emulsifier type and post-treatment on stability, curcumin protection, and sterilization ability of nanoemulsions. *Foods*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/foods10010149>
- Lv, G., Wang, F., Cai, W., & Zhang, X. (2014). Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 447, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.066>
- Mahmood, M. E., & Al-koofee, D. a F. (2013). Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 13(4), 1–7.
- McClements, D. J., Dungan, S. R., German, J. B., Simoneau, C., & Kinsella, J. E. (1993). Droplet Size and Emulsifier Type Affect Crystallization and Melting of Hydrocarbon-in-Water Emulsions. *Journal of Food Science*, 58(5), 1148–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb06135.x>
- McClements, David Julian. (2016). *Food Emulsions*.
- Membre, J. M., Leporq, B., Vialette, M., Mettler, E., Perrier, L., & Zwietering, M. . (2002). Experimental protocols and strain variability of cardinal values (pH and aw) of bacteria using Bioscreen C: microbial and statistical aspects. *Food Micro 2002: Microbial Adaptation to Changing Environments: 18th Symposium of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene*, Lillehammer, Norway, 2002, 143–146. <https://research.wur.nl/en/publications/experimental-protocols-and-strain-variability-of->

cardinal-values-

- Mvou Lekogo, B., Coroller, L., Mafart, P., & Leguerinel, I. (2013). Influence of Long Chain Free Fatty Acids on the Thermal Resistance Reduction of Bacterial Spores. *Food and Nutrition Sciences*, 04(09), 150–157. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.49a1022>
- Mvou Lekogo, B., Coroller, L., Mathot, A. G., Mafart, P., & Leguerinel, I. (2010). Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.023>
- Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
- Noh, D. O., Kim, S. H., & Gilliland, S. E. (1997). Incorporation of Cholesterol into the Cellular Membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, 80(12), 3107–3113. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76281-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76281-7)
- Parker, M. L., Brocklehurst, T. F., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: I—Methods for investigating the form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 601–608. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03105.x>
- Partanen, L., Marttinen, N., & Alatossava, T. (2001). Fats and Fatty Acids as Growth Factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 500–506.
- Pernin, A., Bosc, V., Maillard, M. N., & Dubois-Brissonnet, F. (2019). Ferulic acid and eugenol have different abilities to maintain their inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in emulsified systems. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00137>
- Posocco, P., Perazzo, A., Preziosi, V., Laurini, E., Pricl, S., & Guido, S. (2015). Interfacial tension of oil / water emulsions with mixed non-ionic surfactants : comparison between experiments and molecular simulations. *Royal Society of Chemistry, Equation 2*, 1–3.
- Prachaiyo, P., & McLandsborough, L. A. (2003). Oil-in-water emulsion as a model system to study the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a heterogeneous food system. *Journal of Food Science*, 68(3), 1018–1024. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08281.x>
- Takamura, A., Tomoko, M., Shunichi, N., & Tadamichi, K. (1979). Effects of Tween and Span group emulsifiers on the stability of O/W emulsions. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 27(12), 2921–2926. <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
- Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S., & Hayashi, M. (2011). Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(4), 420–424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.010>
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2012). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food and Function*, 3(3), 290–301. <https://doi.org/10.1039/c2fo10198j>
- Weiszhar, Z., Czucz, J., Révész, C., Rosivall, L., Szebeni, J., & Rozsnyay, Z. (2012). Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, tween-80 and tween-20. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4), 492–498.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.09.016>

Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00660-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00660-2)



---

## **Chapitre 4 :**

Influence de la formulation d'émulsions  
et d'une matrice fromagère sur  
l'activité inhibitrice de germination et de  
croissance de l'acide lactique et de  
l'acide caprylique

---

Les propriétés physico-chimiques des acides organiques influencent leur activité inhibitrice en milieux aqueux (Chapitre 2). L'activité inhibitrice de croissance des acides organiques dans un milieu nutritif liquide augmente avec leur lipophilicité. Cette dernière est favorisée par un pKa élevé, augmentant la proportion d'acide non dissocié et par un nombre élevé de carbones dans leur structure moléculaire, conférant un coefficient de partage (log P) plus élevé. Lorsque ces acides sont ajoutés à un système biphasique plus complexe, tel qu'une émulsion huile dans eau modèle, la présence d'une phase grasse module l'activité inhibitrice des acides lipophiles tels que l'acide caprylique et l'acide laurique (Chapitre 3).

Il est désormais intéressant de se demander si la nature de cette phase grasse et si les autres paramètres de la formulation d'une émulsion H/E influencent le comportement et l'activité inhibitrice de germination et de croissance d'acides antimicrobiens aux caractéristiques physicochimiques différentes. De plus, ces premiers résultats ont été obtenus en émulsions dites modèles, sont-ils transférables à des émulsions H/E composées d'ingrédients utilisés dans l'élaboration de produits laitiers et plus particulièrement à une matrice fromagère ?

L'objectif du Chapitre 4 est d'étudier l'impact de la modification de la formulation d'une émulsion H/E sur l'activité inhibitrice de germination et de croissance de deux composés inhibiteurs dont les propriétés physico-chimiques diffèrent : un acide organique faible, l'acide lactique, et un acide gras à moyenne chaîne de carbone, l'acide caprylique. La stratégie a été de formuler des émulsions H/E dont le degré de complexité augmente par rapport aux émulsions modèles étudiées dans le chapitre précédent, et dont les ingrédients utilisés se rapprochent des composants de matrices alimentaires réelles, notamment ceux utilisés dans les produits laitiers. L'effet du changement des tensioactifs non ioniques, le Tween 80 et le Span 80, par des protéines lactières (des caséinates de sodium) ainsi que l'effet du changement de l'hexadécane comme phase grasse par de la matière grasse laitière, seront étudiés sur le comportement et les mécanismes d'action des acides organiques en émulsion. En effet, ces modifications pourront influencer la dissociation des acides, leur affinité pour les différentes phases et donc leur répartition et leurs interactions avec les différents composants au sein des émulsions.

## 1. Introduction

La persistance des spores dans les aliments, engendrée par leurs propriétés de résistance élevées aux différents traitements thermiques ou physiques ayant lieu lors de la transformation des aliments, est un enjeu majeur pour les industries alimentaires en particulier l'industrie laitière (Wells-Bennik et al., 2016). *Bacillus cereus* est une bactérie pathogène fréquemment associée à des épisodes d'intoxications alimentaires en raison de sa capacité à produire des toxines émétiques comme le céréulide ou des entérotoxines telles que la cytotoxine K, l'hémolysine BL ou encore l'entérotoxine non hémolytique (NHE) (Jovanovic et al., 2021). Sa présence et sa croissance ont été constatées dans de nombreux produits laitiers tels que le lait cru, le lait pasteurisé, le lait UHT, le fromage frais, les poudres de lait, le lait fermenté, etc. (Spanu et al., 2016; Svensson et al., 2006; Erica Tirloni et al., 2022; Wong et al., 1988; Zhao et al., 2020), représentant au total 3% des foyers épidémiques causés par *B. cereus* (European Food Safety Authority, 2016).

Afin de maîtriser le risque de contamination des produits laitiers par des bactéries sporulées, l'utilisation d'acides organiques en tant qu'agents antimicrobiens a largement été étudiée (Tirloni et al., 2019; Tirloni et al., 2021). Cependant l'efficacité antibactérienne de ces acides est modifiée au sein de matrices alimentaires par rapport à des milieux de culture de laboratoire, en raison de la complexité physico-chimique de ces matrices et des caractéristiques physico-chimiques des acides organiques, en particulier leur lipophilicité (Weiss et al., 2015).

Dans ce contexte, il est important pour les industries laitières de mieux comprendre comment la formulation de matrices spécifiques (c'est-à-dire des matrices biphasiques et structurées) influencent la croissance des microorganismes et l'activité inhibitrice de composés antimicrobiens. Au sein d'émulsions huile dans eau (H/E) alimentaires, la croissance bactérienne a lieu uniquement dans la phase aqueuse (Wilson et al., 2002), et la phase huileuse est présente sous forme de gouttelettes polydispersées. Cette phase huileuse impacte la structure de l'émulsion, la répartition et la distribution des composés chimiques à travers les phases, et peut affecter la physiologie de la bactérie, comme par exemple son taux de croissance (Brocklehurst & Wilson, 2000; Šoljić et al., 2018). De plus, l'interface entre la phase aqueuse et la phase grasse, constituée en majorité de molécules émulsifiantes, peut affecter localement les conditions du milieu et la capacité des microorganismes à interagir avec les différents composés, influençant leur prolifération (Robins & Wilson, 1994). De nombreuses études ont démontré l'effet de la structure d'une émulsion H/E sur la cinétique de croissance microbienne

et sur les propriétés antibactériennes de composés inhibiteurs en s'intéressant particulièrement à l'influence de la taille des gouttelettes de l'émulsion (Buranasuksombat et al., 2011; Kadri et al., 2017; Terjung et al., 2012), à l'ajout d'agents épaississants ou gélifiants au sein de la phase aqueuse (Mertens et al., 2009; Zalazar et al., 2016) ou encore à l'impact du ratio d'huile (Brocklehurst et al., 1995; Prachaiyo & McLandsborough, 2003; Verheyen et al., 2020). Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'effet de la composition et de la nature des ingrédients utilisés pour la formulation d'émulsions huile dans eau sur la germination et la croissance de bactéries sporulées et sur les propriétés inhibitrices d'acides organiques.

L'objectif de cette étude est donc d'évaluer, dans un premier temps, l'impact de la formulation d'une émulsion H/E sur l'activité inhibitrice de germination et de croissance de deux acides organiques, l'acide lactique et l'acide caprylique. Pour cela, l'influence de la nature de la phase grasse (hexadécane ou matière grasse laitière) et de la nature de l'émulsifiant utilisé pour stabiliser le système (tensioactifs non ioniques ou protéines lactières) a été étudiée sur la dynamique de croissance et de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur l'activité inhibitrice des acides, à travers l'utilisation de systèmes alimentaires modèles et artificiels (i.e des émulsions H/E de ratio 20/80). Dans un second temps, une matrice fromagère, de type fromage frais, sans ferments lactiques, a été élaborée à l'échelle du laboratoire afin d'étudier la transférabilité de ces observations à une échelle industrielle et d'évaluer l'impact d'une matrice laitière plus complexe sur la croissance bactérienne et sur l'efficacité d'inhibition de l'acide lactique et de l'acide caprylique.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériel biologique, conditions de croissance et sporulation

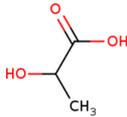
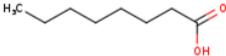
La souche utilisée pour cette étude est une souche psychrotrophe du groupe *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* KBAB4, récemment reclassifiée en tant que *B. mycoides* KBAB4 (Liu et al., 2018). La souche est stockée à -80°C sous forme d'aliqots de 1 ml, dans du BHI (Brain Heart Infusion, Condalab, Madrid, Espagne) dilué dans du glycérol 20% (v/v). Pour réaliser la première préculture, l'aliqot de 1 ml décongelé et ajouté dans 100 ml de BHI dans un erlen de 250 ml. L'erlen est incubé sous agitation (100 rpm) pendant 8 h à 30°C. Puis, 1 ml de cette première préculture est inoculé dans 100 ml de BHI et incubé 16 h dans les mêmes conditions que précédemment. Enfin, 0,1 ml de cette seconde préculture est ajouté dans 100 ml de BHI et incubé à 30°C pendant 6 h, sous agitation. Après 6 h de croissance, la culture est centrifugée à 6000 g pendant 15 min à 12°C et les cellules sont resuspendues dans 100 ml de milieu de sporulation, appelé SMB (Sporulation Mineral Buffer), introduit par Baril et al. (2011). Le milieu est incubé pendant 5 jours à 30°C, sous agitation, puis centrifugé à 6000 g pendant 15 min à 12°C. Les spores sont ensuite resuspendues dans 5 ml d'eau distillée stérile et stockées à 4°C. La concentration finale en spores est égale à  $1 \cdot 10^8$  UFC/ml, correspondant aux cellules résistantes à un traitement thermique de 10 min à 80°C.

### 2.2. Les acides inhibiteurs

Deux acides organiques sont étudiés en tant qu'antimicrobiens, l'acide lactique (90% de pureté, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) et l'acide caprylique (98% de pureté, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Des solutions à 1 M ont été réalisées dans de l'eau distillée pour l'acide lactique et dans de l'éthanol à 70% pour l'acide caprylique en vue de l'ajout des acides dans les émulsions. Dans les matrices fromagères, l'acide lactique a été ajouté pur et l'acide caprylique a été préalablement dilué dans de l'éthanol 70% pour obtenir une solution molaire à 120 mM. La concentration finale en éthanol ajoutée dans le milieu n'a pas d'impact sur la germination et la croissance bactérienne ( $C_{\text{finale éthanol}} < 0,15$  % v/v). Les concentrations finales en acide lactique et en acide caprylique étudiées dans les milieux sont respectivement égales à 250 mM et 0,075 mM d'acide total. Ces concentrations ont été sélectionnées suite à la détermination des CMI en milieu aqueux (Chapitre 2), pour permettre la visualisation de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sans l'inhiber totalement

dans du bouillon nutritif. Les propriétés physico-chimiques de ces acides et les concentrations étudiées dans les milieux à pH 6,0 sont regroupées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques et concentrations des acides étudiés dans les milieux

Nom (CAS)	Formule chimique	Structure moléculaire	logP	pKa	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)
<b>Acide lactique</b> (79-33-4)	$C_3H_6O_3$		-0,72	3,86	90,08	250
<b>Acide caprylique</b> (124-07-2)	$C_8H_{16}O_2$		3,05	4,89	144,21	0,075

## 2.3. Préparation des phases des émulsions

### 2.3.1. Préparation des phases aqueuses

Les phases aqueuses des émulsions sont composées de bouillon nutritif (BN) à 20 g/L (Biokar Diagnostics, Beauvais France) supplémentées par du Tween 80 (T80) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) ou par des caséinates de sodium (CAS) (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) afin d'obtenir des concentrations finales en émulsifiants respectivement égales à 1,5% (p/v) et 10% (p/v) dans une émulsion H/E de ratio 20/80. Des volumes appropriés des solutions molaires d'acides sont ajoutés au bouillon nutritif pour atteindre les concentrations finales souhaitées (Tableau 9). Le pH du milieu est ensuite ajusté à pH 6,0 avec de l'acide chlorhydrique 1 M ou de l'hydroxyde de sodium à 10 M. Le Tween 80 est directement mélangé au bouillon nutritif par un agitateur magnétique et, après une dissolution complète, la phase est stérilisée par filtration sur filtre 0,22  $\mu$ m (Stericup, Millipore). Les caséinates sont pesés séparément puis dispersés dans le bouillon nutritif grâce à un mélangeur Silverson (Silverson, France) pendant 2 minutes à vitesse maximale. La solution dispersée de caséinates est stockée à 4°C toute la nuit, ce qui permet de réduire la quantité de mousse formée lors de la dispersion. La phase aqueuse avec caséinates est ensuite stérilisée par autoclavage, avec un cycle de 121°C pendant 20 min pour les conditions sans acide et avec acide caprylique et avec un cycle de 10 min à 110°C pour la condition avec acide lactique. Ce second cycle d'autoclavage a été sélectionné de manière à obtenir une stérilisation suffisante du milieu, permettant l'élimination de la flore contaminante, sans entraîner la précipitation des

caséinates sous l’effet de la chaleur en présence d’acide lactique, qui a été observée à un cycle plus élevé. Les phases aqueuses sont stockées quelques heures à 55°C avant émulsification.

### 2.3.2. Préparation des phases grasses

Deux phases grasses ont été étudiées dans les émulsions : l’hexadécane (HEX) (99% de pureté, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de la matière grasse laitière (MGLA) (fournie par un industriel partenaire). L’hexadécane est supplémenté par du Span 80 pour atteindre une concentration finale de 1,5% (p/v) dans l’émulsion H/E de ratio 20/80 contenant également du Tween 80 dans la phase aqueuse. Il n’est pas supplémenté par un tensioactif lorsqu’il est étudié dans les émulsions H/E 20/80 avec caséinates. La matière grasse est chauffée au micro-onde jusqu’à liquéfaction complète, la température maximale atteinte est de 60°C. Les phases grasses sont filtrées sur filtre 0,22 µm (Stericup, Millipore) et stockées à 55°C avant émulsification, pour maintenir l’état liquide.

## 2.4. Fabrication des émulsions

En fonction de la composition de l’émulsion étudiée, le procédé de fabrication est différent. Le tableau 10 résume les différentes émulsions étudiées, la composition des phases et leur procédé de fabrication. Toutes les émulsions sont réalisées en tripliquas pour effectuer le suivi de croissance et de germination (n=2) et pour vérifier la stabilité (n=1).

Tableau 10: Composition et procédé de fabrication des émulsions étudiées

Noms des émulsions	HEX_T80	HEX_CAS	MGLA_CAS
<b>Composition de la phase aqueuse</b>	Bouillon nutritif + Tween 80 (1,5% p/v)	Bouillon nutritif + Caséinates (10 % p/v)	Bouillon nutritif + Caséinates (10 % p/v)
<b>Composition de la phase grasse</b>	Hexadécane + Span 80 (1,5 % p/v)	Hexadécane	Matière Grasse Laitière
<b>Procédé de fabrication (paramètres)</b>	Sonication (1 min – 60 %)	Ultra-Turrax (90 sec – 24000 rpm) + Sonication (1 min – 60 %)	Ultra-Turrax (90 sec – 24000 rpm) + Sonication (2 x 3 min – 60 %)

*2.4.1. Emulsions H/E 20/80 composées d'hexadécane et de Tween 80 (HEX\_T80)*

Les émulsions composées d'hexadécane et de Span 80 comme phase grasse et de bouillon nutritif et de Tween 80 comme phase aqueuse, sont réalisées dans les proportions 20/80 (v/v) pour un volume total de 100 ml. Le mélange de ces deux phases est réalisé par sonication (sonifier Branson 450 W, 20 kHz) pendant 1 minute à 60% d'amplitude, à l'aide d'une sonde de 19 mm de diamètre. La température maximale atteinte lors de l'homogénéisation de ces émulsions est inférieure à 40°C.

Afin de garantir la conception des émulsions dans des conditions aseptiques, une décontamination de la sonde est réalisée avant et après la sonication par l'action de lingettes désinfectantes à l'acide peracétique à 0,09% (m/m) (PERA Lingettes, Franklab, France). Après deux temps d'application de 10 minutes, la sonde est rincée à l'eau distillée stérile et séchée avec une compresse stérile. Une vérification de l'asepsie est réalisée sur la sonde (écouvillonnage) après chaque procédure de désinfection.

*2.4.2. Emulsions H/E composées d'hexadécane et de caséinates (HEX\_CAS)*

Pour un volume final de 100 ml, 20 ml d'hexadécane filtré sont ajoutés à 80 ml de phase aqueuse composée de bouillon nutritif supplémenté par des caséinates de sodium. Une première étape d'homogénéisation des deux phases, appelée pré-homogénéisation, est effectuée. Les phases sont mélangées pendant 90 s à 24000 rpm à l'Ultra-Turrax (T25 IKA, Allemagne), sous PSM à l'aide d'embouts stériles afin de garantir les conditions aseptiques. Ensuite, le mélange est sonifié pendant 1 minute à 60% d'amplitude avec une sonde de 19 mm de diamètre préalablement décontaminée. La température maximale atteinte lors de la sonication de ces émulsions est inférieure à 60°C.

*2.4.3. Emulsions H/E composée de matière grasse laitière et de caséinates (MGLA\_CAS)*

Les 80 ml de phase aqueuse (composée de bouillon nutritif et de caséinates) sont mélangés au 20 ml de matière grasse laitière filtrée, grâce à l'Ultra-Turrax pendant 90 s à 24000 rpm, dans des conditions aseptiques. Le mélange est ensuite homogénéisé par sonication, pendant 2 fois 3 min à 60% d'amplitude avec un temps de repos de 10 minutes sur glace entre les deux homogénéisations. La sonde de 19 mm est préalablement décontaminée et rincée à l'eau stérile entre chaque homogénéisation. La température maximale atteinte lors de la sonication est égale à 80°C.

## **2.5. Mesures granulométriques et suivi de stabilité**

La distribution granulométrique des émulsions et le diamètre des gouttelettes ont été mesurés par granulométrie laser (Malvern MS3000). Les mesures ont été réalisées sur des émulsions stériles après 24h de stockage à 30°C. Les échantillons ont préalablement été dilués dans une solution composée de 0,1% de SDS, avant le passage dans le granulomètre.

La stabilité des émulsions a également été mesurée par diffusion multiple de la lumière à l'aide d'un Turbiscan (Formulation, France). La stabilité des émulsions a été suivie sur des émulsions non inoculées, sur une période identique à la durée de la croissance bactérienne, lors d'un stockage à 30°C. Le TSI (Turbiscan Stability Index) de chaque émulsion a été calculé et utilisé pour comparer leur stabilité. Une émulsion possédant une valeur de TSI inférieure ou égale à 3, lors d'un stockage de 4 jours à 30°C, est considérée comme stable. Les mesures de granulométrie et de stabilité ont été réalisées en triplicatas sur chaque émulsion étudiée.

## **2.6. Fabrication de la matrice fromagère**

Un litre de lait entier stérilisé UHT (Casino, France) a été mélangé puis réparti stérilement par volume de 20 ml dans des tubes de 50 ml. Les tubes sont réchauffés au bain marie à 35°C pendant 15 minutes. Lorsque la température du lait a atteint 35°C, 2 ml de solution de sels 10X sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale dans le lait de 1,3 % (v/v) de NaCl (Acros Organics, Geel, Belgique) et 0,43 % (v/v) de CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Ensuite, 200 µl de présure microbienne 100X (MICROLANT Classic, Chr. Hansen, Danemark) sont dilués puis ajoutés au lait réchauffé pour atteindre une concentration finale de 55 IMCU/L. Les suspensions en tube sont mélangées au vortex et incubés à 35°C au bain marie pendant 1 h pour permettre la coagulation. Après cette étape de coagulation, les tubes sont refroidis pendant minimum 2h à 4°C puis centrifugés à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré, puis une seconde centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions. Le surnageant résiduel est de nouveau retiré et les tubes sont conservés à 4°C pendant 48h maximum avant utilisation. Le volume final du fromage dans le tube est d'environ 8 ml. A partir du pourcentage de matière sèche connue du lait entier et du lactosérum, du volume de lait initial et du volume de surnageant (lactosérum) retiré, la matière sèche des matrices fromagères a pu être calculée. La matière sèche de la matrice fromagère est comprise entre 23 et 25 %, correspondant aux valeurs de matière sèche d'un fromage frais de type Burgos (Hnosko et al., 2009).

Par ailleurs, la masse volumique des matrices fromagère a également été calculée grâce à l’équation suivante :

$$\rho_{matrice\ fromagère} = \frac{m_{matrice\ fromagère}}{(V_{lait} - V_{surnageant})}$$

Avec  $\rho_{matrice\ fromagère}$  la masse volumique (en g/ml),  $m_{matrice\ fromagère}$  la masse de la matrice pesée après fabrication (en g),  $V_{lait}$  le volume de lait entier initial (en ml) et  $V_{surnageant}$ , le volume de surnageant ou lactosérum retiré (en ml). En moyenne, la masse volumique des matrices est égale à 0,96 g/ml.

Avant d’inoculer les matrices fromagères avec des spores de *B. weihenstephanensis* KBAB4, les acides inhibiteurs sont ajoutés et le pH est ajusté à environ 6,0, de manière stérile. Pour cela, les solutions ajoutées ont été préalablement stérilisées par filtration (0,22  $\mu$ m, Stericup, Millipore). Des concentrations en acide lactique et caprylique supplémentaires ( $C_{AL} = 125$  mM et  $C_{AC} = 0,25$  mM) ont été étudiées dans les matrices fromagères ainsi que le mélange des deux acides ( $C_{AL} = 125$  mM +  $C_{AC} = 0,075$  mM ou 0,25 mM). Les volumes d’acides inhibiteurs, d’acide chlorhydrique 1 M ou d’hydroxyde de sodium 10 M ajoutés, pour atteindre un pH final de 6,0, en fonction des conditions étudiées sont regroupés dans le tableau 11. Après dépôt des différents volumes dans les tubes de fromages, ces derniers sont mélangés à l’aide d’une spatule stérile puis de l’eau distillée stérile est ajoutée à qsp 320  $\mu$ l.

