

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

--جامعة محمد الصديق بن يحي جيجل

Université Mohammed Seddik Ben yahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée et
Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Production des substances antifongiques par les
bactéries lactiques**

Membres du Jury

Président : Dr. S. Alioua

Examinatrice : Dr. A. Ait meddour

Encadreur : M^{me}. N. Benhamada

Présenté par

M^{lle} Latifa Bouzaout

M^{me} Soumia Adouani

Année Universitaire : 2019 - 2020

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction01

Chapitre I : Bactéries lactiques

I.1. Généralités 03

I.1.1. Définition 03

I.1.2. Caractéristiques principales des bactéries lactiques 03

I.1.3. Habitat 04

I.1.4. Métabolisme des bactéries lactiques 04

I.1.5. Classification des bactéries lactiques 05

I.2. Intérêt et innocuité des bactéries lactiques 11

I.2.1. Dans le domaine alimentaire..... 11

I.2.1.1. Rôle dans la conservation 11

I.2.1.2. Rôle dans la fermentation alimentaire 12

I.2.2. Dans le domaine de la santé humaine 12

I.2.2.1. Traitement des désordres diarrhéiques..... 13

I.2.2.2. La réduction de la formation des tumeurs..... 13

I.2.2.3. La diminution du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires 13

Chapitre II : Moisissures

II.1. Généralités 14

II.1.1. Définition..... 14

II.1.2. Caractéristiques générales des moisissures 14

II.1.3. Ecologie des champignons filamenteux	15
II.1.4. Spores et cycle de vie des moisissures	16
II. 2. Classification des moisissures	16
II.3. Les principaux genres des moisissures d'altération	17
II.3.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	17
II.3.2. Le genre <i>Penicillium</i>	18
II.3.3. Le genre <i>Fusarium</i>	19
II.3.4. Le genre <i>Alternaria</i>	20
II.4. Les mycotoxines	21
II.4.1. Généralités	21
II.4.2. Nature et origine des mycotoxines	21
II.4.3. La mycotoxinogénèse	22
II.4.4. Les différents types des mycotoxines	22
II.4.4.1. Aflatoxines.....	22
II. 4.4.2. Ochratoxines	23
II. 4.4.3. Patuline	24
II. 4.4.4. Fumonisines.....	24
II. 4.4.5. zéaralénone	25
II. 4.4.6. Trichothécènes.....	25
Chapitre III : Activité antifongique des bactéries lactiques	
III.1. Contrôle de la croissance des moisissures par les bactéries lactiques.....	27
III.2. Activité antifongique des bactéries lactiques	28
III.3. Substances antifongiques des bactéries lactiques.....	29
III.3.1. Acides organiques	30
III.3.2. Reutéline	30

III.3.3. Dipeptides cycliques	31
III.3.4. Acides gras	31
III.3.5. Peroxyde d'hydrogène.....	32
III.3.6. Acide phényllactique.....	32
III.3.7. Dioxyde de carbone.....	32
III.3.8. Bactériocine.....	33
III.3.8.1. Bactériocines de la classe I.....	33
III.3.8.2. Bactériocines de la Classe II	33
III.3.8.3. Bactériocines de la Classe III	34
III.4. Facteurs affectant la production et l'activité des substances antifongiques.....	34
III.5. Interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines	35
III.5.1. Liaison des mycotoxines par les bactéries lactiques	35
III.5.2. Impact direct sur la croissance fongique	37
III.5.3. Rôle du stress induit par les bactéries lactiques dans la régulation de la production des mycotoxines.....	37
III.5.4. Détoxification des mycotoxines par les bactéries lactiques.....	37
 ChapitreIV. Analyse de quelques articles scientifiques	
IV.1. Antifungal activity of <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> Isolated from a sourdough bread culture.....	39
IV.1.1. Objectifs de la recherche.....	39
IV.1.2. Méthodologie	39
IV.1.3. Résultats	40
IV.1.4. Conclusion	41
IV.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe–L-Pro) and Cyclo(L-Phe– <i>trans</i> -4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid.....	41
IV.2.1. Objectifs de la recherche.....	42

IV.2.2. Méthodologie...	42
IV.2.3. Résultats...	42
IV.2.4. Conclusion	44
IV.3. Potential of <i>Pediococcus pentosaceus</i> (L006) Isolated from Maize Leaf to Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth.....	45
IV.3.1. Objectifs de la recherche.....	45
IV.3.2. Méthodologie...	45
IV.3.3. Résultats	46
IV.3.5. Conclusion	48
Conclusion.....	49
Références bibliographiques	50
Annexe	
Résumé	

As: Aspergillus

Al : Alternaria

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF : Aflatoxine

ATA : Aleucie Toxique Alimentaire

Bf. : Bifidobacterium

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

ESI-MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry

F : Fumonisine

F. : Fusarium

FAB-MS : Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy

GC : Chromatographie en phase Gazeuse

GRAS : Generally Recognized As Safe (généralement reconnu sans risques).

HPLC : Chromatographie Liquide à Hautes Performances

IRAC : Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer

L. : Lactococcus

LAB : Lactic Acid Bacteria

Lb. : Lactobacillus

LDH : Lactate Déshydrogénase

MEA : Malt Extract Agar

MRS : Man Rogosa et Sharp

MS : Spectrométrie de Masse

NaCl : Chlorure de sodium

OTA : Ochratoxine

P. : Penicillium

PAT : Patuline

PCR : Polymerase Chain Reaction

Pd. : Pediococcus

PH : Potentiel Hydrique

Pka : Constante d'acidité

PLA : Phényl Lactique Acide

RAPD : Amplification aléatoire d'ADN Polymorphe

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rRNA : Ribosomal Ribonucleic Acid

S. : *Streptococcus*

SDB : milieu Sourdough Bacteria

SPE : Extraction en Phase Solide

W. : *