Tableau 11: Conditions testées en acides inhibiteurs dans les matrices fromagères et volumes d’acide correspondants, d’acide chlorhydrique 1M ou d’hydroxyde de sodium (10 M) ajoutés. Les lignes grisées correspondent aux conditions identiques à celles des émulsions H/E 20/80.

Conditions (Acronyme)	Acide caprylique (120 mM)		Acide lactique (12 M)		HCl (1M)	NaOH (10 M)
	Volume ajouté ( $\mu$ l)	Concentration finale (mM)	Volume ajouté ( $\mu$ l)	Concentration finale (mM)	Volume ajouté ( $\mu$ l)	Volume ajouté ( $\mu$ l)
Sans Inhibiteur (SI)	-	0	-	0	30	-
+ A. caprylique (AC 0,075)	5	0,075	-	0	40	-
+ A. caprylique (AC 0,25)	17	0,25	-	0	30	-
+ A. lactique (AL 125)	-	0	85	125	-	60
+ A. lactique (AL 250)	-	0	170	250	-	150
+ A. caprylique + A. lactique (AL125+AC0,075)	5	0,075	85	125	-	60
+ A. caprylique + A. lactique (AL125+AC0,25)	17	0,25	85	125	-	60

## **2.7. Inoculation et suivi de la germination et de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les différents milieux**

### *2.7.1. Inoculation et énumération des spores et cellules totales dans les émulsions 20/80*

Afin d'étudier la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les différentes émulsions réalisées à pH 6,0, ces dernières ont été inoculées avec une suspension de spores diluée dans de l'eau distillée stérile, pour atteindre une concentration finale de  $10^5$  UFC/ml dans 100 ml de milieu. La germination et la croissance de la souche ont également été étudiées et comparées dans des milieux aqueux en présence ou non des émulsifiants étudiés, c'est-à-dire dans du bouillon nutritif seul (BN), dans du bouillon nutritif supplémenté par 1,5% (p/v) de Tween 80 (BN\_T80) et dans du bouillon nutritif supplémenté par des caséinates de sodium à une concentration de 10% (p/v) (BN\_CAS), ajustés à pH 6,0. Les concentrations en acide lactique et en acide caprylique sont identiques dans les milieux aqueux et dans les émulsions H/E 20/80 (Tableau 9). Une fois inoculés par la suspension de spores, les milieux aqueux sont incubés à 30°C sous agitation (110 rpm) et les émulsions à 30°C sans agitation. Puis, à intervalles de temps réguliers, 150 µl de milieux aqueux ou 188 µl d'émulsion sont prélevés dans 1350 µl d'eau physiologique stérile (NaCl 9 g/L) et dilués en série puis ensemencés sur de la gélose nutritive par le Spiral (Interscience EasySpiral, France). Lors de ces mêmes temps d'intervalles, 500 µl de milieux aqueux et d'émulsions H/E 20/80 sont prélevés et traités thermiquement pendant 10 min à 80°C afin d'inactiver les cellules végétatives et sélectionner les cellules thermorésistantes. Les échantillons traités sont ensuite dilués dans de l'eau physiologique puis ensemencés en surface sur gélose nutritive. Les boîtes de gélose nutritive sont incubées à 30°C pendant 24h. Les concentrations en cellules totales (non traitées) et en cellules thermorésistantes ou spores (traitées à 80°C pendant 10 min) sont déterminées en log(UFC/ml). Les suivis de croissance et de germination ont été réalisés en dupliquas pour toutes les conditions étudiées.

### *2.7.2. Inoculation et énumération des spores et cellules totales dans la matrice fromagère*

Les matrices fromagères ont été inoculées par 40 µl d'une suspension de spores diluée dans de l'eau distillée stérile, afin d'obtenir une concentration initiale en spores égale à  $10^5$  UFC/g dans les fromages. Une fois inoculés, les fromages sont mélangés à l'aide d'une spatule stérile puis incubés à 30°C afin d'étudier la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans ces matrices. A chaque point de prélèvement, l'échantillon de fromage est pesé

et son volume est calculé grâce à sa masse volumique précédemment déterminée (0,96 g/ml). Le fromage est alors dilué en ajoutant deux volumes d'eau distillée stérile, puis mélangé au vortex pendant 2 minutes. La suspension de fromage est pipetée, diluée dans de l'eau physiologique et ensemencée sur gélose nutritive par l'ensemencement automatique (Interscience, EasySpiral, France). De plus, à certains points de prélèvement, la suspension de fromage est traitée thermiquement pendant 10 minutes à 80°C au bain marie, afin d'inactiver les cellules végétatives présentes dans l'échantillon. Cette suspension traitée est diluée dans de l'eau physiologique et est ensemencée en surface sur gélose nutritive. Les boîtes de gélose nutritive sont incubées à 30°C pendant 24h. Les concentrations en cellules totales (non traitées) et en cellules thermorésistantes ou spores (traitées à 80°C pendant 10 min) sont déterminées en log(UFC/g). Les suivis de croissance et de germination ont été réalisés en dupliquas pour toutes les conditions étudiées.

## 2.8. Modélisation et analyses statistiques

### 2.8.1. Modèle de germination

Le pourcentage de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux a été calculé à partir de la concentration en cellules thermorésistantes (spores) déterminée à un temps  $t$  ( $N_S(t)$ ) sur la concentration initiale de la suspension de spores ajoutée au milieu ( $N_{S0}$ ). L'évolution du pourcentage de germination  $P_{germ}$  a été ajustée par le modèle suivant (équation 20), inspiré de Trunet et al. (2020):

$$P_{germ}(t) = \tau_{germ} \times \left[ 1 - 10^{-\left(\frac{t}{t_{germ}}\right)^{S_{germ}}} \right] \quad (20)$$

Avec  $P_{germ}(t)$  le pourcentage de germination des spores au temps  $t$ ,  $\tau_{germ}$  la proportion de maximale de spores capable de germer,  $t_{germ}$  le temps pour atteindre 90% du nombre de spores germées dans la population de spores initiale,  $S_{germ}$  le paramètre de forme de Weibull décrivant la dispersion de  $t_{germ}$  dans la population (plus la valeur de  $S_{germ}$  est grande, plus la dispersion est faible).

Les paramètres du modèle ( $\tau_{germ}$ ,  $t_{germ}$  et  $S_{germ}$ ) sont estimés par minimisation de la somme des carrés des écarts (SCE) en utilisant le pourcentage de germination observé et la fonction nlinfit (nlinfit function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). Les intervalles de confiance à 95% sont estimés par la fonction nlparci (nlparci function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA).

### 2.8.2. *Modèle de croissance*

Les paramètres de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux ont été estimés grâce au modèle de Rosso et al., (1995) par minimisation de la somme des carrés des écarts (SCE) en utilisant le logarithme de la concentration en cellules totales observée. La fonction utilisée est nlinfit (nlinfit function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA) et les intervalles de confiance à 95% ont été calculés par la fonction nlparci (nlparci function, MatlabR2020a, MathWorks, Natick, MA, USA).

Le modèle de Rosso est décrit par l'équation suivante (équation 21) :

$$\ln(N_t) = \begin{cases} \ln(N_0), & t < \lambda \\ \ln\left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0}\right)^*e^{-\mu_{max}*(t-\lambda)}}\right), & t \geq \lambda \end{cases} \quad (21)$$

Avec  $N_t$  la concentration en cellules totales au temps  $t$ ,  $N_0$  la concentration en cellules totales initiale,  $\lambda$  le temps de latence,  $\mu_{max}$  la vitesse maximale de croissance,  $N_{max}$  la concentration en cellules totales maximale.

### 2.8.3. *Analyses statistiques*

Les qualités d'ajustement des modèles ont été évaluées grâce à la RMSE (Root Mean Square Error), calculée par l'équation suivante (équation 22) :

$$RMSE = \sqrt{\frac{SCE}{n}} \quad (22)$$

Avec  $SCE$  la sommes des carrés des écarts et  $n$  le nombre de données expérimentales. Plus la valeur de RMSE est faible, plus le modèle est bien ajusté aux données.

L'analyse statistique de l'influence des acides inhibiteurs et de la formulation du milieu étudié sur les paramètres de croissance et de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ainsi que sur les paramètres physico-chimiques (distribution granulométrique et diamètre des gouttelettes) des émulsions a été réalisée par l'analyse de la variance et la comparaison multiple des moyennes (anovan, multcompare functions, Matlab2020a, MathWorks, Natick, MA, USA). Pour chaque test statistique, le risque  $\alpha$  est fixé à 5%.

### 3. Résultats

#### 3.1. Effet de la formulation et des acides sur la structure et la stabilité des émulsions H/E 20/80

La caractérisation physico-chimique des émulsions a été réalisée en mesurant le diamètre des gouttelettes et la distribution de la taille des particules, par diffraction de la lumière après 24h de stockage à 30°C. Les résultats de ces mesures, pour chaque condition étudiée, ont été regroupés dans la Figure 27. L'ajout d'acide lactique et d'acide caprylique dans les émulsions 20/80 HEX\_T80 et MGLA\_CAS n'a pas d'impact sur le diamètre des gouttelettes et la distribution granulométrique. Ces émulsions possèdent des gouttelettes de diamètres moyens respectivement égaux à  $0,393 \pm 0,001 \mu\text{m}$  et  $0,454 \pm 0,001 \mu\text{m}$  dans les conditions optimales et des distributions granulométriques respectivement égales à  $0,626 \pm 0,001$  et  $0,675 \pm 0,001$ . La formulation et le procédé de fabrication des émulsions H/E 20/80 HEX\_T80 et MGLA\_CAS permettent d'obtenir des caractéristiques physicochimiques significativement identiques. Cependant, les résultats montrent que les émulsions composées d'hexadécane et de caséinates (HEX\_CAS) possèdent un diamètre moyen ( $3,601 \pm 0,239 \mu\text{m}$  sans acide) et une distribution granulométrique ( $3,619 \pm 0,367$  sans acide) significativement plus élevés que les émulsions HEX\_T80 et MGLA\_CAS. De plus, l'ajout d'acide a un impact sur ces valeurs. La présence d'acide caprylique diminue le diamètre moyen des gouttelettes et augmente la distribution granulométrique par rapport à la condition sans acide et inversement lorsqu'il y a présence d'acide lactique.

Par ailleurs, la stabilité des émulsions a également été vérifiée après 24 heures de stockage à 30°C et sur une période identique à la durée de la croissance bactérienne mesurée, c'est-à-dire maximum 4 jours. Pour cela, les TSI (Turbiscan Stability Index) ont été calculés pour chaque échantillon, et regroupés dans le tableau 12. Sur une période de 24h, les TSI moyens obtenus pour chaque émulsion sont inférieurs à 3,0, ce qui témoigne de la stabilité des émulsions et de la faible apparition de phénomènes de déstabilisation. Après 4 jours de stockage à 30°C, les émulsions étudiées sont toujours stables (TSI < 3). Cependant, il semblerait que l'ajout d'acide lactique augmente significativement la valeur de TSI dans les émulsions HEX\_CAS et MGLA\_CAS après 24h et 4 jours de stockage à 30°C. Bien que les émulsions HEX\_CAS aient des diamètres de gouttelettes supérieurs aux autres formulations, cela ne semble pas impacter leur stabilité au cours du temps car les TSI des émulsions sans acide ne sont pas significativement différents à 24h et 4 jours.

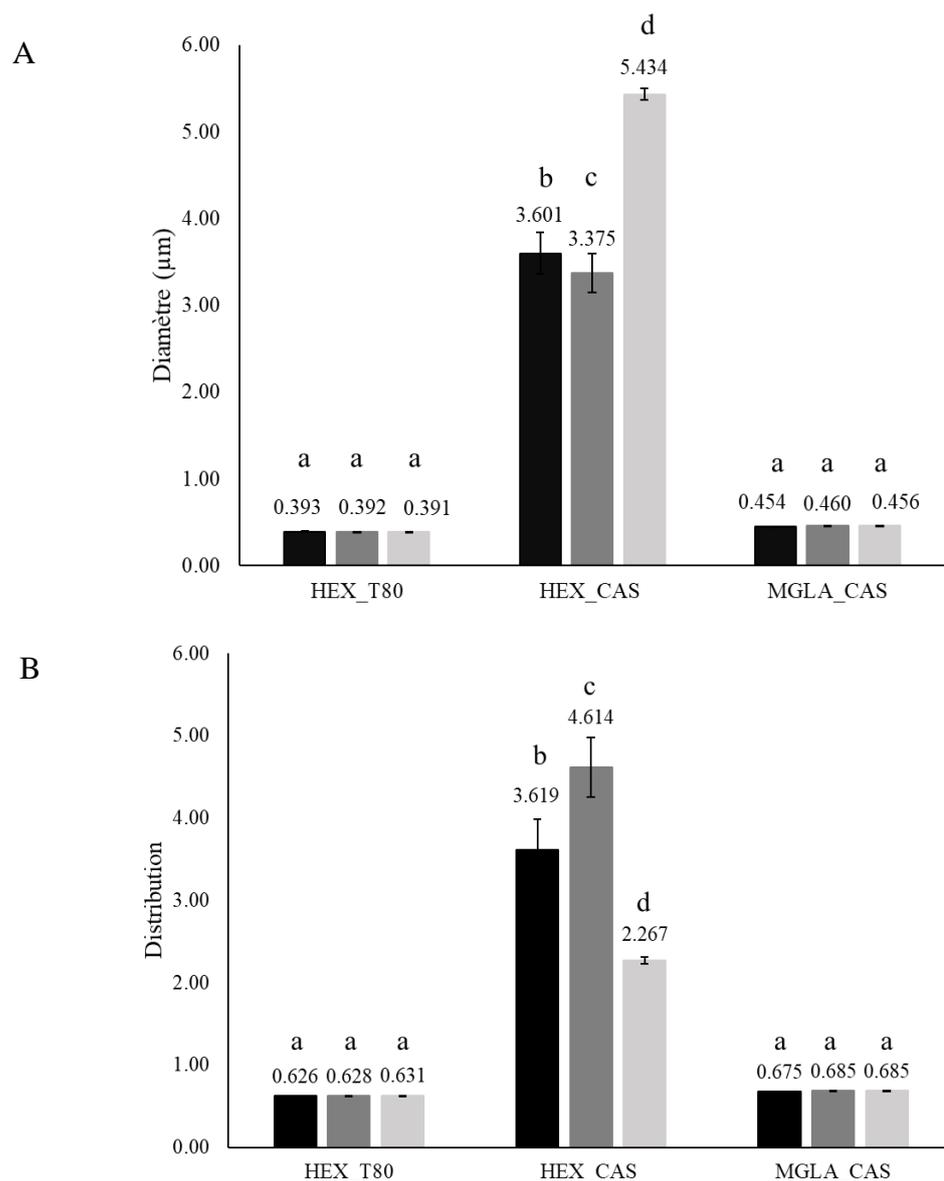


Figure 27 : Diamètres des gouttelettes (A) et distribution de la taille des gouttelettes (B) dans les émulsions en fonction de la formulation et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair), après 24 h à 30°C. Les lettres diffèrent les échantillons dont les moyennes sont significativement différentes ( $p_{value} = 0,05$ )

Tableau 12 : TSI des émulsions après 24h et 4 j à 30°C, en fonction de la formulation

Formulation	Sans acide		A. caprylique (0,075 mM)		A. lactique (250 mM)	
	TSI 24 h	TSI 4 j	TSI 24 h	TSI 4 j	TSI 24 h	TSI 4 j
HEX_T80	0,37 ± 0,06	1,40 ± 0,20	0,48 ± 0,18	1,68 ± 0,48	0,30 ± 0,07	1,20 ± 0,19
HEX_CAS	0,40 ± 0,00	1,46 ± 0,09	0,46 ± 0,09	1,66 ± 0,15	0,82 ± 0,16	2,40 ± 0,19
MGLA_CAS	0,36 ± 0,13	1,20 ± 0,36	0,18 ± 0,08	0,74 ± 0,27	0,90 ± 0,46	2,54 ± 0,77

Chapitre 4 – Influence de la formulation sur l’activité inhibitrice de l’acide lactique et caprylique

Tableau 13 : Paramètres de germination (A) et de croissance (B) de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux étudiés en fonction de l’absence d’acide, de l’ajout de 0,075 mM d’acide caprylique et de l’ajout de 250 mM d’acide lactique. Les valeurs sont les moyennes des estimations réalisées sur deux répliquas biologiques indépendants et leur écart-type (BN = Bouillon Nutritif, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium, HEX = Hexadécane, MGLA = Matière Grasse Laitière).

A	Milieux	Sans acide			A. caprylique (0,075 mM)			A. lactique (250 mM)		
		$t_{\text{germ}}$ (h)	$S_{\text{germ}}$	$\tau_{\text{germ}}$	$t_{\text{germ}}$ (h)	$S_{\text{germ}}$	$\tau_{\text{germ}}$	$t_{\text{germ}}$ (h)	$S_{\text{germ}}$	$\tau_{\text{germ}}$
	BN	0,199 ± 0,256	0,528 ± 0,268	0,999 ± 0,002	5,948 ± 4,984	0,481 ± 0,071	1,000 ± 0,000	0,453 ± 0,403	0,430 ± 0,056	0,976 ± 0,026
	BN_T80	0,119 ± 0,146	0,425 ± 0,107	1,000 ± 0,000	0,136 ± 0,179	0,358 ± 0,114	1,000 ± 0,000	1,044 ± 0,959	0,683 ± 0,047	0,963 ± 0,042
	BN_CAS	0,092 ± 0,070	0,505 ± 0,131	1,000 ± 0,000	0,230 ± 0,203	0,507 ± 0,129	1,000 ± 0,000	5,958 ± 0,498	0,673 ± 0,194	0,867 ± 0,088
	HEX_T80	0,007 ± 0,006	0,282 ± 0,143	1,000 ± 0,000	0,039 ± 0,050	0,344 ± 0,085	1,000 ± 0,000	0,203 ± 0,072	0,314 ± 0,166	0,999 ± 0,001
	HEX_CAS	0,060 ± 0,063	0,42 ± 0,099	1,000 ± 0,000	0,095 ± 0,116	0,469 ± 0,208	1,000 ± 0,000	1,844 ± 0,546	0,352 ± 0,059	0,910 ± 0,028
	MGLA_CAS	0,120 ± 0,088	0,670 ± 0,016	1,000 ± 0,000	0,101 ± 0,131	0,475 ± 0,252	1,000 ± 0,000	4,648 ± 1,913	0,390 ± 0,077	0,859 ± 0,018
	Matrice fromagère	0,487 ± 0,675	0,477 ± 0,052	0,974 ± 0,006	0,016 ± 0,012	0,041 ± 0,010	1,000 ± 0,000	0,040 ± 0,013	0,315 ± 0,245	0,968 ± 0,022

B	Milieux	Sans acide		A. caprylique (0,075 mM)		A. lactique (250 mM)	
		$\mu_{\text{max}}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$\mu_{\text{max}}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)	$\mu_{\text{max}}$ (h <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (h)
	BN	1,629 ± 0,086	3,07 ± 0,43	1,097 ± 0,028	4,06 ± 0,20	1,273 ± 0,008	5,14 ± 0,29
	BN_T80	1,380 ± 0,119	2,94 ± 0,50	1,269 ± 0,023	3,12 ± 0,30	1,124 ± 0,063	4,84 ± 0,20
	BN_CAS	1,607 ± 0,112	2,46 ± 0,22	1,496 ± 0,098	2,31 ± 0,45	0,427 ± 0,218	40,44 ± 9,70
	HEX_T80	1,327 ± 0,086	1,96 ± 0,05	1,346 ± 0,065	2,21 ± 0,30	0,887 ± 0,131	5,17 ± 0,51
	HEX_CAS	1,848 ± 0,099	2,74 ± 0,04	1,782 ± 0,005	2,98 ± 0,02	-	-
	MGLA_CAS	1,204 ± 0,051	1,69 ± 0,14	1,417 ± 0,088	2,18 ± 0,05	-	-
	Matrice fromagère	0,989 ± 0,197	7,75 ± 1,68	0,837 ± 0,073	5,73 ± 0,11	0,121 ± 0,022	20,60 ± 5,09

### 3.2. Effet de l'émulsifiant et des acides sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 en milieu aqueux

Les cinétiques de germination et de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 obtenues dans les différents milieux étudiés ont permis d'estimer les paramètres de germination ( $t_{germ}$ ,  $S_{germ}$  et  $\tau_{germ}$ ) et de croissance ( $\mu_{max}$  et  $\lambda$ ) de la souche en fonction de la formulation du milieu et de la concentration en acide caprylique et lactique. L'ensemble des paramètres estimés pour chaque matrice, sans inhibiteur, avec 0,075 mM d'acide caprylique et 250 mM d'acide lactique sont regroupés dans le Tableau 13.

Dans un premier temps, l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide lactique a été évaluée en fonction des émulsifiants étudiés dans le bouillon nutritif. Les cinétiques de germination et les cinétiques de croissance de la souche obtenues dans le bouillon nutritif (BN), le bouillon nutritif supplémenté par 1,5% (p/v) de Tween 80 (BN\_T80) ou par 10% (p/v) de caséinates de sodium (BN\_CAS) sont représentées dans la Figure 29.

Les comparaisons de moyennes ont montré que l'ajout d'émulsifiants n'a pas d'impact sur le temps de germination ( $t_{germ}$ ) et sur la dispersion autour de ce temps ( $S_{germ}$ ) estimés dans le bouillon nutritif. De plus, l'acide caprylique, à une concentration de 0,075 mM, ne semble pas avoir une activité inhibitrice de germination sur *B. weihenstephanensis* KBAB4 en milieux aqueux puisque les paramètres de germination estimés sont identiques à ceux estimés en absence d'inhibiteur. Cependant, l'ajout d'acide lactique au bouillon nutritif diminue significativement le taux de germination  $\tau_{germ}$  en présence de Tween 80 et de caséinates ( $\tau_{germ} = 0,96 \pm 0,04$  dans BN\_T80 et  $\tau_{germ} = 0,87 \pm 0,09$  dans BN\_CAS avec 250 mM d'acide lactique).

En ce qui concerne la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux aqueux, les paramètres estimés ( $\mu_{max}$  et  $\lambda$ ) sont représentés dans la Figure 28 en fonction de l'ajout d'acide et d'émulsifiant. La présence de Tween 80 et de caséinates n'influence pas les paramètres de croissance estimés en absence d'acide. De plus, les temps de latence obtenus pour chaque condition sont identiques, excepté dans le bouillon nutritif contenant des caséinates et de l'acide lactique où ce dernier est significativement plus long ( $\lambda = 40,4 \pm 9,7$  h).

La présence de Tween 80 semble influencer l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide lactique dans le bouillon nutritif : les taux de croissance obtenus avec acides ne sont pas significativement différents de la condition optimale (sans acide) en présence de Tween 80 contrairement aux taux de croissance obtenus dans le bouillon nutritif seul. La même observation peut être faite lors de l'ajout de caséinates au bouillon nutritif sur l'activité

inhibitrice de l'acide caprylique, cependant en ce qui concerne l'activité inhibitrice de l'acide lactique, l'ajout de cet émulsifiant diminue significativement le taux de croissance de la souche ( $\mu_{\max} = 0,427 \pm 0,218 \text{ h}^{-1}$ ).

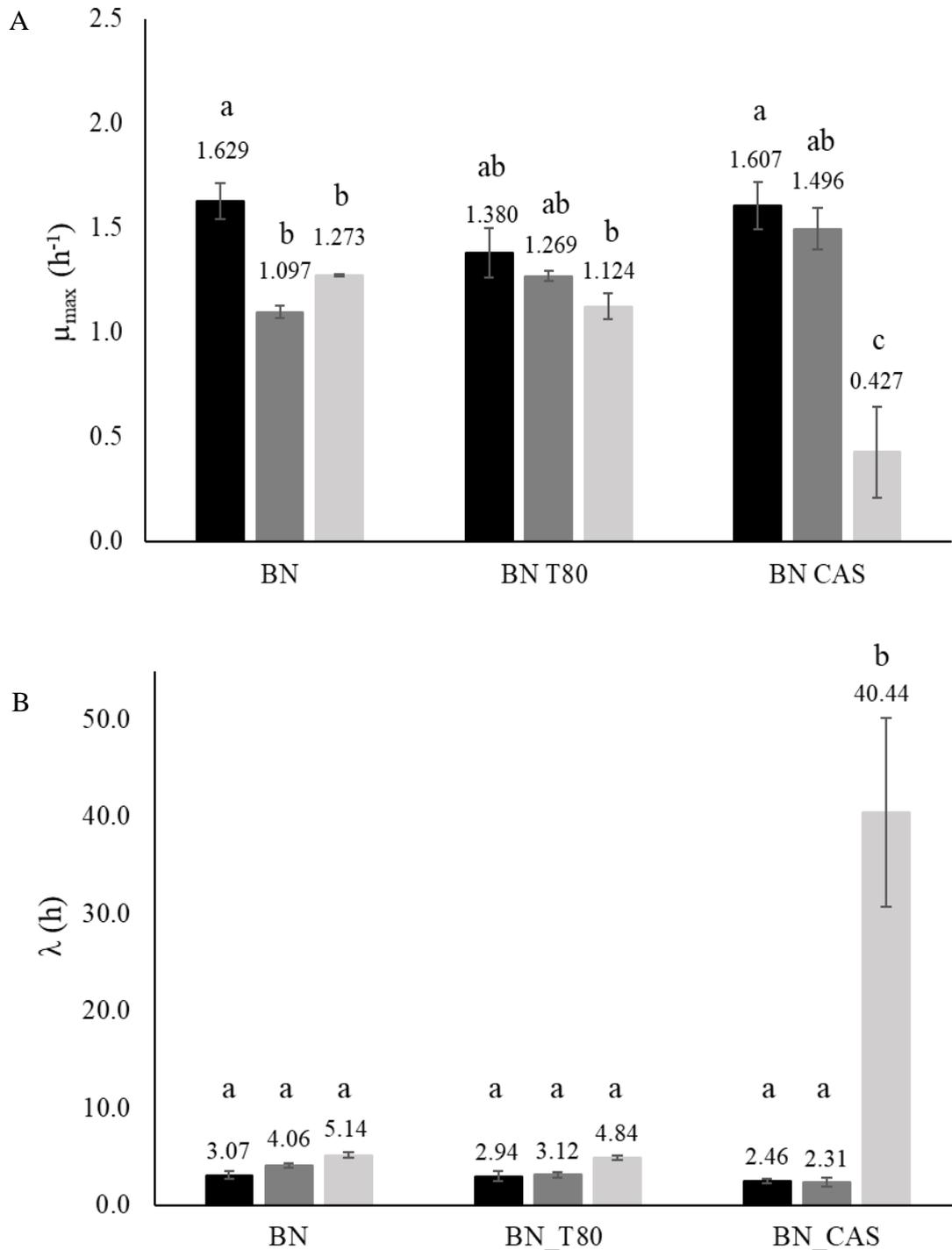


Figure 28 : Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les milieux aqueux en fonction de l'émulsifiant et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair). Les lettres diffèrent les milieux dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{\text{value}} = 0,05$ ) (BN = Bouillon Nutritif, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium).

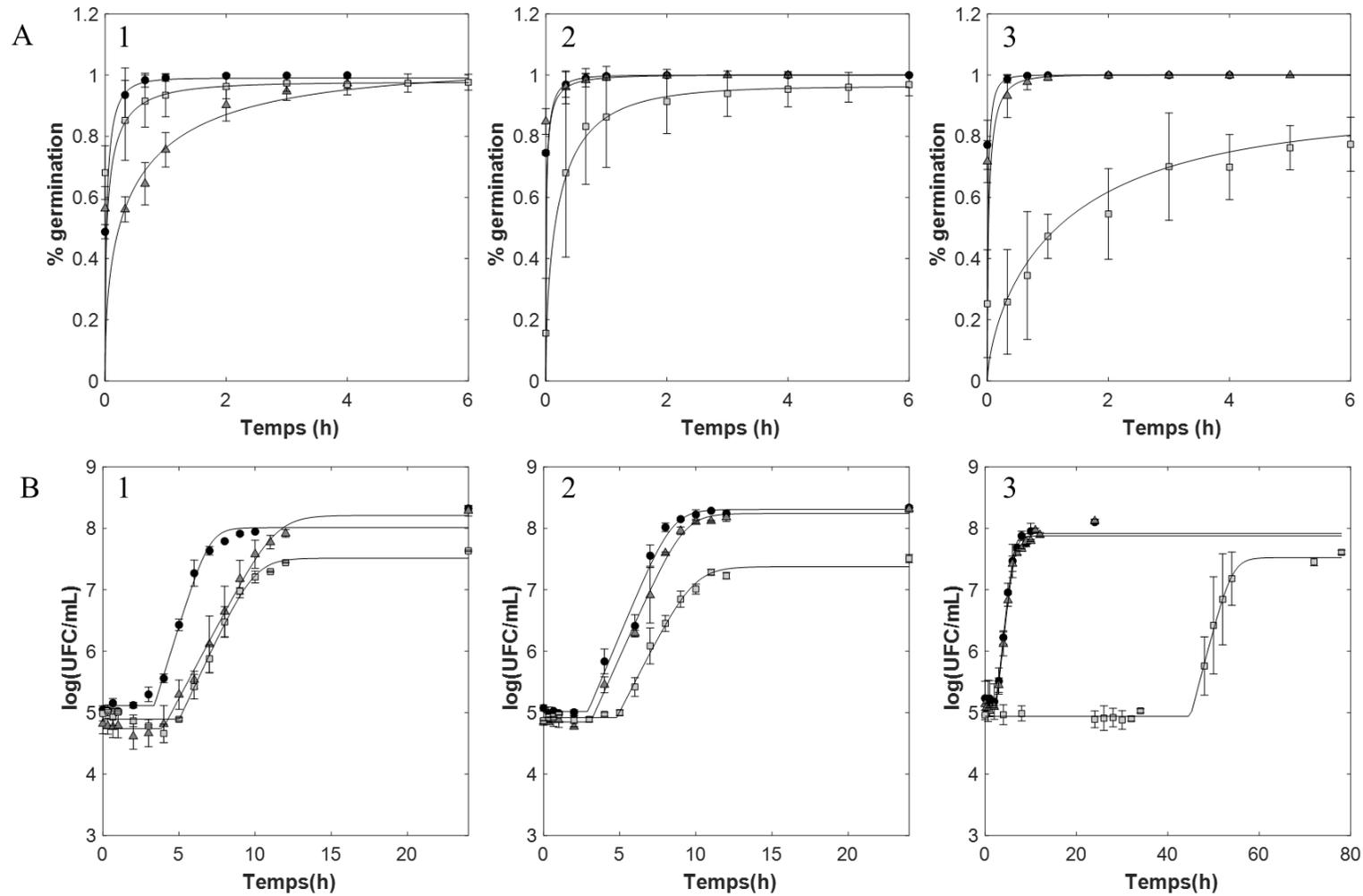


Figure 29 : Cinétique de germination (A) et de croissance (B) de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans du bouillon nutritif (1), du bouillon nutritif supplémenté par du Tween 80 (2), du bouillon nutritif supplémenté par des caséinates (3), en absence d'acide inhibiteur (●), en présence de 0,075 mM d'acide caprylique (▲) et en présence d'acide lactique (■). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliquas et leur écart-type, les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles.

### 3.3. Effet de l'émulsifiant, de la phase grasse et des acides sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 en émulsion H/E 20/80

Les cinétiques de croissance et de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 obtenues dans les émulsions 20/80 en fonction de leur formulation et de l'ajout d'acide sont représentées dans la Figure 30 et la comparaison des paramètres de germination et de croissance permettent d'évaluer l'influence de la formulation des émulsions sur l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide lactique.

Les résultats ont montré que la formulation et l'ajout d'acide ont un impact significatif sur le temps de germination et le taux de germination mais n'ont pas d'impact sur la dispersion ( $S_{germ}$ ). La présence d'acide lactique dans l'émulsion composée de matière grasse laitière augmente significativement le temps de germination ( $t_{germ} = 4,65 \pm 1,91$  h) par rapport aux autres formulations. De plus, la présence d'acide lactique dans les émulsions composées de caséinates diminue significativement le taux de germination par rapport aux émulsions composées de Tween 80 ( $\tau_{germ} = 0,91 \pm 0,03$  dans HEX\_CAS et  $\tau_{germ} = 0,86 \pm 0,02$  dans MGLA\_CAS avec 250 mM d'acide lactique). Cependant, les paramètres de germination estimés en absence d'acide et avec ajout d'acide caprylique sont égaux pour chacune des formulations d'émulsions étudiées.

Par ailleurs, les paramètres de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 n'ont pas pu être estimés dans toutes les émulsions H/E 20/80, notamment dans les émulsions composées d'hexadécane et de matière grasse laitière, stabilisées par des caséinates (HEX\_CAS et MGLA\_CAS) et en présence d'acide lactique. En effet, la croissance de la souche n'a pas été observée dans l'émulsion HEX\_CAS et la croissance d'un seul répliqua sur deux a eu lieu sur une durée de 80h dans l'émulsion MGLA\_CAS en présence de 250 mM d'acide lactique. Les paramètres de croissance estimés pour les autres conditions sont regroupés dans la Figure 31. Les résultats ont montré que la formulation de l'émulsion influence le taux de croissance de la souche mais pas le temps de latence. Les taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sont significativement plus élevés dans les émulsions HEX\_CAS comparés aux deux autres formulations. De plus, une concentration en acide caprylique de 0,075 mM n'a pas d'impact sur les paramètres de croissance de la souche en émulsion, quelle que soit la formulation étudiée. Cependant, l'ajout d'acide lactique à 250 mM diminue significativement le taux de croissance ( $\mu_{max} = 0,887 \pm 0,131$  h<sup>-1</sup>) et augmente significativement le temps de latence de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ( $\lambda = 5,2 \pm 0,5$  h) dans les émulsions composées d'hexadécane et de Tween 80 (HEX\_T80).

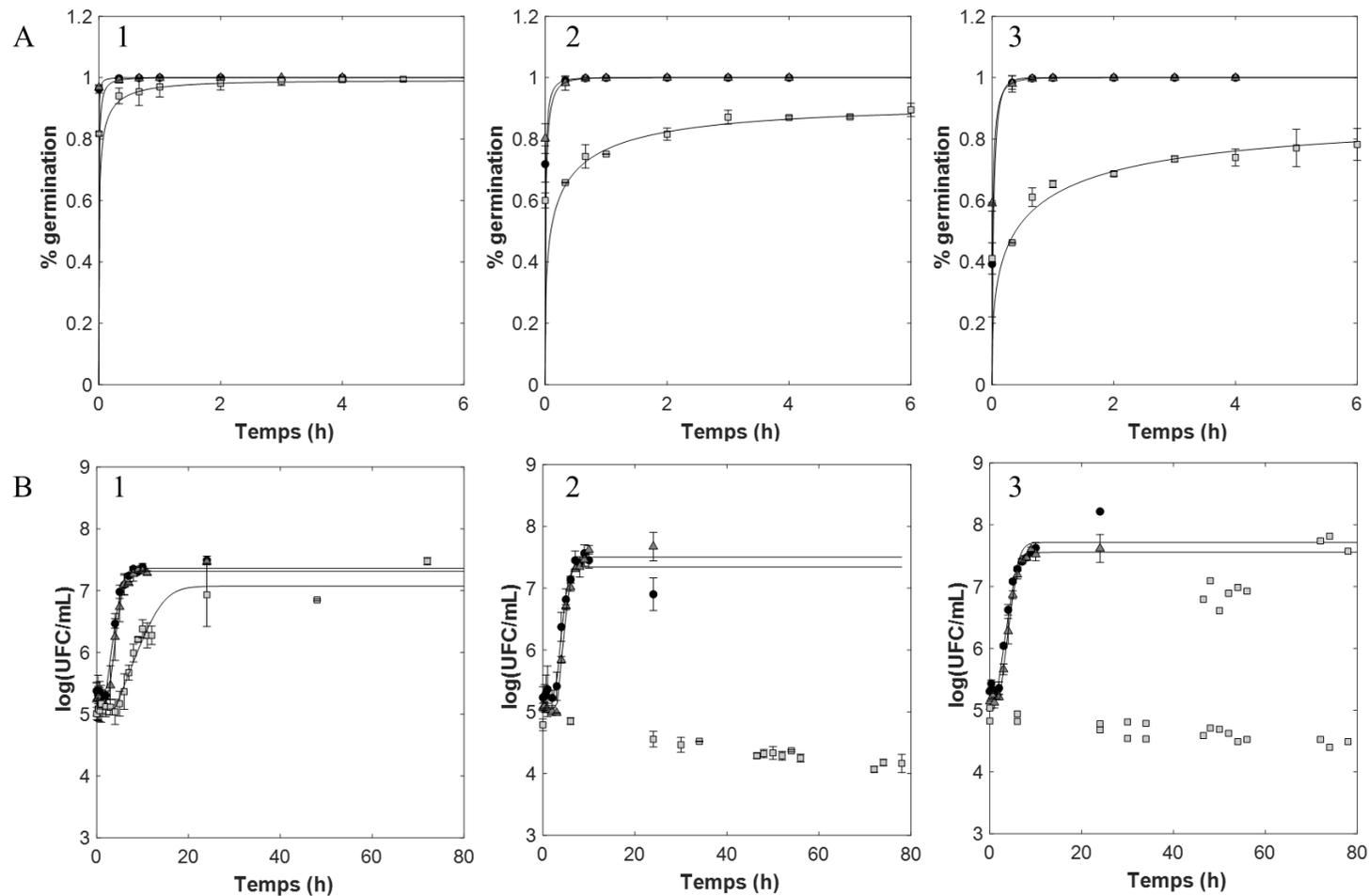


Figure 30 : Cinétique de germination (A) et de croissance (B) de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les émulsions 20/80 avec hexadécane et Tween 80 (HEX\_T80) (1), avec hexadécane et caséinates (HEX\_CAS) (2), avec matière grasse laitière et caséinates (MGLA\_CAS) (3), en absence d'acide inhibiteur (●), en présence de 0,075 mM d'acide caprylique (▲) et en présence d'acide lactique (■). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliquas et leur écart-type et les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles.

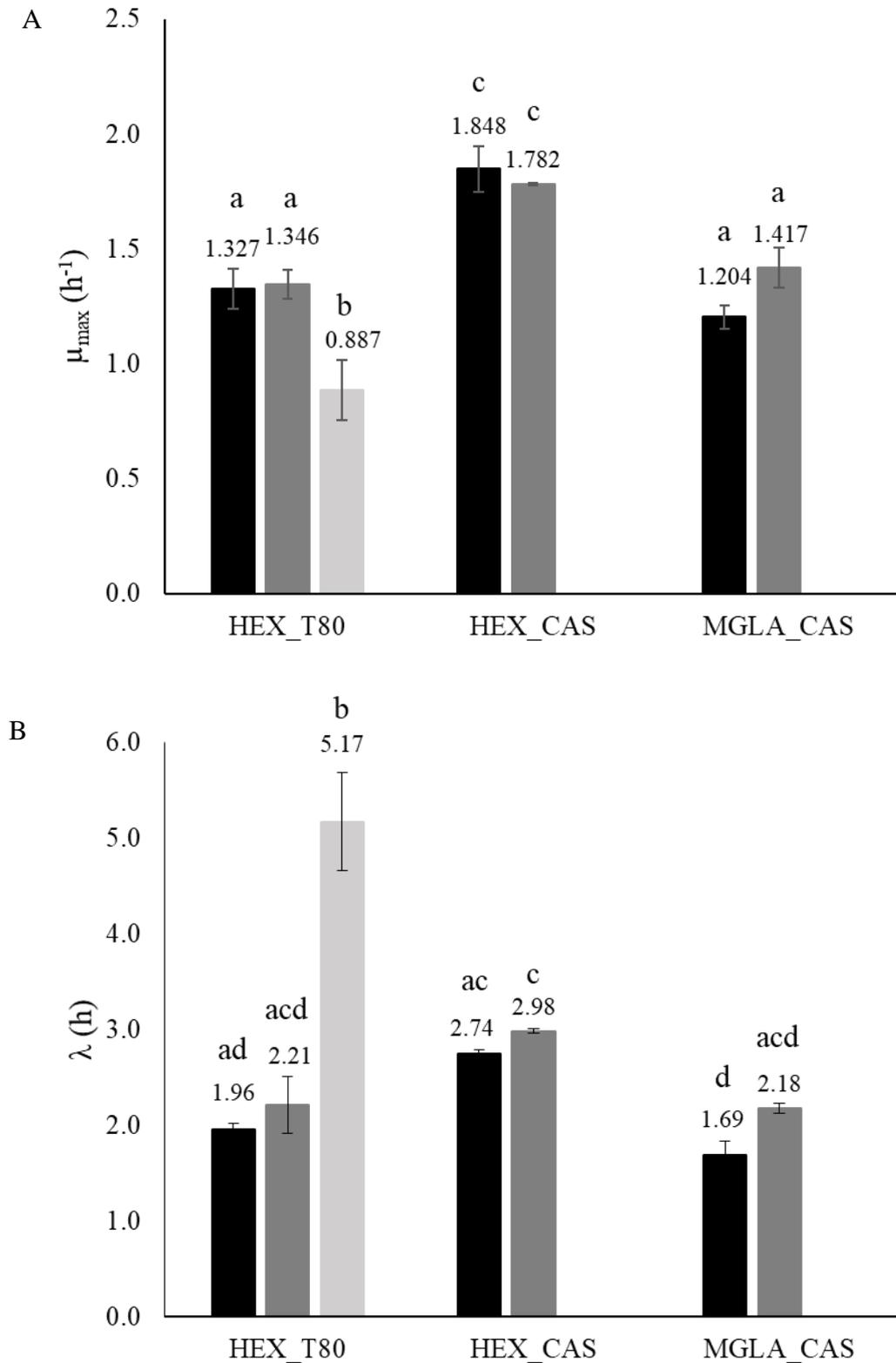


Figure 31 : Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les émulsions H/E 20/80 en fonction de la formulation et de l'acide ajouté (sans acide en noir, avec 0,075 mM d'acide caprylique en gris foncé et 250 mM d'acide lactique en gris clair). Les lettres diffèrent les milieux dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{value} = 0,05$ ) (HEX = Hexadécane, MGLA = Matière Grasse Laitière, T80 = Tween 80, CAS = caséinates de sodium).

### **3.4. Effet de la concentration en acides sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 en matrice fromagère**

La germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ont été évaluées dans les matrices fromagères en présence de plusieurs concentrations en acide lactique et en acide caprylique ainsi que d'un mélange des deux acides (Tableau 11). Les paramètres de germination estimés dans les matrices fromagères en fonction des différentes conditions sont regroupés dans le Tableau 14. Ces résultats montrent que la souche est capable de germer rapidement et à un taux élevé ( $\tau_{\text{germ}}$ ) dans les matrices fromagères, quelle que soit la condition étudiée. Cependant, une forte variabilité de germination entre les deux répliquas biologiques pour chacune des conditions testées est observée via l'obtention d'écart-types élevés sur la moyenne de  $t_{\text{germ}}$  (par exemple dans la condition optimale  $t_{\text{germ}} = 0,487 \pm 0,675$  h). En raison de cette forte variabilité, l'analyse statistique effectuée n'a montré aucun impact significatif de l'ajout d'acide sur les paramètres de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les matrices fromagères.

Les cinétiques de croissance obtenues dans ces matrices fromagères pour les conditions étudiées sont regroupées dans la Figure 32 et les taux de croissance ( $\mu_{\text{max}}$ ) et temps de latence ( $\lambda$ ) estimés à partir de ces cinétiques sont représentés dans la Figure 33. En condition optimale (en absence d'inhibiteur), le taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans la matrice fromagère est égal à  $0,989 \pm 0,197$  h<sup>-1</sup> et le temps de latence est de  $7,75 \pm 1,68$  h. Il apparaît que l'ajout d'acide lactique dans ces matrices diminue significativement le taux de croissance de la souche, contrairement à l'ajout d'acide caprylique. De plus, seule une concentration en acide lactique de 250 mM augmente significativement le temps de latence de la souche dans la matrice fromagère ( $\lambda = 20,6 \pm 5,09$  h) comparée aux autres conditions testées. Par ailleurs, l'utilisation d'un mélange d'acide lactique à 125 mM et d'acide caprylique à 0,075 mM et 0,25 mM permet de diminuer significativement le taux de croissance de la souche dans le fromage par rapport à la condition optimale et ce dernier est identique à celui estimé en présence d'acide lactique seul à la même concentration (125 mM). Le mélange d'acides n'a cependant pas d'impact sur le temps de latence de la souche dans ces matrices. De plus, l'augmentation de la concentration en acide caprylique n'a pas d'influence sur les paramètres de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 lorsque cet acide est utilisé en simultané avec l'acide lactique.

Tableau 14 : Paramètres de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 estimés dans les matrices fromagères en fonction des conditions testées.

Conditions	Concentrations (mM)	Paramètres de germination estimés		
		$t_{\text{germ}}$ (h)	$S_{\text{germ}}$	$\tau_{\text{germ}}$
Sans Acide	0	$0,487 \pm 0,675$	$0,477 \pm 0,052$	$0,974 \pm 0,006$
A. caprylique	0,075	$0,016 \pm 0,012$	$0,041 \pm 0,010$	$1,000 \pm 0,000$
	0,25	$0,096 \pm 0,130$	$0,050 \pm 0,006$	$0,999 \pm 0,001$
A. lactique	125	$0,213 \pm 0,279$	$0,515 \pm 0,171$	$0,984 \pm 0,001$
	250	$0,040 \pm 0,013$	$0,315 \pm 0,245$	$0,968 \pm 0,022$
A. caprylique + A. lactique	AC 0,075 AL 125	$0,052 \pm 0,070$	$0,052 \pm 0,070$	$0,983 \pm 0,004$
	AC 0,25 AL 125	$0,152 \pm 0,215$	$0,152 \pm 0,215$	$0,994 \pm 0,001$

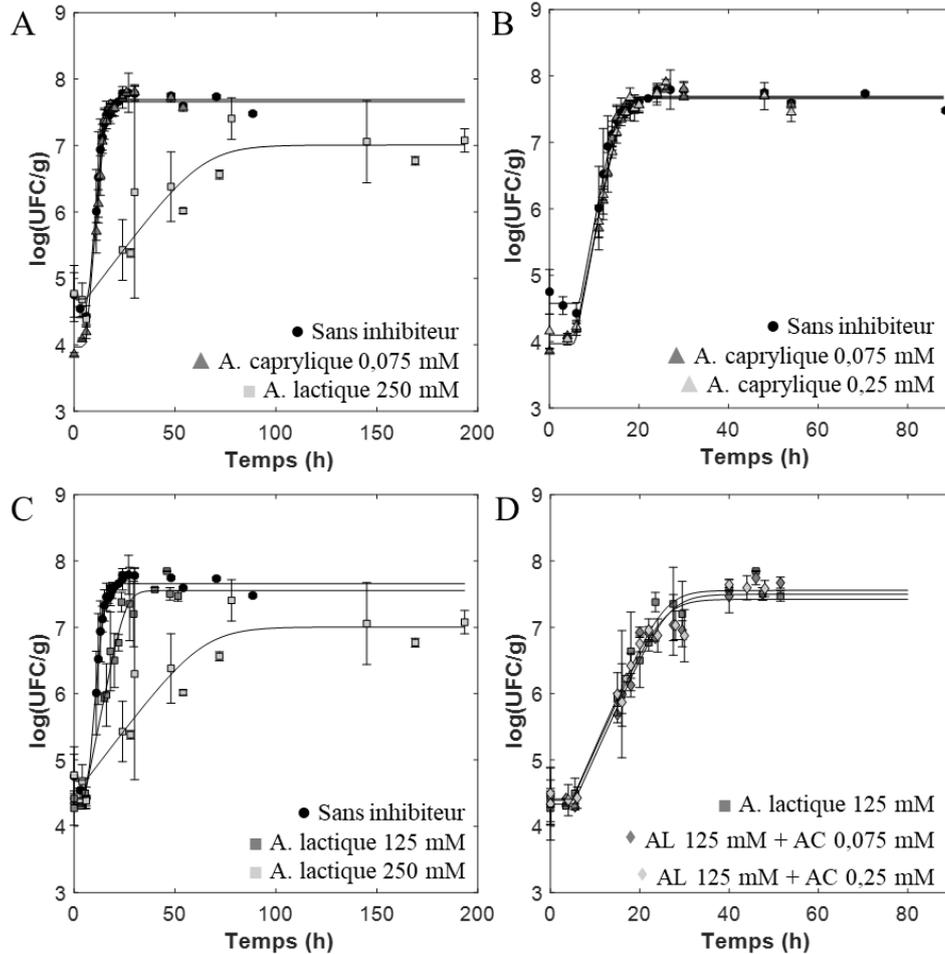


Figure 32: Cinétiques de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les matrices fromagères en fonction des conditions étudiées dans les émulsions H/E 20/80 (A), de la concentration en acide caprylique (B), de la concentration en acide lactique (C) et du mélange d'acide lactique et d'acide caprylique (D). Les symboles correspondent aux moyennes des données expérimentales de deux répliques et leur écart-type et les lignes continues noires représentent l'ajustement des modèles.

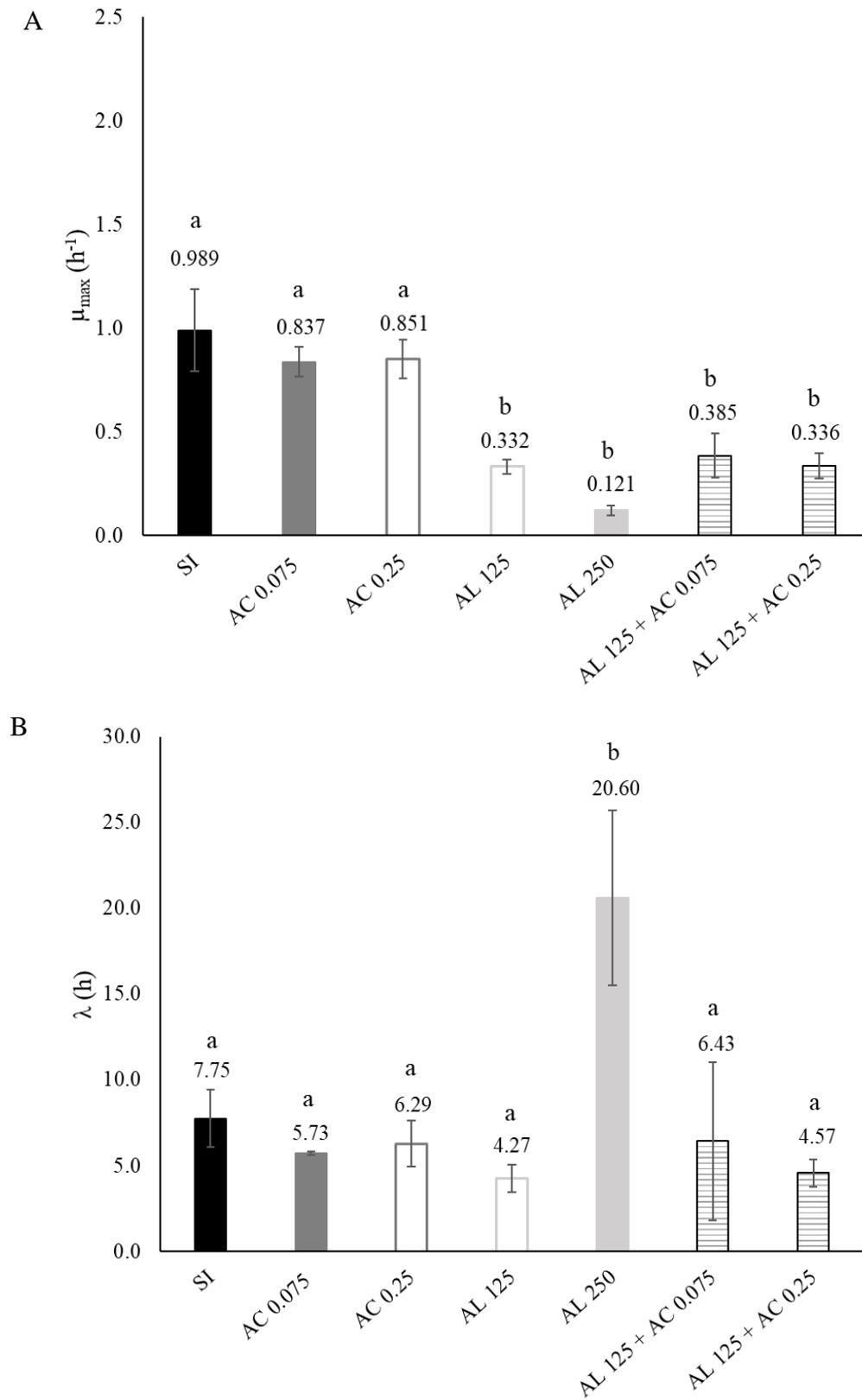


Figure 33: Taux de croissance (A) et temps de latence (B) estimés dans les matrices fromagères en fonction des acides ajoutés et de leur concentration (en mM) (SI = Sans inhibiteur, AC= Acide Caprylique, AL = Acide lactique). Les lettres diffèrent les conditions dont les moyennes des paramètres sont significativement différentes ( $p_{value} = 0,05$ ).

### **3.5. Influence du milieu sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 en fonction des acides étudiés**

Afin d'étudier l'influence d'une matrice laitière structurée sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur l'efficacité inhibitrice des acides, des analyses statistiques ont été réalisées sur les paramètres estimés dans les différents milieux étudiés (en milieux aqueux, en émulsion H/E 20/80 et en matrice fromagère) en présence ou non d'acide caprylique (0,075 mM) et d'acide lactique (250 mM) (Tableau 13).

Dans un premier temps, ces analyses ont montré que les taux de germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les matrices fromagères ne sont pas significativement différents des taux de germination obtenus dans les milieux aqueux et les émulsions, en absence d'acide et en présence d'acide caprylique et d'acide lactique, tout comme le paramètre de dispersion estimé ( $S_{\text{germ}}$ ). Cependant, le temps de germination de la souche diminue significativement dans les matrices fromagères, quel que soit l'ajout d'acide, par rapport aux temps de germination obtenu en bouillon nutritif seul (BN) avec 0,075 mM d'acide caprylique et en bouillon nutritif contenant 10% de caséinates (BN\_CAS) et 250 mM d'acide lactique.

Ensuite, les résultats ont montré que les temps de latence de *B. weihenstephanensis* KBAB4 estimés dans les matrices fromagères, sans inhibiteur et avec acide caprylique, ne sont pas significativement différents des temps de latence estimés dans les milieux aqueux et les émulsions H/E 20/80 pour les mêmes concentrations en acide. Cependant, le temps de latence estimé en matrice fromagère contenant 250 mM d'acide lactique est significativement plus petit que celui estimé dans le milieu BN\_CAS en présence d'acide lactique et est significativement plus élevé que les temps de latence estimés dans les autres milieux à la même concentration en acide lactique (BN, BN\_T80, HEX\_T80). En ce qui concerne les taux de croissance de la souche, il s'avère que le taux de croissance estimé dans la matrice fromagère sans inhibiteur est significativement plus petit que celui estimé dans les milieux suivants en absence d'inhibiteur : BN, BN\_CAS et HEX\_CAS. La croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans la matrice fromagère en présence d'acide caprylique à 0,075 mM est significativement plus lente que dans les milieux BN\_T80, BN\_CAS, HEX\_T80, HEX\_CAS, MGLA\_CAS contenant la même concentration en acide caprylique. Enfin, le taux de croissance de la souche obtenu en matrice fromagère avec 250 mM d'acide lactique est significativement plus petit que les taux de croissance estimés dans les milieux suivants pour la même concentration en acide lactique : BN, BN\_T80, et HEX\_T80.

## 4. Discussion

L'objectif de cette étude est d'étudier l'influence d'un changement de formulation dans des milieux aqueux, des émulsions H/E et dans une matrice fromagère sur la dynamique de germination et de croissance de *B. weihenstephanensis* dans un premier temps, puis sur l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide lactique.

### 4.1. La complexification de la formulation impacte la structure du milieu

Le changement de l'émulsifiant et de la matière grasse dans l'élaboration des systèmes modèles a demandé des ajustements de méthodes de fabrication et a entraîné des modifications des caractéristiques physico-chimiques. Ces modifications des caractéristiques physico-chimiques ont été évaluées via la mesure du diamètre des gouttelettes et de leur distribution granulométrique au sein des émulsions H/E.

Premièrement, le remplacement des tensioactifs non ioniques, le polysorbate 80 (Tween 80) et le monoléate de sorbitane (Span 80) à 1,5% (p/v), par les caséinates de sodium à 10% (p/v) dans les émulsions composées d'hexadécane a entraîné une augmentation de la distribution et de la taille des particules en suspension (Figure 27). Les caséinates de sodium (CAS) sont composés d'un mélange de quatre caséines agrégées, comme dans les micelles de caséines : les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$ , la  $\beta$ -caséine et la  $\kappa$ -caséine qui ont de fortes propriétés amphiphiles et la capacité de réduire la tension interfaciale huile-eau lors d'un procédé d'émulsification (Dickinson, 2001). Ces protéines sont largement utilisées comme émulsifiant dans les produits laitiers pour améliorer certaines fonctionnalités des produits (viscosité, émulsification, pouvoir moussant...). Cependant, les émulsions stabilisées par des caséinates sont facilement sujettes à la déstabilisation à cause de conditions compositionnelles et environnementales défavorables (pH, concentrations en protéines, conditions d'homogénéisation, traitement thermique) (Liao et al., 2022). Liang et al., (2014) ont montré qu'à des concentrations en caséinates élevées (entre 6 et 10% [p/p]), la formation du réseau de gouttelettes est retardée et diminuée en raison de la viscosité plus élevée de la phase continue, expliquant ainsi l'augmentation de la distribution granulométrique et de la taille des particules dans les émulsions HEX\_CAS par rapport aux émulsions HEX\_T80. De plus, de Figueiredo Furtado et al. (2017) ont montré que des émulsions stabilisées avec des caséinates possèdent des diamètres de gouttelettes réduits lorsque le temps de sonication augmente, expliquant ici la diminution de la taille des particules dans les émulsions MGLA\_CAS par rapport aux émulsions HEX\_CAS. Enfin, les caséinates

de sodium sont considérés comme très stables à la chaleur en raison de leur nature micellaire et de l'absence de structure globulaire mais l'application d'un traitement thermique affecte la stabilité des émulsions stabilisées par ces protéines (Ma & Chatterton, 2021). Srinivasan et al., (2002) ont constaté qu'après un traitement thermique à 121°C pendant 15 min, les émulsions stabilisées par des caséinates sont plus stables que les émulsions non traitées. Ce phénomène expliquerait l'obtention d'émulsions présentant plus de déstabilisations après 4 jours de stockage à 30 °C ( $2,40 \pm 0,19$  et  $2,54 \pm 0,77$ ) pour les émulsions stabilisées avec des caséinates chauffés à 110°C pendant 10 min (Tableau 12) comparées aux émulsions stabilisées par des caséinates préalablement chauffés à 121°C pendant 21 minutes.

En ce qui concerne la matrice fromagère, des mesures rhéologiques pourraient être effectuées en fonction des conditions testées afin de caractériser les propriétés structurales de la matrice et d'étudier l'influence des concentrations en acides sur la structure du produit. En effet, lorsque le lait coagule et devient du fromage, il subit un processus appelé synérèse qui modifie les caractéristiques rhéologiques et texturales du fromage (Fagan et al., 2017) et affecte potentiellement le développement de *B. weihenstephanensis* KBAB4. D'un point de vue physico-chimique, le fromage est un gel colloïdal composé d'une matrice de caséine polymérique qui emprisonne la matière grasse du lait, les protéines du lactosérum, le lactose et l'eau. Dans notre étude, la matrice de caillé obtenue à partir de lait UHT, de sels de calcium et de présure microbienne, sans ajout de ferments lactiques, correspond à la définition d'un fromage frais, non affiné (FAO, 2022). Parmi les fromages frais non affinés, le Burgos est défini par un pH neutre compris entre 6,44 et 6,88, une humidité relative comprise entre 70,9 et 85,9% (p/p), une composition en protéine comprise entre 9,0 et 18,1% (p/p) et en matière grasse qui peut varier entre 4 et 14% (p/p), d'après des analyses physico-chimiques réalisées sur 15 fromages de type Burgos achetés dans le commerce par Hueso et al. (2023). Des mesures supplémentaires doivent être réalisées pour vérifier que les matrices fromagères produites en laboratoire puissent être considérées comme du Burgos modèle.

#### **4.2. La formulation du milieu influence avant tout la croissance de la souche**

Dans un premier temps, l'influence d'un changement de formulation dans les milieux a été étudiée sur les cinétiques de germination et de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4.

L'ajout de Tween 80 à 1,5 % (p/v) dans le bouillon nutritif ou dans l'émulsion H/E 20/80 n'affecte pas les paramètres de germination et de croissance de la souche. Léonard-Akkari et al. (2018) ont montré que le Tween 80 ralentit la germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4

à pH 5,5 et ralentit la croissance pour une concentration supérieure à 2% (p/v) à pH 6,0. De plus, la présence de 10% (p/v) de caséinates de sodium dans le milieu nutritif n'influence pas les paramètres de germination et de croissance de la souche mais modifie la croissance dans les émulsions 20/80. Peu d'étude ont montré l'effet des caséinates de sodium sur la croissance bactérienne mais l'augmentation du taux de croissance dans l'émulsion HEX\_CAS par rapport aux émulsions composées de Tween 80 et d'hexadécane (HEX\_T80) ou de caséinates et de matière grasse laitière (MGLA\_CAS) pourrait s'expliquer par l'augmentation du diamètre moyen des gouttelettes. De plus, *B. weihenstephanensis* KBAB4 est une bactérie protéolytique, ce qui signifie qu'elle peut métaboliser les acides aminés et peptides issus de la digestion des protéines, comme les caséinates, en tant que source de carbone et d'énergie (Guillemet et al., 2010). L'accès à ces sources de nutriments pourrait être facilité dans ces émulsions, et ainsi favoriser la croissance, sans entrainer de déstabilisations de l'émulsion.

Par ailleurs, les résultats indiquent également que le développement de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans la matrice fromagère entraîne une baisse du taux de germination et de croissance, et une augmentation significative du temps de latence de la souche (Tableau 13). La présence de sels ou bien le passage de l'état liquide structuré des milieux nutritifs ou des émulsions H/E à l'état solide sous forme de gel de caséines de la matrice fromagère entrainerait une réduction de la mobilité des bactéries dans la matrice, ce qui diminuerait leur prolifération (Wilson et al., 2002). L'effet d'un état semi-solide d'un aliment sur la mobilité et la diminution de croissance de microorganisme a été constaté de nombreuses fois dans de précédentes études (Boons et al., 2015; Brocklehurst et al., 1997; Mertens et al., 2009).

#### **4.3. L'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide caprylique est impactée par la formulation du milieu**

L'acide caprylique ou acide octanoïque est un acide gras saturé à moyenne chaîne de carbone (C8) naturellement présent dans le lait de vache (0,038 g/100g), le lait de chèvre (0,072 g/100g) et donc dans le fromage en général à une concentration égale à 0,41 g/100g (ANSES, 2020). Il s'agit d'un composé alimentaire généralement reconnu comme sûr (Generally Recognized As Safe) par la FAO (Food and Agriculture Organization) (JECFA, 2000), c'est pourquoi son utilisation est d'intérêt en tant qu'antibactérien dans les aliments dans le contexte du clean label. L'activité antimicrobienne de l'acide caprylique envers des bactéries sporulées pathogènes est reconnue (Batovska et al., 2009; Brul & Coote, 1999; Hsiao & Siebert, 1999).

Une étude précédente a constaté que l'inhibition de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 par l'acide caprylique est causée par sa forme non dissociée (Dutoit et al., 2024), capable de pénétrer à travers la membrane bactérienne provoquant une acidification du pH intracellulaire et entraînant la mort de la cellule (Lambert & Stratford, 1999).

Dans cette étude, les résultats montrent que l'acide caprylique à une concentration de 0,075 mM possède une activité antimicrobienne contre *B. weihenstephanensis* KBAB4 en milieu nutritif qui se traduit par une diminution du taux de croissance (Figure 28). L'activité inhibitrice de germination de l'acide caprylique n'a pas été observée à la concentration choisie dans le milieu nutritif : bien qu'une augmentation du temps de germination ait été observée, elle n'est pas significative par rapport à la condition optimale (Tableau 13).

Par ailleurs, les résultats ont montré que l'acide caprylique à une concentration de 0,075 mM ne permet pas l'inhibition de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 lorsqu'il est ajouté dans un milieu aqueux en présence d'un émulsifiant (Figure 28). L'ajout de Tween 80 ou de caséinates de sodium dans le milieu nutritif augmente le taux de croissance bactérien en présence d'acide caprylique mais n'impacte pas le temps de latence. Des études ont montré que la présence d'émulsifiants peut empêcher les composés inhibiteurs d'interagir avec les microorganismes (Kadri et al., 2017). En effet, l'acide caprylique interagirait avec les émulsifiants présents dans le milieu, ce qui réduirait sa disponibilité envers les bactéries. Le Tween 80 est une molécule amphiphile qui a la capacité de former des micelles dans un milieu aqueux lorsque sa concentration est supérieure à la CMC. La concentration en Tween 80 utilisée dans le milieu aqueux (1,5 % p/v) est 750 fois supérieure à la CMC égale à 0,020 mg/ml (Mahmood & Al-koofee, 2013), donc il y a présence de micelles de Tween 80 dans le milieu. Ces micelles créent des environnements hydrophobes capables de solubiliser les composés lipophiles tels que l'acide caprylique (Berton-Carabin et al., 2014) et réduisent ainsi leurs interactions avec les bactéries présentes dans le milieu. De plus, les protéines lactières, telles que les caséinates, utilisées en tant qu'émulsifiants sont également susceptibles d'interagir avec les composés inhibiteurs présents dans le milieu, expliquant la baisse d'activité inhibitrice de l'acide caprylique dans le milieu BN\_CAS par rapport au milieu BN (Figure 28). Les protéines ont la capacité de former des complexes avec des lipides (Davidson et al., 2021), diminuant la disponibilité de ces composés et donc leur interaction avec les bactéries.

Cette baisse d'inhibition de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 a également été observée dans les émulsions H/E quelle que soit la formulation. En effet, pour chaque formulation étudiée les paramètres de croissance estimés en présence d'acide caprylique ne sont

pas significativement différents de la condition sans inhibiteur (Figure 31). L'acide caprylique est une molécule lipophile avec un coefficient de partage octanol/eau élevé ( $\log P = 3,05$ ). Cette caractéristique impacte sa localisation dans l'émulsion et sa répartition entre la phase grasse et la phase aqueuse (Léonard-Akkari et al., 2018). Or, l'efficacité inhibitrice d'un composé dans une émulsion dépend de la concentration disponible dans la phase aqueuse, phase dans laquelle les bactéries sont localisées (Brocklehurst & Wilson, 2000; Terjung et al., 2012). Des mesures des concentrations en acide caprylique dans les différentes phases de l'émulsion par chromatographie en phase gazeuse pourraient être effectuées pour vérifier cette hypothèse.

De plus, le traitement thermique appliqué à la phase aqueuse (contenant les caséinates) avant émulsification pourrait affecter l'activité antimicrobienne de l'acide caprylique. Pestana et al., (2015) ont montré que la quantité d'acide caprylique dans le lait était réduite après une pasteurisation ou un traitement à Ultra Haute Température (UHT).

Enfin, les résultats ont montré que l'activité inhibitrice de l'acide caprylique est également absente en matrice fromagère à une concentration de 0,25 et 0,075 mM (Figure 33). La diminution de l'activité inhibitrice de l'acide caprylique dans les matrices fromagères pourrait s'expliquer par des interactions avec les autres constituants de la matrice. Les propriétés inhibitrices des acides gras et leurs dérivés sont affectées par la présence de protéines, de lipides tels que les phospholipides ou d'autres agents tensioactifs tels que le cholestérol, tous présents dans le lait (Davidson et al., 2021). Hauerlandová et al., (2014) ont obtenu des résultats similaires : une baisse d'activité inhibitrice de la monolaurine a été observée dans du fromage fondu contre la croissance de bactéries sporulées.

#### **4.4. L'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide lactique est influencée par la présence de caséinates, qui entraînent une diminution du pH**

L'acide lactique est un acide organique faible, soluble dans l'eau. Il s'agit de la substance caractéristique des produits laitiers fermentés puisqu'il est issu de la fermentation du lactose par les bactéries lactiques, représentant jusqu'à 95% des acides organiques totaux dans le fromage (Akalin et al., 2002; Zeppa et al., 2001). L'acide lactique est un composé GRAS (Generally Recognized as Safe) largement utilisé comme conservateur dans les aliments en raison de sa facilité d'utilisation, sa rentabilité et son potentiel antimicrobien (Ramirez-Hernandez et al., 2018). Son action inhibitrice est reconnue sur un grand nombre de bactéries pathogènes d'origine alimentaire grâce à ses propriétés dépendantes du pH (Adams & Hall, 1988; Coban, 2020; Stanojević-Nikolić et al., 2016; Wang et al., 2014). La forme non dissociée

de l'acide lactique pénètre à travers les membranes bactériennes et se dissocie dans le cytoplasme provoquant une augmentation de la concentration en ions dans la cellule. La maîtrise de l'efflux de protons par la bactérie et l'acidification du pH intracellulaire entraîne la mort de la cellule (Stratford & Eklund, 2003).

L'activité inhibitrice de croissance de l'acide lactique a été confirmée sur *B. weihenstephanensis* KBAB4 à une concentration de 250 mM dans le bouillon nutritif via la diminution du taux de croissance de la souche (Figure 28) mais il ne semble pas avoir d'impact sur la germination dans ce milieu.

De plus, en fonction de leur nature, l'ajout d'émulsifiants au bouillon nutritif impacte l'activité inhibitrice de l'acide lactique. La présence de Tween 80 dans le milieu pourrait permettre la formation d'une couche hydrophobe protectrice autour des spores et des cellules végétatives de *B. weihenstephanensis* KBAB4, réduisant ainsi l'action de l'acide lactique sur les membranes bactériennes. Cependant, il a été observé que l'acide lactique maintient ses propriétés inhibitrices dans les émulsions H/E stabilisées par du Tween 80 (Figure 31), ce qui confirme l'absence de diffusion de l'acide entre les phases (Léonard-Akkari et al., 2018).

En ce qui concerne les caséinates, leur présence diminue fortement le taux de germination et de croissance de la souche et augmente son temps de latence en milieu nutritif. Dans les émulsions H/E stabilisées par des caséinates et en présence d'acide lactique, la croissance n'a pas été constatée (Figure 30). Suite à ces observations, des mesures de pH ont été réalisées dans ces milieux et l'effet de la concentration en acide lactique non dissocié évalué. Après un cycle de stérilisation de 10 min à 110°C, le pH de la phase aqueuse composée de CAS et d'acide lactique est égal à  $5,63 \pm 0,04$  tandis qu'en absence d'acide inhibiteur, et après un cycle de stérilisation de 21 min à 121°C, le pH de la phase aqueuse contenant des CAS est égale à  $6,19 \pm 0,04$ . De plus, les pH des émulsions HEX\_CAS et MGLA\_CAS avec 250 mM d'acide lactique sont respectivement égaux à  $5,69 \pm 0,04$  et  $5,71 \pm 0,04$  alors que les émulsions HEX\_CAS et MGLA\_CAS sans inhibiteur ont des pH égaux à  $6,12 \pm 0,01$  et  $6,24 \pm 0,04$ . Ainsi le traitement thermique de la phase aqueuse en présence d'acide lactique diminue le pH des milieux ce qui influence la proportion d'acide lactique non dissocié. La proportion d'acide non dissocié atteinte dans ces milieux est égale à 3,64 et 3,48 mM dans les émulsions stabilisées par des caséinates et composées d'hexadécane et de matière grasse laitière respectivement. Cette concentration est supérieure à la CMI de l'acide estimée en bouillon nutritif ( $CMI_{AL \text{ non dissocié}} = 2,50 \pm 0,12 \text{ mM}$ ) et inhibe donc complètement la croissance de la souche. Ces hypothèses pourraient être vérifiées en étudiant des concentrations en acide lactique total plus

faibles dans ces milieux. De plus, la germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 a été également inhibée par l'acide lactique dans ces milieux, atteignant un taux de germination de 0,859 ou 0,910. Sun et al., (2021) ont montré que l'effet d'un pH faible sur les spores est limité mais qu'avec une combinaison d'acide lactique et d'acide acétique à un niveau de stress doux, la croissance de spores peut être empêchée pendant trois mois dans des sauces alimentaires. Il serait pertinent d'étudier si une modification des conditions environnementales du milieu, telle qu'une élévation du pH, pourrait induire la germination des 9 à 15% de spores dormantes restantes, dans le but de mieux contrôler la persistance des spores dans les aliments.

Dans les matrices fromagères, en présence d'acide lactique à 250 mM, une diminution du taux de croissance a également été observée ainsi qu'une augmentation du temps de latence comparé à la condition optimale (Figure 33). Dissanayake et al., (2013) ont montré que les protéines de lait ont une plus grande tendance à former des agrégats de poids moléculaires élevés à pH acide et cette tendance est plus marquée en présence d'acide lactique. La formation d'agrégats de protéines dans les matrices serait donc à vérifier, ces derniers pourraient interagir avec les spores et cellules végétatives bactériennes et inhiber leur développement. Par ailleurs, à une concentration de 125 mM l'acide lactique inhibe également la croissance de la souche dans la matrice fromagère en diminuant son taux de croissance mais n'impact pas son temps de latence (Figure 33). Des résultats similaires ont été obtenus dans des matrices laitières (Tirloni et al., 2021; Wong et al., 1988), démontrant et confirmant le potentiel antimicrobien de l'acide lactique dans des matrices alimentaires. Par ailleurs, l'utilisation combinée des deux acides organiques, aux caractéristiques physico-chimiques différentes, dans les matrices fromagères étudiées ne semblent pas être avantageuse puisque l'inhibition de croissance obtenue semble être le résultat de l'action seule de l'acide lactique. Des combinaisons d'acides organiques à faible hydrophobicité (ex. acide acétique ou propionique) pourraient être testées afin d'évaluer l'effet synergique de ces acides sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans des matrices fromagères.

La figure 34 résume schématiquement l'effet d'une augmentation de la complexité de composition et de structure de certains milieux étudiés (BN, BN\_CAS, MGLA\_CAS et la matrice fromagère) sur l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide lactique sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4, comparés à la condition optimale (sans inhibiteur).

## 5. Conclusion

En conclusion, la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ne sont pas impactées par la présence d'un tensioactif non ionique (le Tween 80) à une concentration de 1,5% (pV) et par des caséinates de sodium à 10% (p/v) dans un milieu nutritif sans inhibiteur. La présence d'une phase dispersée, quelle que soit sa nature, peut modifier la structure de l'émulsion, notamment la taille des gouttelettes en suspension, en fonction du procédé d'homogénéisation et cela peut avoir un impact sur la croissance de la souche dans ce milieu. De plus, au sein d'une matrice fromagère élaborée en laboratoire, la croissance est diminuée. La structure gélifiée de la matrice ou la présence de sels apparaissent alors comme des facteurs de stress supplémentaires, réduisant la répartition spatiale des bactéries ou affectant leur développement.

La formulation des milieux influence cependant les propriétés inhibitrices de l'acide caprylique. L'acide caprylique perd l'activité inhibitrice de croissance observée en milieu nutritif seul une fois ajouté en présence d'émulsifiants, dans des émulsions H/E quelle que soit la nature des ingrédients et dans des matrices fromagères. Cette baisse d'activité est le résultat d'interactions avec les constituants des milieux et de sa distribution/localisation entre les phases de la matrice en raison de son caractère lipophile. L'efficacité inhibitrice de l'acide lactique, quant à elle, est fortement impactée par la présence de caséinates au sein du milieu mais elle n'est pas influencée par la nature de la phase grasse. L'activité inhibitrice de l'acide lactique est effective dans des émulsions stabilisées par des tensioactifs non ioniques, et celle-ci s'intensifie lorsque les émulsions sont stabilisées par des caséinates de sodium. La baisse du pH dans ces milieux conduit à concentration accrue en acide lactique non dissocié, ce qui inhibe la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4.

De plus, ces résultats concernant les propriétés inhibitrices de l'acide caprylique et lactique en émulsions, ont été validés dans les matrices fromagères. Cela confirme la pertinence des observations faites à l'échelle du laboratoire dans des matrices modèles pour des applications à grande échelle dans des matrices alimentaires réelles. Ces conclusions soulignent l'intérêt direct de cette étude pour les industriels du secteur laitier.

Les caractéristiques physico-chimiques des agents antimicrobiens, leurs interactions avec les différents ingrédients en fonction de leur nature et les conditions environnementales du système doivent être prises en compte pour évaluer leurs propriétés inhibitrices dans des matrices alimentaires.

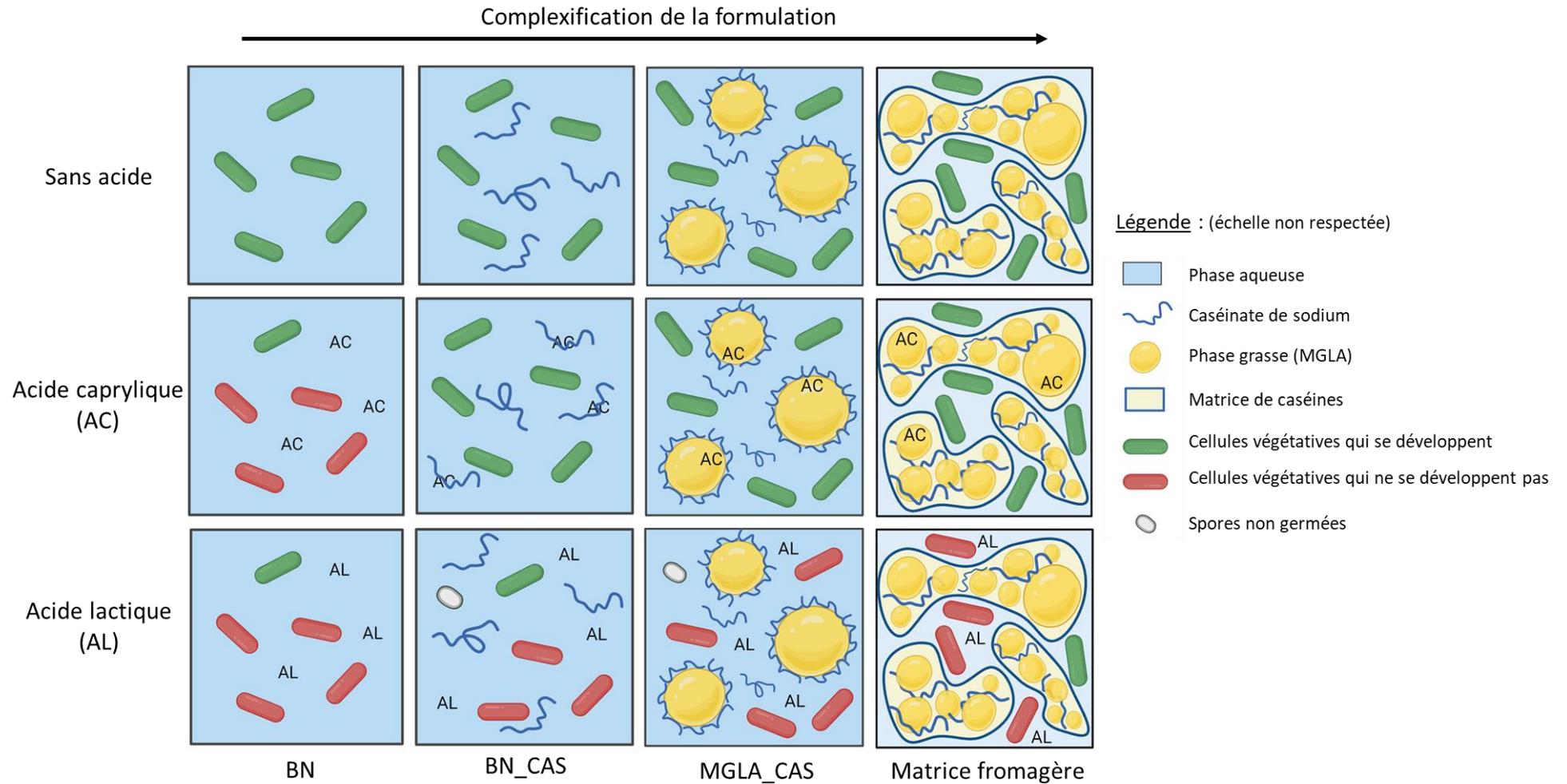


Figure 34 : Hypothèses de l'effet de la complexification de la formulation d'une matrice sur la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 et sur les activités inhibitrices de l'acide caprylique et de l'acide lactique (BN = Bouillon Nutritif, CAS = caséinates de sodium, MGLA = Matière Grasse Laitière). La représentation schématique de la matrice fromagère est inspirée du schéma de Wilson et al., (2002).

## 6. Références

- Adams, M. R., & Hall, C. J. (1988). Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology*, 23(3), 287–292. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00581.x>
- Akalin, A. S., Göncü, S., & Akbaş, Y. (2002). Variation in organic acids content during ripening of pickled white cheese. *Journal of Dairy Science*, 85(7), 1670–1676. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74239-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74239-2)
- ANSES. (2020). *Table de composition nutritionnelle des aliments Ciqual*. <https://ciqual.anses.fr/>
- Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., & Mafart, P. (2011). The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology*, 146(1), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.042>
- Batovska, D. I., Todorova, I. T., Tsvetkova, I. V., & Najdenski, H. M. (2009). Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: Individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 43–47.
- Berton-Carabin, C. C., Ropers, M. H., & Genot, C. (2014). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 945–977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>
- Boons, K., Noriega, E., Verherstraeten, N., David, C. C., Hofkens, J., & Van Impe, J. F. (2015). The effect of medium structure complexity on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in gelatin-dextran systems. *International Journal of Food Microbiology*, 199, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.015>
- Brocklehurst, B. T. F., & Wilson, P. D. G. (2000). *The role of lipids in controlling microbial growth\_Wilson\_2000*. 51, 66–73.
- Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., & Smith, A. C. (1997). A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, 14(4), 303–311. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0098>
- Brocklehurst, T. F., Parker, M. L., Gunning, P. A., Coleman, H. P., & Robins, M. M. (1995). Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II—Effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(6), 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03106.x>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)
- Buranasuksombat, U., Kwon, Y. J., Turner, M., & Bhandari, B. (2011). Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 793–800. <https://doi.org/10.1007/s10068-011-0110-x>
- Coban, H. B. (2020). Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(4), 569–591. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02256-w>

- Davidson, M., Taylor, M., & David, J. (2021). *Antimicrobials in Food* (D. M. P., T. M. T., & D. J. R.D. (eds.); Fourth Edi). CRC Press.
- de Figueiredo Furtado, G., Mantovani, R. A., Consoli, L., Hubinger, M. D., & da Cunha, R. L. (2017). Structural and emulsifying properties of sodium caseinate and lactoferrin influenced by ultrasound process. *Food Hydrocolloids*, *63*, 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.038>
- Dickinson, E. (2001). Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *20*(3), 197–210. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(00\)00204-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(00)00204-6)
- Dissanayake, M., Ramchandran, L., Piyadasa, C., & Vasiljevic, T. (2013). Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins. *International Dairy Journal*, *28*(2), 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.014>
- Dutoit, A., Decourcelle, N., Mathot, A., & Coroller, L. (2024). Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium. *Food Microbiology*, *121*(February). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104498>
- European Food Safety Authority. (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus spp.* including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. *EFSA Journal*, *14*(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>
- Fagan, C. C., O'Callaghan, D. J., Mateo, M. J., & Dejmek, P. (2017). The Syneresis of Rennet-Coagulated Curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Fourth Edition* (Fourth Edi, Vol. 1). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00006-5>
- FAO. (2022). *Codex Alimentarius - GROUP STANDARD FOR UNRIPENED CHEESE INCLUDING FRESH CHEESE CXS 221-2001*.
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S. L., Guinebrière, M. H., Lereclus, D., & Ramarao, N. (2010). The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology*, *192*(1), 286–294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>
- Hauerlandová, I., Lorencová, E., Buňka, F., Navrátil, J., Janečková, K., & Buňková, L. (2014). The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *182–183*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.027>
- Hnosko, J., Clark, S., & Van Hekken, D. (2009). Latin American Cheeses. In S. Clark, M. Costello, M. A. Drake, & F. Bodyfelt (Eds.), *The sensory evaluation of dairy products* (Second edi, pp. 489–504). Springer Sciences.
- Hsiao, C. P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *47*(3), 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00012-4)
- Hueso, D., Gómez-Guillén, M. C., Fontecha, J., & Gómez-Cortés, P. (2023). Rheological characterization of commercial Burgos-type ultrafiltered fresh cheeses. *Lwt*, *190*(November). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115525>
- JECFA. (2000). Evaluation of certain food additives and contaminants. Fifty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In *World Health Organization - Technical Report Series* (Vol. 891).

- Jovanovic, J., Ornelis, V. F. M., Madder, A., & Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
- Kadri, H. El, Devanthi, P. V. P., Overton, T. W., & Gkatzionis, K. (2017). Do oil-in-water (O/W) nano-emulsions have an effect on survival and growth of bacteria? *Food Research International*, 101(June), 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.064>
- Lambert, R. J., & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157–164. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00646.X>
- Léonard-Akkari, L., Guégan, S., Courand, F., Couvert, O., Lepage, J. F., Rondeau-Mouro, C., Desriac, N., Mathot, A. G., Leguériel, I., Coroller, L., & Decourcelle, N. (2018). Dispersed phase volume fraction, weak acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Research International*, 109(April), 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.016>
- Liang, Y., Gillies, G., Patel, H., Matia-Merino, L., Ye, A., & Golding, M. (2014). Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 36, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.006>
- Liao, W., Gharsallaoui, A., Dumas, E., & Elaissari, A. (2022). Understanding of the key factors influencing the properties of emulsions stabilized by sodium caseinate. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(6), 5291–5317. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13062>
- Liu, Y., Lai, Q., & Shao, Z. (2018). Genome analysis-based reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a later heterotypic synonym of *Bacillus mycoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 106–112. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>
- Ma, X., & Chatterton, D. E. W. (2021). Strategies to improve the physical stability of sodium caseinate stabilized emulsions: A literature review. *Food Hydrocolloids*, 119(May), 106853. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106853>
- Mahmood, M. E., & Al-koofee, D. a F. (2013). Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global Journal of Science Frontier Research Chemistry*, 13(4), 1–7.
- Mertens, L., Geeraerd, A. H., Dang, T. D. T., Vermeulen, A., Serneels, K., Van Derlinden, E., Cappuyns, A. M., Moldenaers, P., Debevere, J., Devlieghere, F., & Van Impe, J. F. (2009). Design of an experimental viscoelastic food model system for studying *Zygosaccharomyces bailii* spoilage in acidic sauces. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7060–7069. <https://doi.org/10.1128/AEM.01045-09>
- Pestana, J. M., Gennari, A., Monteiro, B. W., Lehn, D. N., & De Souza, C. F. V. (2015). Effects of pasteurization and ultra-high temperature processes on proximate composition and fatty acid profile in bovine milk. *American Journal of Food Technology*, 10(6), 265–272. <https://doi.org/10.3923/ajft.2015.265.272>
- Prachaiyo, P., & McLandsborough, L. A. (2003). Oil-in-water emulsion as a model system to study the growth of *Escherichia coli* O157:H7 in a heterogeneous food system. *Journal of Food Science*, 68(3), 1018–1024. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08281.x>

- Ramirez-Hernandez, A., Brashears, M. M., & Sanchez-Plata, M. X. (2018). Efficacy of lactic acid, lactic acid-acetic acid blends, and peracetic acid to reduce salmonella on chicken parts under simulated commercial processing conditions. *Journal of Food Protection*, *81*(1), 17–24. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-087>
- Robins, M. M., & Wilson, P. D. G. (1994). Food structure and microbial growth. *Trends in Food Science and Technology*, *5*(9), 289–293. [https://doi.org/10.1016/0924-2244\(94\)90137-6](https://doi.org/10.1016/0924-2244(94)90137-6)
- 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>
- Šoljić, I., Vermeulen, A., Namboozee, C., Rivière, A., Samapundo, S., & Devlieghere, F. (2018). Solid fat influences sorbic acid partitioning and enhances the preservation effect on *C. guilliermondii* in biphasic food model systems. *International Journal of Food Microbiology*, *285*(July), 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.014>
- Spanu, C., Scarano, C., Spanu, V., Pala, C., Casti, D., Lamon, S., Cossu, F., Ibba, M., Nieddu, G., & De Santis, E. P. L. (2016). Occurrence and behavior of *Bacillus cereus* in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage. *Food Microbiology*, *58*, 135–138. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.002>
- Srinivasan, M., Singh, H., & Munro, P. A. (2002). Formation and stability of sodium caseinate emulsions: Influence of retorting (121°C for 15 min) before or after emulsification. *Food Hydrocolloids*, *16*(2), 153–160. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00072-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00072-8)
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., & Kocić-Tanackov, S. (2016). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *Journal of Food Processing and Preservation*, *40*(5), 990–998. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12679>
- Stratford, M., & Eklund, T. (2003). Organic acids and esters. In *Food Preservatives* (pp. 48–84). [https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_4)
- Sun, R., Vermeulen, A., & Devlieghere, F. (2021). Modeling the combined effect of temperature, pH, acetic and lactic acid concentrations on the growth/no growth interface of acid-tolerant *Bacillus* spores. *International Journal of Food Microbiology*, *360*(April), 109419. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109419>
- Svensson, B., Monthán, A., Shaheen, R., Andersson, M. A., Salkinoja-Salonen, M., & Christiansson, A. (2006). Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal*, *16*(7), 740–749. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.002>
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., & Weiss, J. (2012). Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food and Function*, *3*(3), 290–301. <https://doi.org/10.1039/c2fo10198j>
- Tirloni, E., Bernardi, C., Rosshaug, P. S., & Stella, S. (2019). Potential growth of *Listeria monocytogenes* in Italian mozzarella cheese as affected by microbiological and chemical-physical environment. *Journal of Dairy Science*, *102*(6), 4913–4924. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15991>
- Tirloni, Erica, Bernardi, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., & Stella, S. (2021). Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in

- primo sale fresh cheese. *Lwt*, 151(July), 112170.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112170>
- Tirloni, Erica, Stella, S., Celandroni, F., Mazzantini, D., Bernardi, C., & Ghelardi, E. (2022). *Bacillus cereus* in Dairy Products and Production Plants. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 2572, 11(17), 2572. <https://doi.org/10.3390/FOODS11172572>
- Trunet, C., Mtimet, N., Mathot, A., Postollec, F., Leguerinel, I., Couvert, O., Broussolle, V., Carlin, F., & Coroller, L. (2020). Suboptimal *Bacillus licheniformis* and *Bacillus weihenstephanensis* Spore incubation conditions Increase Heterogeneity of Spore Outgrowth Time. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6).
- Verheyen, D., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., Baka, M., Skåra, T., & Van Impe, J. F. (2020). Isolating the effect of fat content on *Listeria monocytogenes* growth dynamics in fish-based emulsion and gelled emulsion systems. *Food Control*, 108(July 2019), 106874. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106874>
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., & Cui, M. (2014). Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control*, 46, 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.024>
- Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (2015). The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, 4(May), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>
- Wells-Bennik, M. H. J., Eijlander, R. T., Den Besten, H. M. W., Berendsen, E. M., Warda, A. K., Krawczyk, A. O., Nierop Groot, M. N., Xiao, Y., Zwietering, M. H., Kuipers, O. P., & Abee, T. (2016). Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 457–482. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-041715-033144>
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: Towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 275–289. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00660-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00660-2)
- Wong, H. C., Chen, Y. L., & Chen, C. L. F. (1988). Growth, Germination and Toxigenic Activity of *Bacillus cereus* in Milk Products. *Journal of Food Protection*, 51(9), 707–710. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-51.9.707>
- Zalazar, A. L., Gliemmo, M. F., & Campos, C. A. (2016). Effect of stabilizers, oil level and structure on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* and on physical stability of model systems simulating acid sauces. *Food Research International*, 85, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.040>
- Zeppa, G., Conterno, L., & Gerbi, V. (2001). Determination of organic acids, sugars, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2722–2726. <https://doi.org/10.1021/jf0009403>
- Zhao, S., Chen, J., Fei, P., Feng, H., Wang, Y., Ali, M. A., Li, S., Jing, H., & Yang, W. (2020). Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China. *Journal of Dairy Science*, 103(5), 3994–4001. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17541>

---

## **Discussion générale et perspectives**

---

L'utilisation de composés inhibiteurs naturels a été largement étudié pour contrôler la multiplication de microorganismes pathogènes et d'altérations dans l'alimentation. Néanmoins ces composés peuvent présenter une baisse d'efficacité lors de leur mise en œuvre dans les aliments en raison de la complexité structurelle et physico-chimique des matrices alimentaires (Weiss et al., 2015). L'objectif général de la thèse était de mettre en évidence les interactions entre bactéries sporulées, composés inhibiteurs et constituants des aliments afin de mieux comprendre l'impact des propriétés physico-chimiques d'acides inhibiteurs sur leur activité antibactérienne au sein de systèmes biphasiques, *i.e* des émulsions huile dans eau. Pour cela, l'activité inhibitrice de certains composés a été évaluée dans un milieu nutritif liquide (Chapitre 2), puis dans une émulsion huile-eau modèle (Chapitre 3) et dans des émulsions huile-eau composées d'ingrédients laitiers et enfin dans des matrices fromagères (Chapitre 4). L'étude a été menée sur la bactérie sporulée *B. weihenstephanensis* KBAB4, considérée comme un modèle du groupe *B. cereus*. Cette bactérie, psychrotrophe, peut contaminer les aliments réfrigérés constituant un risque pour la santé des consommateurs et générant des pertes économiques pour les industriels en cas d'altération des produits (Antolinos et al., 2012).

**Les caractéristiques physico-chimiques des composés inhibiteurs influencent leur activité inhibitrice de croissance sur *B. weihenstephanensis* KBAB4, en milieu nutritif.**

Les caractéristiques physico-chimiques de sept composés inhibiteurs (l'acide acétique, lactique, propionique, phényllactique, caprylique, laurique et la monolaurine) ont été mises en relation avec les propriétés inhibitrices en milieu nutritif (CMI, CNI,  $\alpha$ ) afin d'évaluer leur efficacité inhibitrice (Chapitre 2).

Cette étude a révélé que la forme de l'acide responsable de l'inhibition de la croissance varie en fonction de la structure chimique du composé et de son pKa. La forme active des acides carboxyliques à courte et moyenne chaîne de carbone sur l'inhibition de la croissance bactérienne est la forme non dissociée, responsable de la diminution du pH intracellulaire, comme il a été largement reconnu dans la littérature (Brul & Coote, 1999; Lambert & Stratford, 1999). L'efficacité inhibitrice des acides acétique, lactique, propionique, phényllactique et caprylique est donc dépendante du pH, ils sont à privilégier en tant qu'agents antimicrobiens dans des environnements à pH acide. Cependant, les propriétés inhibitrices de l'acide laurique et de la monolaurine ne sont pas affectées par le pH de l'environnement, ces composés inhibent la croissance de *B. weihenstephanensis* grâce à leur forme totale, soulignant un mode d'action différent de ces composés sur la membrane bactérienne.

Le mode d'action des composés sur les cellules pourrait être approfondi par cytométrie en flux grâce à la mesure du pH intracellulaire ou du potentiel membranaire par exemple (Léonard et al., 2016). Les bactéries sont capables de s'adapter à des conditions environnementales changeantes en intégrant des acides gras exogènes à leur membrane, l'identification et la quantification des acides gras membranaires pourrait également mettre en évidence l'adaptabilité de la bactérie en réponse à ces acides (De Sarrau et al., 2012). Par ailleurs, des approches biophysiques qui simulent les membranes bactériennes, telles que les liposomes, pourraient également être envisagées pour étudier le mode d'action des acides gras à longues chaînes et des monoglycérides sur la membrane. Ces approches, couplées à d'autres techniques (fluorescence, microscopie, DLS, etc.), permettent d'étudier les interactions entre des lipides antimicrobiens et des membranes phospholipidiques modèles en mesurant des comportements morphologiques comme les fluctuations de taille des liposomes, la fission ou fusion membranaire ou encore la fluidité membranaire (Yoon et al., 2018). Une étude a d'ailleurs découvert que l'acide laurique et la monolaurine présentent tous deux un comportement disruptif envers des bicouches lipidiques supports (Supported Lipid Bilayers), principalement à une concentration supérieure à leur CMC, mais que le type d'interactions et de translocations formées est différent en fonction de la nature du composé (acide gras ou monoglycéride) (Yoon et al., 2015). Ces différentes méthodes permettraient d'optimiser l'utilisation de composés inhibiteurs en fonction de leur concentration et de leurs caractéristiques physico-chimiques envers les membranes bactériennes.

Deux modèles prévisionnels ont été comparés pour déterminer les propriétés inhibitrices des composés, le modèle de Luong (1985) et le modèle de Lambert & Pearson (2000). Ces modèles intègrent des paramètres non biologiques ( $\alpha$ ) ou biologiques (CNI) pour estimer la CMI du composé dans le milieu nutritif. La comparaison de ces modèles prévisionnels présente plusieurs avantages. Premièrement, cela a permis d'évaluer et comparer la qualité d'ajustement des modèles en fonction du composé étudié et de ses caractéristiques. L'étude a révélé que le modèle de Luong (1985) permettait un meilleur ajustement et une meilleure estimation des paramètres d'inhibition des acides organiques à faible poids moléculaire (l'acide acétique, lactique, propionique) tandis que le modèle de Lambert & Pearson (2000) permet un meilleur ajustement et une meilleure estimation des paramètres d'inhibition des composés avec un poids moléculaire plus élevé (l'acide phényllactique, caprylique, laurique et la monolaurine). L'utilisation et la comparaison de ces deux modèles a permis de prendre en compte l'importance de paramètres complémentaires à la CMI dans l'évaluation des propriétés inhibitrices de

composés antibactériens et ainsi renforcer la compréhension de leur efficacité inhibitrice. Le paramètre  $\alpha$ , caractérisant l'allure de la courbe et la réponse du microorganisme aux variations de concentrations en agent antibactérien, n'est pas corrélé à la CMI dans le modèle de Luong (1985). Les agents antibactériens efficaces selon ce modèle sont donc des composés présentant une faible CMI (acide lactique, phényllactique, caprylique, laurique et la monolaurine). Cependant, la CNI ou concentration en dessous de laquelle la croissance de la souche n'est pas impactée par la concentration du composé, estimée par le modèle de Lambert & Pearson (2000) est fortement corrélée à la valeur de la CMI. Selon ce modèle, l'efficacité inhibitrice d'un composé est reflétée par une faible CNI et une faible CMI, qui sont retrouvées pour l'acide phényllactique, caprylique, laurique et la monolaurine. Par conséquent, selon le modèle prévisionnel appliqué et la corrélation entre les paramètres estimés, l'efficacité inhibitrice des composés est exprimée différemment. Les utilisateurs de ces modèles doivent donc prendre en compte ces nuances lors de leur application pour évaluer et comparer les propriétés inhibitrices de ces composés.

Ces observations mettent cependant en évidence qu'augmenter le nombre de carbone dans la structure chimique d'un composé ou ajouter un groupement aromatique est lié à une diminution du coefficient de partage de la molécule et à l'obtention d'une CMI plus faible, soulignant l'implication de la structure chimique et de l'hydrophobicité de la molécule. Ainsi, l'efficacité inhibitrice d'un agent antibactérien est le résultat de sa lipophilicité se traduisant soit par une plus forte dissociation à pH acide en fonction de son pKa ou par sa structure chimique induisant un coefficient de partage plus élevé. Il serait utile d'étendre ces observations à plusieurs espèces du groupe *B. cereus*, afin d'évaluer la diversité intraspécifique. Enfin, ces résultats pourraient améliorer les modèles existants qui prédisent la Concentration Minimale Inhibitrice de composés en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques (Hsiao & Siebert, 1999; Nakai & Siebert, 2003, 2004).

**Les propriétés inhibitrices des acides organiques et la culturabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sont impactées par l'exposition à un système biphasique.**

La lipophilicité des acides traduit leur efficacité inhibitrice en milieu aqueux, cependant elle traduit également leur affinité pour une phase organique. L'inhibition de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 a donc été comparée dans un milieu nutritif et dans une émulsion huile dans eau 50/50 modèle en absence d'acide ou en présence d'acide acétique, lactique, caprylique et laurique à une concentration donnée à pH 6,0 et 5,5.

Cette étude a avant tout mis en évidence la limite de la méthode de dénombrement sur boîte de Pétri pour étudier la croissance de la souche dans des milieux biphasiques. Une baisse inattendue des concentrations cellulaires de la souche, suivie d'une soudaine augmentation, a été observée lorsque les cellules ont été incubées en émulsion modèle puis cultivées sur milieu BHA. Ces observations ont été faites dans les émulsions en absence d'acide et en présence d'acide acétique, caprylique et laurique aux deux pH étudiés. Elles n'ont pas permis l'ajustement du modèle de croissance (modèle de Rosso et al., 1995) et l'estimation des paramètres pour comparer l'activité inhibitrice des acides.

Une méthode alternative par cytométrie en flux a été développée afin d'évaluer la viabilité cellulaire de *B. weihenstephanensis* KBAB4 au sein de l'émulsion modèle, en utilisant des marqueurs fluorescents d'acides nucléiques. Cette méthode a offert l'avantage d'une visualisation directe de l'évolution de la quantité de cellules végétatives au sein de l'émulsion, sans avoir recours à une séparation des phases et à une déstructuration de la matrice. De plus, cette méthode a permis de confirmer l'intégrité membranaire des cellules incubées dans l'émulsion modèle au cours du temps, en absence d'inhibiteur, soulignant la capacité de croissance de la souche dans cette matrice. Ces résultats ont alors mis en évidence une perte de culturabilité de la souche sur le milieu et l'apparition d'un état viable mais non cultivable (VBNC) de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur le milieu BHA suite à son exposition à une émulsion H/E. Par définition, les bactéries en état VBNC ne sont plus capables de recouvrir sur un milieu gélosé de laboratoire alors qu'elles sont toujours vivantes et maintiennent une activité métabolique et une intégrité membranaire dans le milieu dans lequel elles sont incubées (Oliver, 2005). Cette étude montre un risque pour la santé publique que peut représenter la sous-détection de bactéries pathogènes métaboliquement viables mais incapable de recouvrir sur un milieu gélosé. Cela peut entraîner un niveau de contamination élevé des produits alimentaires, non détecté en raison de résultats faussement négatifs lors des contrôles microbiologiques mis en place par les industriels. C'est pourquoi, il serait intéressant de vérifier l'apparition de ce phénomène sur des milieux gélosés sélectifs du groupe *B. cereus* régulièrement utilisés pour leur dénombrement dans les aliments, tels que le milieu gélosé MYP (au mannitol, jaune d'œuf et polymixine), le milieu BACARA, le milieu COMPASS BC conformes à la norme de référence NF EN ISO 7932 (AFNOR, 2005). De plus, il serait essentiel de vérifier et de caractériser si la perte de culturabilité sur le milieu BHA est une caractéristique commune du groupe *B. cereus*, en étudiant d'autres souches pathogènes issues des différents groupes de *B. cereus* *sl*, représentatives de la diversité génétique et phénotypique (Carlin et al., 2013;

Guinebretière et al., 2008). Ces résultats permettraient une meilleure évaluation du potentiel risque que représente cette perte de culturabilité pour la santé publique.

Grâce à l'utilisation d'un milieu gélosé de composition similaire à l'émulsion modèle ou encore à l'addition d'agents anti-ROS sur le milieu BHA comme la catalase et la thiourée, la souche a retrouvé sa capacité de recouvrement sur ces milieux. En dénombrant sur ces milieux gélosés exempt de ROS, la croissance de la souche n'a pas été impactée par la présence d'une phase grasse dispersée, en condition optimale. Les substances réactives à l'oxygène (ROS) sont donc impliquées dans la perte de culturabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur le milieu BHA, en raison de l'accumulation de peroxyde d'hydrogène issu de l'autoclavage simultané de l'agar et du phosphate présents dans le milieu de culture (Watanabe et al., 2022). Ces résultats mettent ainsi en évidence l'incapacité des cellules à neutraliser le peroxyde d'hydrogène généré sur le milieu BHA, comme il a déjà été constaté sur d'autres microorganismes (Hong et al., 2019; Kong et al., 2004; O'Donoghue et al., 2016). L'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> métabolique, attribuée à une faible activité de la catalase a été identifiée comme facteur principal contribuant à la réduction de la capacité de formation de colonies des cellules exposées à un stress (Juven & Pierson, 1996).

Par ailleurs, le développement d'un modèle simulant l'évolution des cellules viables dans les émulsions modèles 50/50 en présence d'acide a permis de caractériser le phénomène de perte de culturabilité (la proportion maximale  $P_{max}$ , le temps d'apparition  $t_{ina}$ , la dispersion du temps d'apparition  $\sigma$  et le temps de résurrection  $t_{rec}$ ) de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur BHA. La diminution du pH n'affecte pas la proportion de cellules incapables de recouvrir sur le milieu BHA ( $P_{max}$ ) mais retarde l'apparition de la perte de culturabilité ( $t_{ina}$ ) et de la capacité de recouvrement ( $t_{rec}$ ). Dans la majorité des conditions étudiées, la perte de culturabilité ( $t_{ina}$ ) apparaît avant la phase exponentielle entre 4h et 16h d'incubation et la capacité de recouvrement des cellules ( $t_{rec}$ ) est retrouvée pendant la phase stationnaire (entre 8 h et 28 h d'incubation), suggérant un lien avec la densité cellulaire. La restauration de la culturabilité des cellules pourrait être due à une résistance accrue aux stress oxydatifs pendant la phase stationnaire résultant de la mise en place d'une réponse aux stress par les cellules induite par le manque de nutriments et une meilleure sensibilité au quorum sensing lorsque la concentration cellulaire est maximale. den Besten et al. (2013) ont montré que l'activité catalasique augmente naturellement chez *B. weihenstephanensis* KBAB4 en fin de phase exponentielle et que celle-ci peut être utilisée comme biomarqueur de stress bactérien. Par ailleurs, la perte de culturabilité n'a pas été observée dans les émulsions modèles avec ajout d'acide lactique non dissocié à

1,80 mM aux deux pH. La présence d'acide lactique dans ces milieux pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition du phénomène observé à travers son impact sur la structure de l'émulsion (diamètre et distribution granulométrique plus élevé) ou bien de par l'activité antioxydante du lactate de sodium (FAO, 2023).

En perspective de cette étude, il serait intéressant d'investiguer la difficulté de réponse à un stress oxydatif des cellules de *B. weihenstephanensis* KBAB4 incubées en émulsion modèle, en suivant leur activité catalasique. Pour cela des études transcriptomiques ou spectrophotométriques pourraient être mises en place. Une technique de séquençage ARN serait envisagée pour élucider les différences dans les profils transcriptionnels des cellules de *B. weihenstephanensis* KBAB4 incubées en milieu nutritif et en émulsion modèle 50/50, en présence d'acide. L'analyse comparative de l'expression des gènes impliquées dans les mécanismes associés aux stress oxydatifs, tels que les gènes codants pour les catalases, thiorédoxines réductases et peroxydases, permettrait de mieux comprendre l'état physiologique de la souche en fonction des conditions de croissance (Imdahl et al., 2020; Morawska & Kuipers, 2022). De plus, cette méthode permettrait également de caractériser l'effet inhibiteur des acides au sein de l'émulsion et de mettre en évidence des mécanismes antimicrobiens sur la physiologie cellulaire (Mols et al., 2010). Par ailleurs, il serait également possible de suivre l'activité catalasique de la souche par spectrophotométrie. La diminution d'une unité d'absorbance à 240 nm par minute correspond à une unité d'activité catalasique (den Besten et al., 2013; Den Besten et al., 2009). Cependant, ces différentes méthodes ne peuvent être mises en place sans la récupération des cellules incubées dans l'émulsion modèle, ce qui demanderait une déstructuration de la matrice ou bien une séparation des phases et cela peut s'avérer complexe en raison de la stabilité de l'émulsion modèle. Néanmoins, ces résultats complémentaires permettraient de vérifier si la perte de culturabilité des cellules est le résultat d'une diminution d'activité métabolique causée par un stress induit par leur exposition à une émulsion ou seulement par une incapacité à réagir aux stress oxydatifs générés par le milieu de culture. Comme évoqué précédemment, cette étude devrait être reproduite sur plusieurs souches du groupe *B. cereus* afin de considérer la diversité au sein de l'espèce concernant la réponse aux stress dans des systèmes biphasiques.

Pour finir, dans cette étude, à partir des hypothèses émises pour la simulation de l'évolution des cellules viables dans les émulsions modèles en présence d'acide (taux de croissance et temps de latence identiques ou non à ceux estimés en bouillon nutritif), l'activité inhibitrice des acides a pu être supposée. Il semble que l'activité inhibitrice de l'acide acétique et de l'acide

lactique dans les émulsions modèles soit maintenue tandis que l'activité inhibitrice de l'acide caprylique et de l'acide laurique dans les émulsions semble absente. La croissance de la souche dans ces deux dernières conditions est comparable à la croissance en condition optimale. Ces hypothèses soulignent le rôle de la lipophilicité de la molécule, exprimée par un coefficient de partage plus élevé, dans la baisse d'activité inhibitrice observée dans une émulsion H/E.

**La nature des émulsifiants et de la phase grasse d'une émulsion H/E modifient les propriétés inhibitrices d'acides en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.**

La présence d'une phase grasse semble influencer les propriétés inhibitrices d'acides organiques en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques dans une émulsion H/E modèle, préparée à partir d'ingrédients non alimentaire. La formulation des émulsions modèles H/E 20/80 a donc été changée et complexifiée en vue d'intégrer des ingrédients intervenant dans la composition de produits laitiers tels que les caséinates de sodium, en tant qu'émulsifiant (à 10 % p/v) et la matière grasse laitière en tant que phase huileuse (à un ratio de 20% v/v). La modification de ces paramètres a été étudiée sur l'activité inhibitrice de germination et de croissance de l'acide lactique et de l'acide caprylique sur *B. weihenstephanensis* KBAB4.

Dans un premier temps, la modulation des paramètres de formulation a entraîné des changements dans le procédé d'émulsification dans le but d'obtenir une émulsion stable pendant 4 jours à 30°C. Ces changements ont conduit à l'obtention d'émulsions H/E avec des caractéristiques physico-chimiques significativement différentes. Les émulsions composées d'hexadécane et stabilisées par des caséinates de sodium possèdent des gouttelettes de diamètre significativement plus élevé ( $d = 3,601 \pm 0,239 \mu\text{m}$ ) ainsi qu'une distribution granulométrique plus grande ( $D = 3,619 \pm 0,367$ ) que les autres émulsions composées d'hexadécane et de Tween 80/Span 80 ou de matière grasse laitière et de caséinates. Cette différence est le résultat d'une formation de gouttelettes retardée en raison de la viscosité plus élevée de la phase aqueuse composée de caséinates et d'un temps de sonication réduit. Cette étude souligne donc la difficulté de modifier un unique paramètre lors de la conception et de l'élaboration de ces systèmes alimentaires modèles, sans transformer les caractéristiques physico-chimiques et structurales de ces produits. Cela indique également l'importance de prendre en compte ces facteurs pour l'évaluation de la croissance microbienne.

En effet, la structure du milieu a impacté la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans ces matrices. Le taux de croissance de la souche est significativement plus élevé dans les émulsions avec des gouttelettes de diamètres supérieurs (dans les émulsions composées

d'hexadécane et de caséinates) en conditions optimales mais le taux de germination n'est pas impacté. *B. weihenstephanensis* KBAB4 est une bactérie protéolytique, capable d'utiliser les acides aminés et peptides formés suite à la digestion des protéines (ici les caséinates), comme source de carbone et d'énergie (Guillemet et al., 2010). L'accès à ces sources de nutriments serait donc facilité dans ces émulsions, ce qui pourrait favoriser leur croissance.

Les deux acides inhibiteurs, dans cette étude, ont été sélectionnés pour leurs caractéristiques physico-chimiques, se traduisant notamment par des structures chimiques différentes et des propriétés hydrophiles opposées ( $\log P_{AL} = -0,72$  et  $\log P_{AC} = 3,05$ ). Cette étude a révélé que leur activité inhibitrice est modulée en fonction de la nature des ingrédients utilisés dans la formulation des milieux. L'activité inhibitrice de l'acide caprylique, acide lipophile, est fortement influencée par la formulation du milieu tandis que l'activité inhibitrice de l'acide lactique est impactée par la diminution du pH, qui s'est avéré être influencé par la formulation mais surtout par les traitements de stérilisation subis lors de la préparation des milieux.

A une concentration de 0,075 mM, l'acide caprylique n'a pas montré d'activité inhibitrice de la germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux étudiés, même dans le bouillon nutritif seul. Cependant, en présence d'émulsifiants dans le bouillon nutritif (Tween 80 et caséinates) et d'acide caprylique, le taux de croissance et le temps de latence de la souche sont identiques à la condition optimale, contrairement à ce qui a été observé en bouillon nutritif seul. Ces résultats confirment la présence d'interactions entre des acides gras lipophiles et des émulsifiants, se traduisant par une baisse d'activité inhibitrice (Davidson et al., 2021; Nielsen et al., 2016). L'acide caprylique est en effet capable de se solubiliser à l'intérieur des micelles de Tween 80 ou de former des complexes avec des protéines telles que les caséinates, ce qui diminue sa disponibilité et réduit ses interactions avec les membranes bactériennes. De plus, cette baisse d'activité inhibitrice a été également observée dans les émulsions H/E 20/80, quelle que soit la nature des ingrédients utilisés. L'efficacité inhibitrice d'un composé dans une émulsion dépend de la concentration disponible en phase aqueuse, lieu de croissance bactérienne, c'est pourquoi ces résultats mettent en avant une répartition majoritaire de l'acide caprylique dans les phases organiques en raison de son caractère hydrophobe.

En perspective de cette étude, des mesures expérimentales de coefficient de partage de l'acide caprylique dans les émulsions étudiées seraient à réaliser. Pour cela, différentes concentrations d'acide caprylique seront ajoutées au milieu nutritif, et ce milieu sera mis en contact avec une phase grasse pendant plusieurs heures à 30°C, sous agitation pour permettre au composé de se répartir entre les phases. Ensuite, les phases seront séparées par décantation

et l'acide caprylique extrait puis dosé dans chacune d'elles par chromatographie en phase gazeuse. A l'aide d'une méthode optimisée et adaptée à l'analyse quantitative, il sera possible d'évaluer la répartition et la distribution de l'acide caprylique dans ces systèmes (Scortichini et al., 2020) et ainsi de pouvoir également prendre en compte l'impact d'autres facteurs sur cette répartition (pH, nature de la matière grasse, ratio volumique, etc.).

En ce qui concerne l'acide lactique, cet acide possède une activité inhibitrice de la germination et de la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans les milieux étudiés, excepté dans le bouillon nutritif en présence de Tween 80. Dans ce milieu le taux de croissance et le temps de latence de la souche en présence d'acide lactique sont identiques à ceux estimés dans la condition optimale. Une étude a montré que le Tween 80 est utilisé comme source de carbone et d'énergie lors de son ajout dans un milieu de culture et que l'acide oléique qui le compose est directement incorporé dans les cellules bactérienne en tant qu'acide gras (Taoka et al., 2011). La modification de la composition en acide gras des membranes chez *B. cereus* peut avoir un effet positif sur la survie des cellules végétatives et la capacité de germination des spores dans un environnement donné (Diomandé et al., 2015), limitant ainsi l'action de l'acide lactique sur les membranes par exemple. Cependant, l'étude a également mis en avant que la présence simultanée de caséinates de sodium et d'une concentration en acide lactique de 250 mM dans les milieux, augmente les propriétés inhibitrices de germination et de croissance de l'acide. Dans ces conditions, la modification de la formulation est accompagnée d'une diminution du pH, entraînant une plus forte proportion d'acide lactique non dissocié. Cette forte proportion d'acide non dissociée, supérieure à la CMI de l'acide évaluée en milieu nutritif, diminue le taux de germination de la souche dans ces milieux et inhibe sa croissance. Pour compléter cette étude, des concentrations en acide lactique inférieure à 250 mM serait à tester, afin de faire varier la proportion en acide lactique non dissocié en fonction du pH et être capable d'observer une inhibition de croissance moins forte. Les résultats de l'étude mettent donc en évidence la capacité des constituants de la matrice à piéger ou bien à agir synergiquement avec les composés inhibiteurs et ainsi moduler leur efficacité inhibitrice.

**La matrice fromagère représente un modèle potentiel pour étudier la transférabilité des résultats à l'échelle industrielle.**

Enfin, la complexification de la formulation des émulsions a mené à l'élaboration d'une matrice fromagère. Cette matrice fromagère a présenté un intérêt principal pour le projet : l'étude de la transférabilité des résultats à une matrice alimentaire laitière réelle. De plus, cette

matrice est facile à concevoir de manière stérile, est entièrement réalisée à partir d'ingrédients retrouvés dans l'alimentaire (lait, sels, présure microbienne) et l'absence d'ingrédients annexes (conservateurs ou additifs technologiques) ont permis de mieux contrôler et visualiser la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4. L'étude d'activités inhibitrices d'agents antibactériens dans des matrices fromagères contre le développement de bactéries pathogènes alimentaire a déjà été étudiée (Henderson et al., 2019; Tirloni et al., 2021; Van Tassell et al., 2015). Cependant, dans notre cas, l'étude de la matrice fromagère en complément des émulsions dites modèles élaborées à l'échelle du laboratoire, a permis de confirmer les résultats obtenus dans les émulsions modèles concernant l'activité inhibitrice des acides organiques et donc de transférer ces résultats à l'échelle de l'aliment.

En effet, une baisse d'activité inhibitrice de l'acide caprylique a été mise en avant dans les matrices fromagères comparées au bouillon nutritif, à des concentrations de 0,075 et 0,25 mM. La germination des spores de *B. weihenstephanensis* KBAB4 est possible en matrice fromagère et n'est pas inhibée par la présence d'acide caprylique, tout comme la croissance de la souche. Cependant, l'ajout d'acide lactique à des concentrations égales à 125 et 250 mM, diminue le taux de germination et le taux de croissance de la souche par rapport aux conditions optimales.

Cette étude a également révélé que l'ajout d'un mélange de deux acides organiques aux caractères hydrophobes opposés, possède la même activité inhibitrice envers la germination et la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 que l'ajout du composé hydrophile seul (l'acide lactique) quelle que soit la concentration d'acide lipophile (acide caprylique) dans le mélange. Des études précédentes ont pourtant démontré l'effet synergique de l'acide lactique et de l'acide caprylique pour inhiber la croissance de *L. monocytogenes* en bouillon nutritif (Kozak et al., 2017) ainsi que sur la surface de fromage frais pendant 35 jours (Kozak et al., 2018). Bien qu'aucune synergie entre l'acide lactique et l'acide caprylique n'a été constaté en matrice fromagère, les résultats d'autres études suggèrent des perspectives intéressantes pour explorer d'autres possibilités de combinaisons d'agents antimicrobiens dans ces matrices afin d'inhiber la croissance de bactéries sporulées. Par exemple, Tokarsky & Marshall (2008), ont suggéré que l'acide lactique provoquait l'augmentation de l'incorporation de la monolaurine dans la membrane cellulaire de *L. monocytogenes*, lorsque ces composés sont étudiés en combinaison.

Les taux de croissance observés dans les matrices fromagères (Chapitre 4) et les taux de croissance observés dans le bouillon nutritif à pH 6,0 (Chapitre 2) de *B. weihenstephanensis* KBAB4, en fonction des concentrations en acide lactique ou caprylique non dissociées sont représentés dans la Figure 35. Dans la gamme testée, la concentration en acide caprylique non

dissociée en matrice fromagère n'a pas d'impact sur l'inhibition du taux de croissance, contrairement à ce qui a été observé en bouillon nutritif à pH 6,0 (Figure 35A). Ces résultats soulignent l'inefficacité de l'acide caprylique en tant qu'agent antibactérien dans les matrices fromagères et démontrent que l'activité inhibitrice d'acides lipophiles ne peut être prévue à partir de résultats acquis en milieu nutritif. Cela pourrait être vérifié en étudiant des concentrations plus élevées en acide caprylique dans la matrice. Cette figure montre également que l'effet de la concentration en acide lactique non dissocié est conservé dans les matrices fromagères mais que cet effet est plus fort, en raison de la structure de la matrice (Figure 35B). En effet, le taux de croissance optimal de la souche dans les matrices fromagères est plus faible qu'en bouillon nutritif, soulignant l'impact de la structure sur la mobilité et le développement de la souche dans des matrices gélifiées. Ces résultats indiquent que les propriétés inhibitrices de croissance de l'acide lactique pourraient être prévues dans des matrices alimentaires telles que des fromages frais non affinés à partir de résultats obtenus en milieu de laboratoire, par modélisation. Cependant, l'effet supplémentaire de la structure de la matrice doit être pris en compte.

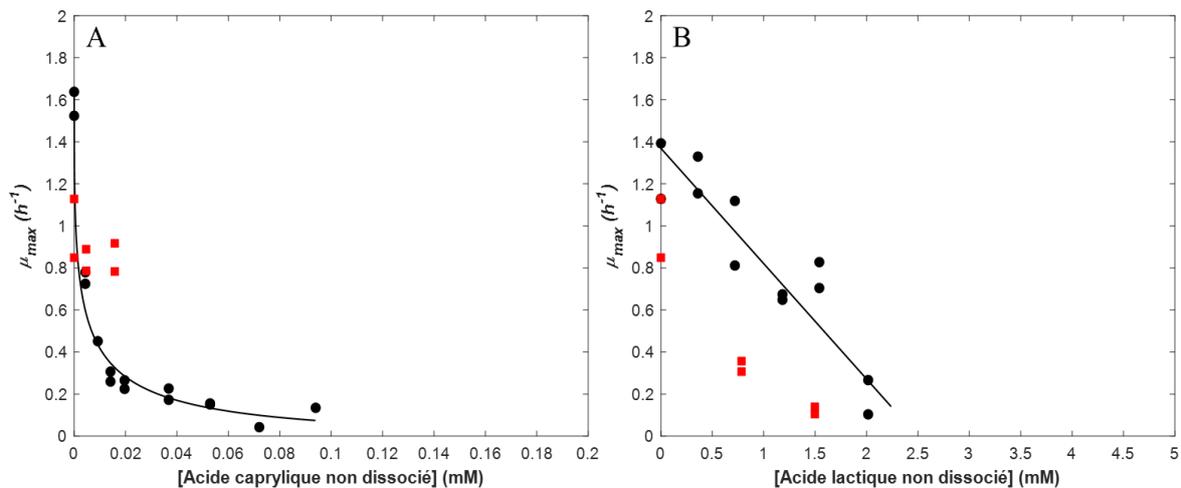


Figure 35 : Taux de croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 observés en bouillon nutritif (ronds noirs) et en matrice fromagère (carrés rouges) en fonction de la concentration en acide caprylique non dissociée (A) et de la concentration en acide lactique non dissociée (B) à pH 6,0. Les symboles représentent les données expérimentales, les lignes noires correspondent aux ajustements des modèles. Les données de la figure A ont été ajustées par le modèle de Lambert & Pearson (2000) et les données de la figure B par le modèle de Luong (1989).

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des interactions entre les bactéries sporulées, les acides inhibiteurs et la matrice alimentaire laitière, plusieurs études multi-échelles seraient à privilégier. La mobilité et la localisation des spores et cellules végétatives de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans ces matrices fromagères pourrait être visualisée par microscopie confocale à l'aide de marqueurs fluorescents. Cette étude permettrait d'approfondir les connaissances sur la distribution spatiale des bactéries au sein de matrices alimentaires. De plus, il pourrait être envisagé d'étudier la localisation/distribution d'un composé inhibiteur par une approche moléculaire fluorimétrique. Cette technique consiste à sélectionner des sondes fluorescentes capables de se fixer sélectivement à l'inhibiteur et de mesurer leurs interactions par spectrofluorimétrie ou par microscopie à épifluorescence (Faggiano et al., 2019; Li et al., 2012). La faisabilité de cette approche demande à être vérifiée. Cependant, cela permettrait de mieux comprendre le comportement des acides dans les matrices et l'impact de leur localisation sur leur activité antibactérienne.

## Références

- AFNOR. (2005). *Méthode horizontale pour le dénombrement de Bacillus cereus présumptifs (NF EN ISO 7932)*.
- Antolinos, V., Muñoz-Cuevas, M., Ros-Chumillas, M., Periago, P. M., Fernández, P. S., & Le Marc, Y. (2012). Modelling the effects of temperature and osmotic shifts on the growth kinetics of *Bacillus weihenstephanensis* in broth and food products. *International Journal of Food Microbiology*, 158(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.017>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1–2), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)
- Carlin, F., Albagnac, C., Rida, A., Guinebretière, M. H., Couvert, O., & Nguyen-the, C. (2013). Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for risk assessment. *Food Microbiology*, 33(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.014>
- Davidson, M., Taylor, M., & David, J. (2021). *Antimicrobials in Food* (D. M. P., T. M. T., & D. J. R.D. (eds.); Fourth Edi). CRC Press.
- De Sarrau, B., Clavel, T., Clerté, C., Carlin, F., Giniès, C., & Nguyen-The, C. (2012). Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1715–1723. <https://doi.org/10.1128/AEM.06410-11>
- den Besten, H. M. W., Effraïmidou, S., & Abee, T. (2013). Catalase activity as a biomarker for mild-stress-induced robustness in *Bacillus weihenstephanensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 57–62. <https://doi.org/10.1128/AEM.02282-12>
- Den Besten, H. M. W., Mols, M., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2009). Phenotypic and transcriptomic analyses of mildly and severely salt-stressed *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12), 4111–4119. <https://doi.org/10.1128/AEM.02891-08>
- Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 6(AUG), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00813>
- Faggiano, S., Ronda, L., Raboni, S., & Mozzarelli, A. (2019). ADIFAB fluorescence data used for the quantification of free fatty acids in media at different pH. *Data in Brief*, 22, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.12.006>
- FAO. (2023). *Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online database, Food Additives Details*. <https://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=84>
- Guillemet, E., Cadot, C., Tran, S. L., Guinebretière, M. H., Lereclus, D., & Ramarao, N. (2010). The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 286–294. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>
- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., & De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, 10(4), 851–865. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>

- Henderson, L. O., Cabrera-Villamizar, L. A., Skeens, J., Kent, D., Murphy, S., Wiedmann, M., & Guariglia-Oropeza, V. (2019). Environmental conditions and serotype affect *Listeria monocytogenes* susceptibility to phage treatment in a laboratory cheese model. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 9674–9688. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16474>
- Hong, Y., Zeng, J., Wang, X., Drlica, K., & Zhao, X. (2019). Post-stress bacterial cell death mediated by reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(20), 10064–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901730116>
- Hsiao, C. P., & Siebert, K. J. (1999). Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 47(3), 189–201. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00012-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00012-4)
- Imdahl, F., Vafadarnejad, E., Homberger, C., Saliba, A. E., & Vogel, J. (2020). Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria. *Nature Microbiology*, 5(10), 1202–1206. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0774-1>
- Juven, B. J., & Pierson, M. D. (1996). Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1233–1241. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-59.11.1233>
- Kong, I. S., Bates, T. C., Hülsmann, A., Hassan, H., Smith, B. E., & Oliver, J. D. (2004). Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.004>
- Kozak, S. M., Bobak, Y., & D’Amico, D. J. (2018). Efficacy of antimicrobials applied individually and in combination for controlling *Listeria monocytogenes* as surface contaminants on queso fresco. *Journal of Food Protection*, 81(1), 46–53. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-279>
- Kozak, S. M., Margison, K. M., & D’Amico, D. J. (2017). Synergistic antimicrobial combinations inhibit and inactivate *Listeria monocytogenes* in neutral and acidic broth systems. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1266–1272. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-035>
- Lambert, R. J., & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal of Applied Microbiology*, 86(1), 157–164. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1999.00646.X>
- Lambert, R. J. W., & Pearson, J. (2000). Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*, 88(5), 784–790. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01017.x>
- Léonard, L., Chibane, L. B., Bouhedda, B. O., Degraeve, P., & Oulahal, N. (2016). Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01225>
- Li, J., Henry, E., Wang, L., Delelis, O., Wang, H., Simon, F., Tauc, P., Brochon, J. C., Zhao, Y., & Deprez, E. (2012). Comparative Study of the Fatty Acid Binding Process of a New FABP from *Cherax quadricarinatus* by Fluorescence Intensity, Lifetime and Anisotropy. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051079>
- Luong, J. H. T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology*

- and *Bioengineering*, 27(3), 280–285. <https://doi.org/10.1002/BIT.260270311>
- Mols, J. M., van Kranenburg, R., Tempelaars, M. H., van Schaik, W., Moezelaar, R., & Abee, T. (2010). Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1), 13–21.
- Morawska, L. P., & Kuipers, O. P. (2022). Transcriptome analysis and prediction of the metabolic state of stress-induced viable but non-culturable *Bacillus subtilis* cells. *Scientific Reports*, 12(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21102-w>
- Nakai, S. A., & Siebert, K. J. (2003). Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 86(3), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00551-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00551-2)
- Nakai, S. A., & Siebert, K. J. (2004). Organic acid inhibition models for *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 21, 67–72. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00043-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00043-1)
- Nielsen, C. K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., & Meyer, R. L. (2016). Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01878>
- O'Donoghue, B., NicAogáin, K., Bennett, C., Conneely, A., Tiensuu, T., Johansson, J., & O'Byrne, C. (2016). Blue-light inhibition of *Listeria monocytogenes* growth is mediated by reactive oxygen species and is influenced by  $\sigma$ B and the blue-light sensor Lmo0799. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 4017–4027. <https://doi.org/10.1128/AEM.00685-16>
- Oliver D, J. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. In *Journal of Microbiology* (Vol. 43, pp. 93–100).
- 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>
- Scortichini, S., Boarelli, M. C., Silvi, S., & Fiorini, D. (2020). Development and validation of a GC-FID method for the analysis of short chain fatty acids in rat and human faeces and in fermentation fluids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1143 (January), 121972. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.121972>
- Taoka, Y., Nagano, N., Okita, Y., Izumida, H., Sugimoto, S., & Hayashi, M. (2011). Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(4), 420–424. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.12.010>
- Tirloni, E., Bernardi, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., & Stella, S. (2021). Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *Lwt*, 151(July), 112170. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112170>
- Tokarsky, O., & Marshall, D. L. (2008). Mechanism of synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by lactic acid, monolaurin, and nisin. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7126–7129. <https://doi.org/10.1128/AEM.01292-08>
- Van Tassell, M. L., Ibarra-Sánchez, L. A., Takhar, S. R., Amaya-Llano, S. L., & Miller, M. J. (2015). Use of a miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial

- activities. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8515–8524. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9967>
- Watanabe, M., Igarashi, K., Kato, S., Kamagata, Y., & Kitagawa, W. (2022). Critical Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Agar Plate on the Growth of Laboratory and Environmental Strains. *Microbiology Spectrum*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03336-22>
- Weiss, J., Loeffler, M., & Terjung, N. (2015). The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. *Current Opinion in Food Science*, 4(May), 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.05.008>
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Kim, M. C., & Cho, N. J. (2015). Spectrum of Membrane Morphological Responses to Antibacterial Fatty Acids and Related Surfactants. *Langmuir*, 31(37), 10223–10232. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b02088>
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>



---

# **Valorisations**

---

## 1. Publications

**Dutoit A.**, Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L., 2024. Relationships between the inhibitory efficacy and physicochemical properties of six organic acids and monolaurin against *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth in liquid medium. *Food Microbiology*, 121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104498>

**Dutoit A.**, Trunet C., Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Oil-in-water emulsion and acid concentrations impact *B. weihenstephanensis* KBAB4 inhibition and culturability. Soumis dans *Applied and Environmental Microbiology*.

## 2. Communications orales et affichées

**Dutoit A.**, Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 growth inhibition in aqueous medium and oil-in-water emulsion. *Journées Scientifiques de l'École doctorale EGAAL, 31 juin 2022, Rennes, France*. [poster]

**Dutoit A.**, Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* germination and outgrowth inhibition in oil-in-water emulsion. *36th EFFoST International conference, 7-9 November 2022, Dublin, Ireland*. [poster]

**Dutoit A.**, Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Impact des propriétés physico-chimiques des acides organiques sur leur activité inhibitrice de croissance en milieu aqueux et en émulsion modèle. *Conseil scientifique UMT ALTER'ix, 24 novembre 2022, Quimper, France*. [communication orale]

**Dutoit A.**, Trunet C., Cossec N., Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Evaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau. *Bactéries sporulées Pathogènes et d'Intérêt Technologique BSPIT (SFM), 14 novembre 2023, Paris, France*. [communication orale]

**Dutoit A.**, Trunet C., Cossec N., Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L. Evaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau. *26ème congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie en flux (AFC), 15-17 novembre 2023, Toulouse, France*. [communication orale et poster]

### 3. Activités d'enseignement et d'encadrement

- **Encadrement de stagiaires**

Marie Le Calvé, Janvier - Juin 2022. Master 2 Biotechnologies spécialité Biomolécules, Microorganismes et Bioprocédés (Université Bretagne Sud, Lorient). Etude de la relation entre structure des acides et leur activité inhibitrice de croissance bactérienne en milieux aqueux et en émulsion.

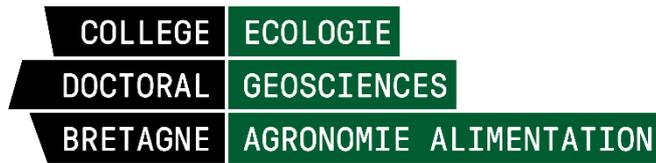
Léni Bertin, Avril – Juin 2022. DUT 2<sup>ème</sup> année Génie Biologique, option Industries Alimentaires et Biologiques (Université de Bretagne Occidentale, Quimper). Formulation d'émulsions modèles et étude de leur stabilité.

Maxence Bourguignon, Avril – Juin 2023. BUT 2<sup>ème</sup> année Génie Biologique, option Sciences de l'Aliment et Biotechnologie (Université de Bretagne Occidentale, Quimper). Etude de l'activité d'acides inhibiteurs sur la croissance et la germination de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans le fromage fondu.

- **Enseignement**

Travaux pratiques en Génie des Procédés Alimentaires (30h), 1<sup>ère</sup> année DUT Génie Biologique option Industries Alimentaires et Biologiques, IUT Quimper, Année 2021-2022.

## Journées Scientifiques de l'ED EGAAL 2022



### Résumé:

#### **Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* growth inhibition in aqueous medium and oil-in-water emulsion**

Agathe Dutoit<sup>a\*</sup>, Nicolas Decourcelle<sup>a</sup>, Anne-Gabrielle Mathot<sup>a</sup>, Louis Coroller<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA Alter'iX 19.03, F-29000 Quimper, France

**Keywords:** Alimentation, acids, bacterial inhibition, emulsion

Many organic acids including fatty acids are known to inhibit bacterial growth and can be used as antimicrobial in food products. In a context of clean label, there is a large demand for knowledge about how to use them wisely in food. Bacterial inhibition by organic acids in aqueous medium are well defined in literature, but, authors showed that the food structure and presence of others food components may influence their inhibitory effectiveness. The objective of this work is to investigate the effect of the physicochemical properties of organic acids on the germination, outgrowth and growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in aqueous medium and in oil-in-water emulsions. It will allow to study the interactions between bacteria and conservatives in biphasic systems.

In this work, lactic, propionic, caprylic and lauric acids were studied according to their carbon chain length and their physicochemical properties (number of carbons, pKa, partition coefficient). The minimal inhibitory concentration (MIC) of each compound for *B. weihenstephanensis* KBAB4 vegetative cells were estimated in nutrient broth using a Bioscreen C reader, at pH 6.0 and 5.5. The inhibitory activity of some of these acids were also assessed by plate counts in emulsions at two pHs and 30°C. Model emulsions were prepared by sonication with hexadecane as oil phase, nutrient broth as aqueous phase (ratio 50/50) and stabilized by Tween80 and Span80.

The influence of acid concentration on the growth of *B. weihenstephanensis* was modeled and results showed that the antimicrobial effect of short carbon chain acids (lactic and propionic acid) in aqueous medium was due to their undissociated form. However, the inhibitory property of lauric acid was related to the total concentration of the acid in nutrient broth. The proportion of undissociated form of the acid depends on its pKa and the pH. In model emulsion, the lag period and the growth rate increase compared to nutrient broth and acid antimicrobial activity was impacted. This phenomenon is due to the presence of oil droplets interacting with the acids. The complex structure of an emulsion and the coefficient partition of acids are the main factors explaining inhibitor availability in biphasic systems.

Understanding the interactions between bacteria, inhibitors and emulsion structure according to the chemical properties of the inhibitors allows to optimize their availability in food matrix and to ensure their bacterial inhibitory efficiency.

Poster présenté :




UMT  
ACTIA ALTER'IX  
LABORATOIRES SPÉCIALISÉS  
À DES MOISISSURES

### Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* growth inhibition in aqueous medium and oil-in-water emulsion

Dutoit A., Le Calvé M., Decourcelle N., Mathot A-G., Coroller L.  
Univ Brest, INRAE, LUBEM, UMT ACTIA ALTER'IX 19.03, F-29000 Quimper, France



Université de Bretagne Occidentale



#### Introduction

Organics acids and fatty acids are naturally present in food products and are used as antimicrobials. In complex systems such as emulsions, acids interact with the oil phase modifying their distribution and localisation and impacting their inhibitory activity<sup>(1)</sup>. The objective of this study is to investigate the effect of the physicochemical properties of organics acids on *B. weihenstephanensis* growth in aqueous medium and oil-in-water emulsion.

#### Materials & Methods

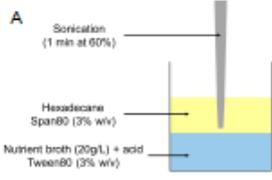
1) Growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4, in presence of several concentrations of acids, was followed by measuring the optical density at 600nm using @Bioscreen C reader in nutrient broth at 30°C. The minimal inhibitory concentration (MIC) was estimated for each studied acid, thanks to the model suggested by Coroller *et al.* (2005)<sup>(2)</sup>.

2) To compared the growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in aqueous medium and in O/W emulsion 50/50, growth kinetics were monitored by plating on nutrient agar for media without inhibitor and with lactic acid ([AL]= 140mM) or caprylic acid ([AC] = 0,1 mM). Growth rate and lag phase were estimated thanks to Rosso's model<sup>(3)</sup>.

**Table 1: Studied acids and their physicochemical properties**

Name, CAS number	Structural formula	Physico-chemical properties			Estimated MIC (mM)	Inhibitory form of the acid
		logP	pKa	Molar mass (g/mol)		
Lactic acid C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> CAS 79-25-4	<chem>CC(O)C(=O)O</chem>	-0,72	3,86	90,08	2,92 ± 0,59	undissociated
Propionic acid C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> CAS 79-09-4	<chem>CCC(=O)O</chem>	0,33	4,87	74,08	9,48 ± 7,27	undissociated
Caprylic acid C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> CAS 124-07-2	<chem>CCCCCCCC(=O)O</chem>	3,03	4,89	144,21	0,25 ± 0,14	undissociated
Lauric acid C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>2</sub> CAS 143-07-7	<chem>CCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>	4,06	5,3	200,32	1,19 ± 0,04	total

**A**



**B**

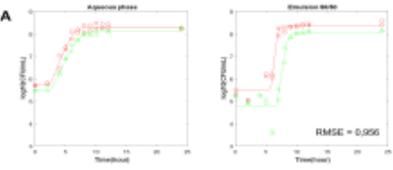


Stable during 10 days at 30°C (droplet diameter = 300 ± 4 nm)

**Figure 1:** (A) Composition and fabrication of model oil-in-water emulsion (ratio 50/50)<sup>(1)</sup>. (B) Picture of a model O/W emulsion after sonication

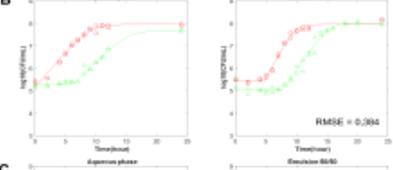
#### Results

**A**



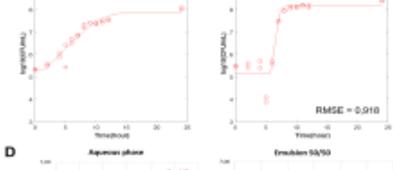
RMSE = 0,056

**B**



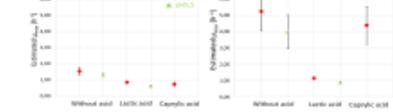
RMSE = 0,264

**C**



RMSE = 0,010

**D**



**Figure 2:** Growth kinetics of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in aqueous phase (left column) and in emulsion 50/50 (right column) at pH6 (red) and pH5,5 (green) without acid (A), with 140 mM of lactic acid (B) and 0,1 mM of caprylic acid (C) and estimated growth rate per condition (D)

1) Inhibitory effect of organics acids (lactic and propionic acid) in nutrient broth is due to their undissociated form (Table1). For fatty acids, the active form seems to change in function of the dispersant used. Inhibitory property of lauric acid is related to its total concentration while antibacterial activity of caprylic acid seems to be due to the undissociated form.

Acids with a longer carbon chain seems to be more inhibitor than short carbon chain acids (Table 1). We hypothesise that caprylic and lauric acids would have more affinity for the bacterial membrane due to their lipophilic nature (log P = 3,05 and 4,06).

2) In Figure 2 :

- $\mu_{max}$  is higher in O/W emulsion than in aqueous medium, without acid
- $\mu_{max}$  decrease by 50% in aqueous phase when acids are used
- $\mu_{max}$  decrease by 78% in O/W emulsion, with lactic acid
- $\mu_{max}$  only decreases by 18% in O/W emulsion, with caprylic acid

#### Conclusion and perspectives

Physicochemical properties of acids influence their dissociation in an aqueous medium impacting their inhibitory activity.

Moreover, the complex structure of a O/W emulsion influences the bacterial development and antibacterial efficiency. Lactic acid seems to keep its inhibitory activity in a complex system whereas caprylic acid is less inhibiting in O/W emulsion than in aqueous phase. Diffusion between fatty acids and oil droplets should occurs in emulsion due to their lipophilic nature which reduces their inhibitory efficiency. The interface phenomena seemed to have a major influence, that's why future work will focus on the exploration of these phenomena.

**References**

(1) Lacroix-Rizk, L., et al. (2019). Dispersed phase volume fraction, water acids and Tween 80 in a model emulsion: Effect on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Research International*, 126(April), 288-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.016>

(2) Coroller, L., Guerin, V., Huchet, V., Le Bihan, Y., Hebert, P., Keller, D., & Trouail, D. (2005). Modeling the influence of organic acid and moisture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1-2), 143-158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.014>

(3) Rosso, L., Labeyrie, J. R., Rajad, S., & Pandozza, J. P. (1985). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 610-615. <https://doi.org/10.1128/aem.51.2.610-615.1985>

Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale EGAAL 2022



Université de Bretagne Occidentale

Résumé:**Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* germination and outgrowth inhibition in oil-in-water emulsion**

**Authors and affiliations:** Dutoit A., Decourcelle N., Mathot AG., Coroller L.

Université de Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA Alter'iX 19.03, F-29000 Quimper, France

**Aim:** Many organic acids including fatty acids are known to inhibit bacterial growth and can be used as antimicrobial in food products. Bacterial inhibition by organic acids in aqueous medium are well defined in literature, but, authors showed that the food structure may influence their inhibitory effectiveness. There is a large demand for knowledge about how to use them wisely in a context of clean label. The objective of this work was to investigate the effect of the physicochemical properties of organic acids on the germination, outgrowth and growth of *B. weihenstephanensis*. The experiments were done in aqueous medium and in oil-in-water model emulsion to study the interactions between bacteria and inhibitors in biphasic systems.

**Method:** Lactic, propionic, caprylic and lauric acids were studied according to their carbon chain length and their physicochemical properties (number of carbons, pKa, partition coefficient). The minimal inhibitory concentration (MIC) of each compound for *B. weihenstephanensis* KBAB4 vegetative cells were estimated in nutrient broth using a Bioscreen C reader, at pH 6.0 and 5.5. The inhibitory activities of those acids were also assessed in emulsions by plate enumeration, at two pHs and 30°C. Model emulsions were prepared by sonication with hexadecane as oil phase, nutrient broth as aqueous phase (ratio 50/50) and stabilized by Tween80 and Span80.

**Results:** The antimicrobial effect of short carbon chain acids (lactic and propionic acid) in aqueous medium was due to their undissociated form. However, the inhibitory property of lauric acid was related to the total concentration of the acid in nutrient broth. In model emulsion, the lag period and the growth rate increase compared to nutrient broth and acid antimicrobial activity was impacted. This phenomenon is due to the presence of oil droplets interacting with the acids. The complex structure of an emulsion and the coefficient partition of components are the main factors explaining inhibitor availability in biphasic systems.

**Conclusion:** Understanding the interactions between bacteria, inhibitors and emulsion structure according to the chemical structure of the inhibitors allows to optimize their availability in food matrix and to ensure their bacterial inhibitory efficiency.

Poster présenté :

ADRIA  
UNIVERSITY OF BRETAGNE OCCIDENTALE (LUBEM) IN QUIMPER  
ACTIA

UMT  
ALTER'IX  
UNIVERSITY OF BRETAGNE OCCIDENTALE  
ACTIA

LUBEM  
UNIVERSITY OF BRETAGNE OCCIDENTALE

Cniel  
CENTRE NATIONAL D'INFORMATION  
SCIENTIFIQUE

UBO  
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

QUIMPER BRETAGNE  
OCCIDENTALE  
REMIER BREIZHIZEL

INRAE

## Impact of acid chemical properties on *Bacillus weihenstephanensis* germination and outgrowth inhibition in oil-and-water emulsion

Dutoit Agathe, Decourcelle Nicolas, Mathot Anne-Gabrielle, Coroller Louis  
Univ Brest, INRAE, LUBEM, UMT ACTIA Alter'IX 19.03, F-29000 Quimper, France

### Introduction

Organic acids and fatty acids are naturally present in food products and can be used as antimicrobials. In the context of clean label, there is a large demand for knowledge about how to use them wisely. Growth inhibition by acids is well defined in aqueous media, but in emulsions, acids interact with the oil phase modifying their distribution and localization and impacting their inhibitory activity<sup>[1]</sup>. The objective of this work is to investigate the effect of the physicochemical properties of acids on germination, outgrowth and growth of *B. weihenstephanensis*, in an aqueous medium and in a model oil-and-water emulsion.

### Impact in aqueous medium

#### Materials and Methods

Growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4, in presence of several concentrations of acids, was followed by measuring the optical density at 600nm using Bioscreen C reader in nutrient broth at 30°C. The minimal inhibitory concentration (MIC) was estimated for each studied acid by fitting the evolution of the growth rate to the acid concentration<sup>[2]</sup>.

#### Results

Figure 1: Impact of undissociated acetic acid (A), lactic acid (B), propionic acid (C), caprylic acid (D) and total lauric acid (E) concentrations on the growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 at pH 6 (blue) and pH 5.5 (green).

- ➔ The antibacterial activity of short-chain acids (acetic, lactic, propionic acid) and caprylic acid is due to their undissociated form. Inhibitory activity of lauric acid (long-chain acid, higher pKa) is related to its total form.
- ➔ Acids with a high logP have a lower MIC (Table 1).

Name (CAS)	Chemical formula	Structural formula	logP	pKa	Molar mass (g/mol)	Estimated MIC (mM)	Inhibitory form of the acid
Acetic acid (64-19-7)	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		-0.17	4.76	60.05	5.74 ± 0.42	undissociated
Lactic acid (79-03-4)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		-0.72	3.86	90.08	2.92 ± 0.59	undissociated
Propionic acid (79-09-4)	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>		0.33	4.87	74.08	9.48 ± 7.17	undissociated
Caprylic acid (124-07-2)	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>		3.05	4.89	144.23	0.25 ± 0.14	undissociated
Lauric acid (143-07-7)	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>		4.06	5.3	200.32	0.11 ± 0.005	total

### Impact in oil-and-water emulsion

#### Materials and Methods

To compare the growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in aqueous medium and in O/W emulsion 50/50, growth kinetics were monitored by plating cells on nutrient agar. Experiments were performed in media without inhibitor and with 250 mM lactic acid or 0.25 mM caprylic acid at pH 6. Growth rate were estimated thanks to Rosso's model<sup>[3]</sup>.

#### Results

Figure 2: (A) Growth kinetics of *B. weihenstephanensis* KBAB4 in aqueous medium (left) and in O/W emulsion (right) at pH 6 without acid (O), with 250 mM lactic acid (L) or with 0.25 mM caprylic acid (C). (B) Estimated growth rate per condition in aqueous medium (left) and in O/W emulsion (right). Values represent the average (± standard deviation) of two independent experiments and letters indicate significant differences in one-way ANOVA (p-value lower than 0.05).

- ➔ Adding lactic or caprylic acid to the aqueous phase significantly reduced the growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4.
- ➔ In oil-and-water emulsion, an amount of 250 mM of lactic acid reduced significantly the growth rate of *B. weihenstephanensis* KBAB4 but 0.25 mM of caprylic acid had no effect compared to the growth rate in emulsion without acid.

Figure 2: (A) Fabrication of a model oil-in-water emulsion (ratio 50/50)<sup>[4]</sup>. (B) Picture of a model O/W emulsion after sonication and its composition.

### Conclusions

- ➔ The physicochemical properties of acids influence their inhibitory properties:
  1. Short-chain acids are able to dissociate in an aqueous medium in function of the pH and their pKa, impacting their inhibitory activity.
  2. Long-chain acids (with high logP) are more inhibitory. They could have a higher affinity for the bacterial membrane due to their lipophilic nature.
- ➔ In an emulsion, fatty acids could diffuse between the aqueous phase and oil droplets due to their lipophilic nature, thus reducing their inhibitory efficiency: i.e. caprylic acid (with high logP) could be absorbed in the oil phase and therefore not be available in the aqueous phase to interact with bacteria.

References: [1] Howard-Robson, L., et al. (2019). Dependent phase volume fraction, small acids and Tween 80 in a model emulsion (50%) on the germination and growth of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores. *Food Research International*, 119(April), 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.016>  
 [2] Coroller, L., Guennou, S., Huetten, V., de Maiz, C., Mathot, A., Simeon, S., & Theureau, G. (2016). Modeling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 195(1–6), 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.014>  
 [3] Rosso, L., Labry, J. R., Bajard, S., & Haldenbr, J. R. (1999). Consistent model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 653–658. <https://doi.org/10.1128/aem.65.2.653-658.1999>

## Bactéries Sporulantes Pathogènes ou d'Intérêt Technologique



### Résumé :

#### **Evaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau**

Agathe Dutoit<sup>a</sup>, Clément Trunet<sup>a</sup>, Noémie Cossec<sup>a</sup>, Nicolas Decourcelle<sup>a</sup>, Anne-Gabrielle Mathot<sup>a</sup>, Louis Coroller<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA Alter'ix 19.03, F-29000 Quimper, France

La présence de bactéries sporulées dans les aliments transformés représente un danger pour les consommateurs car elles peuvent être à l'origine d'intoxications et d'altérations. La structure et les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques d'un aliment peuvent influencer l'état physiologique des bactéries sporulées. Afin d'étudier et quantifier l'émergence des cellules végétatives, leur croissance ou leur inactivation dans un environnement complexe, ici une émulsion modèle huile-eau (H/E), une méthode de suivi de viabilité cellulaire a été mise en place par cytométrie en flux.

Des spores de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ont été inoculées à  $10^5$  UFC/ml en émulsion modèle H/E, ajustée à pH 6,0 et incubées à 30°C. L'émulsion modèle consiste au mélange par sonication de bouillon nutritif et de Tween 80 (phase aqueuse) avec de l'hexadécane et du Span 80 (phase grasse) à un ratio H/E de 50/50. La viabilité des cellules au sein de l'émulsion a été étudiée et quantifiée par cytométrie en flux au cours du temps grâce à un marquage au Syto 9/IP. Trois milieux gélosés ont été utilisés pour étudier la capacité des cellules à se revivifier : BHI agar (BHA), BHA supplémenté par de la catalase ou un antioxydant, la thiourée.

Les analyses cytométriques ont montré une distinction claire entre les différentes populations de cellules : viables, endommagées et mortes directement au sein de l'émulsion. Une population de cellules végétatives apparaît à partir de 5h d'incubation et augmente à vitesse constante pour atteindre une concentration maximale de 7,5 log entre 10h et 24h. Les résultats montrent une majorité de cellules viables entre 6h et 8h d'incubation. Au-delà de 9h, la proportion de cellules endommagées augmente et atteint entre 30 et 70% des cellules totales à 24h. Le recouvrement des cellules sur milieu BHA a montré une perte de cultivabilité entre 7h et 9h d'incubation. Ces observations mettent en évidence l'apparition d'un état viable mais non cultivable de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans l'émulsion H/E, par méthode culturale. La supplémentation en catalase ou en thiourée du milieu BHA restaure totalement la capacité de revivification perdue par *B. weihenstephanensis* KBAB4 suite à son exposition et sa croissance au sein de l'émulsion H/E. Ces additifs permettent de réduire l'effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans le milieu gélosé qui entraînent l'inhibition de la multiplication bactérienne (Kong et al., 2004; O'Donoghue et al., 2016). La détection de bactéries pathogènes au sein de matrices complexes est grandement influencée par la formulation de l'aliment ainsi que le choix des méthodes de dénombrement.

## 26<sup>ème</sup> congrès annuel de l'Association Française de Cytométrie en flux

26<sup>e</sup> CONGRÈS ANNUEL DE L'ASSOCIATION FRANÇAISE DE CYTOMÉTRIE 15-17 novembre



### Résumé :

#### **Evaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau**

Agathe Dutoit<sup>a</sup> (agathe.dutoit@univ-brest.fr), Clément Trunet<sup>a</sup>, Noémie Cossec<sup>a</sup>, Nicolas Decourcelle<sup>a</sup>, Anne-Gabrielle Mathot<sup>a</sup>, Louis Coroller<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Univ Brest, INRAE, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA Alter'ix 19.03, F-29000 Quimper, France

### Introduction et objectif

La présence de bactéries sporulées dans les aliments transformés représente un danger pour les consommateurs car elles peuvent être à l'origine d'intoxications et d'altérations. La structure et les caractéristiques physico-chimiques d'un aliment peuvent influencer la physiologie des bactéries sporulées. Afin d'étudier et quantifier l'émergence des cellules végétatives, leur croissance ou leur inactivation dans un environnement complexe, ici une émulsion modèle huile-eau (H/E), une méthode de suivi de viabilité cellulaire a été mise en place par cytométrie en flux.

### Matériels et méthodes

Des spores de *B. weihenstephanensis* KBAB4 ont été inoculées à  $10^5$  UFC/ml en émulsion modèle H/E, ajustées à pH 6,0 et incubées à 30°C. L'émulsion modèle consiste au mélange par sonication de bouillon nutritif et de Tween 80 (phase aqueuse) avec de l'hexadécane et du Span 80 (phase grasse) à un ratio H/E de 50/50. La viabilité des cellules au sein de l'émulsion a été étudiée et quantifiée par cytométrie en flux au cours du temps grâce à un marquage au Syto 9/IP. Trois milieux gélosés ont été utilisés pour étudier la capacité des cellules à se revivifier : BHI agar (BHA), BHI agar supplémenté par de la catalase ou par un antioxydant, le thiourea.

### Résultats, discussion et conclusion

Les analyses cytométriques ont montré une distinction claire entre les différentes populations de cellules : viables, endommagées et mortes directement au sein de l'émulsion. L'émergence d'une population de cellules végétatives apparaît à partir de 5h d'incubation et augmente à vitesse constante pour atteindre une concentration maximale de 7,5 log entre 10h et 24h. Les résultats montrent un taux constant de cellules viables (90% des cellules totales) entre 6h et 8h d'incubation. Au-delà de 9h, la proportion de cellules endommagées augmente et atteint 56%

des cellules totales à 24h. Le recouvrement des cellules sur milieu BHA montre une chute de viabilité entre 7h et 9h d'incubation. Ces observations mettent en évidence l'apparition d'un état viable mais non cultivable de *B. weihenstephanensis* KBAB4 dans l'émulsion H/E, par méthode culturale. La supplémentation en catalase ou en thiourea du milieu BHA restaure totalement la capacité de revivification perdue par *B. weihenstephanensis* KBAB4 suite à son exposition et sa croissance au sein de l'émulsion H/E. Ces additifs permettent de réduire l'effet des espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans le milieu gélosé qui entraînent l'inhibition de la multiplication bactérienne (Kong et al., 2004; O'Donoghue et al., 2016). La détection de bactéries pathogènes au sein de matrices complexes est grandement influencée par la formulation de l'aliment ainsi que le choix des méthodes de dénombrement.

**Mots-clés :** Bactéries sporulées, Viables non cultivables, émulsion

**Références :**

- Kong, I. S., Bates, T. C., Hülsmann, A., Hassan, H., Smith, B. E., & Oliver, J. D. (2004). Role of catalase and oxyR in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiology Ecology*, 50(3), 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.06.004>
- O'Donoghue, B., NicAogáin, K., Bennett, C., Conneely, A., Tiensuu, T., Johansson, J., & O'Byrne, C. (2016). Blue-light inhibition of *Listeria monocytogenes* growth is mediated by reactive oxygen species and is influenced by  $\sigma$ B and the blue-light sensor Lmo0799. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 4017–4027. <https://doi.org/10.1128/AEM.00685-16>

Poster présenté :

ADRIA  
UNIVERSITY OF BRETAGNE OCCIDENTALE (LUBEM) IN QUIMPER  
ACTIA

ALTER'IX  
UMT ACTIA  
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
RECHERCHE & INNOVATION

LUBEM  
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
RECHERCHE & INNOVATION

Cniel  
CENTRE NATIONAL D'INFORMATION  
SCIENTIFIQUE

UBO  
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
RECHERCHE & INNOVATION

INRAE

## Évaluation de la viabilité bactérienne par cytométrie en flux : Perte de cultivabilité de *B. weihenstephanensis* (*Bw*) KBAB4 sur milieu gélosé suite à l'exposition à une émulsion huile dans eau

Agathe Dutoit, Clément Trunet, Noémie Cossec, Nicolas Decourcelle, Anne-Gabrielle Mathot, Louis Coroller  
Univ Brest. INRAE. Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Écologie Microbienne, UMT ACTIA Alter'IX 19.03, F-29000 Quimper, France

### Introduction

Les bactéries sporulées représentent un danger dans les aliments car elles sont à l'origine d'intoxications et d'altérations. La structure et les caractéristiques physicochimiques d'un aliment peuvent influencer la physiologie des bactéries sporulées<sup>[1]</sup>.

L'objectif de l'étude est de quantifier l'émergence des cellules végétatives de *Bw* KBAB4, leur croissance ou leur inactivation dans une émulsion modèle huile dans eau, grâce à une méthode de suivi de viabilité cellulaire par cytométrie en flux.

### Matériels et méthodes

- ➊ Réalisation de l'émulsion modèle huile dans eau
  - 10<sup>7</sup> UFC/ml de spores de *Bw* KBAB4
  - Incubation 30°C / 24h
- ➋ Dénombrements au cours du temps sur plusieurs milieux de recouvrement incubés à 30°C:
  - Gélase cœur-cerveille (Brain Heart infusion, BHA)
  - BHA + catalase (2000 unités/ml)
  - BHA + thiourée (25 mM)
- ➌ Etude de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux (Cyflow Space, Sysmex, Europe)
  - Ajout de marqueurs fluorescents à l'échantillon: Syto9 (1,5 µM) & Iodure de Propidium (20 µM)

### Suivi de la viabilité cellulaire

**Figure 1 :** Evolution de la population de cellules végétatives de *Bw* KBAB4 dans l'émulsion modèle au cours du temps, quantifiée par cytométrie en flux (vert) et dénombrée sur milieu BHA (gris).

- Émergence d'une population de cellules végétatives à partir de 5h à 30°C dans l'émulsion, par méthodes culturales et cytométrie (Fig.1).
- Perte de cultivabilité de *Bw* KBAB4 sur milieu BHA entre 7h et 9h.
- Augmentation constante de la concentration en cellules de 5h à 10h par cytométrie.

➔ L'exposition à une émulsion modèle conduit à un état viable mais non cultivable sur BHA de *Bw* KBAB4.

- La présence de catalase et de thiourée sur le milieu BHA permet aux cellules de *Bw* KBAB4 de retrouver leur capacité de revivification lors de leur croissance (Fig.2).

La concentration en composés oxydants (ROS) est plus élevée dans le milieu BHA et induit l'inhibition des cellules stressées, dont la catalase est inactivée<sup>[2,3]</sup>.

### Etude du milieu de recouvrement

**Figure 2 :** log<sub>10</sub>(UFC/ml) de *Bw* KBAB4 en fonction du temps dans l'émulsion modèle 50/50 dénombrée sur milieu BHI agar (gris), BHI agar supplémenté par de la catalase (rouge) et de la thiourée (orange). Les astérisques représentent les concentrations significativement différentes.

### Répartition des cellules viables, endommagées et mortes

**Figure 3 :** Répartition des cellules végétatives de *Bw* KBAB4 vivantes (vertes), endommagées (jaunes) et mortes (rouge) dans l'émulsion, quantifiées par cytométrie en flux

Plus de 70% des cellules sont viables (marquage Syto9/P) lors de la perte de cultivabilité sur milieu BHA (entre 7h et 9h). Après 24h d'incubation, la majorité des cellules sont endommagées (Fig.3).

### Conclusion

Les cellules végétatives de *Bw* KBAB4 sont viables dans l'émulsion modèle mais perdent la capacité de croître dans un milieu comportant des composés oxydants (ROS), devenant des Cellules Viables mais non Cultivables en BHA.

Cette perte de cultivabilité est certainement due à une inhibition de leur activité catalase qui est restaurée en phase stationnaire après 10h d'incubation.

➔ La détection de bactéries pathogènes et l'étude de leur physiologie au sein d'émulsions huile dans eau est grandement influencée par la formulation ainsi que le choix de la méthode de dénombrement.

**légende** (échelle non respectée) :

- Phase continue (phase aqueuse)
- Phase dispersée (phase grasse)
- Spoire bactérienne
- Cellule végétative

**références**

[1] Ault, J., and Foster M., 2020. « Interactions of Foodborne Pathogens with the Food Matrix » (Edgell, R., et David, A., Neg, N., & Kishore, S., 2020). Food Safety Engineering. Washington - Springer (Chap. p. 129-156).

[2] Applegate, M., Williams, T.C., & Olson, L. S. (2016). Interplay of quorum sensing molecules in the regulation of viable but nonculturable status. Applied and Functional Microbiology, 8(2), 1479-1485. <https://doi.org/10.1093/afm/afw008>

[3] Olson, L. S. (2012). Recent findings on the viable but nonculturable state of pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 86(5), 639-658. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02628.x>





**Titre :** Approche Multi-échelle des Interactions entre Inhibiteurs Bactériens et Milieux Biphases

**Mots clés :** Bactéries sporulées, Inhibition, Acides, Emulsions huile dans eau, Microbiologie prévisionnelle

**Résumé :** L'utilisation de composés inhibiteurs naturels est répandue pour contrôler la multiplication des bactéries sporulées pathogènes ou d'altérations, dans les aliments. En raison de la complexité structurelle et physico-chimique des matrices alimentaires, certains de ces composés présentent une baisse d'efficacité inhibitrice.

Les propriétés inhibitrices de sept composés ont été évaluées sur la croissance de *B. weihenstephanensis* KBAB4 par modélisation et mises en relation avec leurs caractéristiques physico-chimiques. Il apparaît qu'en milieu aqueux nutritif, l'efficacité inhibitrice d'un composé est le résultat de sa lipophilicité, caractérisée par une plus forte dissociation à pH acide ou par un coefficient de partage (log P) plus élevé. La présence d'une phase grasse dispersée dans un milieu biphase, une émulsion H/E, a modulé l'activité inhibitrice des acides gras lipophiles,

soulignant la diffusivité de ces acides à travers les phases.

De plus, en raison de son caractère lipophile, l'acide caprylique a interagi avec les émulsifiants utilisés pour stabiliser le système, réduisant ainsi son activité inhibitrice. L'efficacité inhibitrice d'un acide hydrophile, comme l'acide lactique, dans ces systèmes biphases dépend principalement du pH du milieu mais sa présence peut également impacter la structure de l'émulsion. Par ailleurs, il a également été mis en évidence que l'exposition à une émulsion modèle engendre une perte de culturabilité de la souche KBAB4 sur le milieu BHA.

Ces travaux ont permis d'appréhender les interactions entre bactéries sporulées, composés inhibiteurs et composants d'une émulsion H/E afin d'optimiser la formulation d'aliments sains et sûrs.

**Title:** Multi-scale Approach to Interactions between Bacterial Inhibitors and Biphase Environments

**Keywords:** Spore-forming bacteria, Inhibition, Acids, Oil-in-Water Emulsions, Predictive microbiology

**Abstract:** The use of natural antimicrobial compounds is common for controlling the growth of pathogenic or spoilage spore-forming bacteria in foods. Some of these compounds exhibit reduced inhibitory efficacy due to food matrices structural and physico-chemical complexity.

The inhibitory properties of seven compounds were assessed on the growth of *B. weihenstephanensis* KBAB4 by modelling, and related to their physico-chemical characteristics. It appears that in an aqueous nutrient media, the inhibitory effectiveness of a compound is due to its lipophilicity, characterized by a higher dissociation at acidic pH or a higher partition coefficient (log P).

The presence of a dispersed oil phase in a biphase medium, an O/W emulsion, modulated the inhibitory activity of lipophilic fatty acids,

highlighting the diffusivity of these acids between phases.

Moreover, the lipophilic nature of caprylic acid allowed interactions with the emulsifiers used for system stabilization, thereby reducing its inhibitory activity. The inhibitory effectiveness of a hydrophilic acid (such as lactic acid) in these biphase systems primarily depends on the pH of the medium but can also impact their structure. It was also shown that exposure to a model emulsion resulted in a loss of culturability of KBAB4 strain on BHA medium.

This work has allowed to understand the interactions between spore-forming bacteria, inhibitory compounds and the components of an O/W emulsion, to optimize the formulation of healthy and safe food products.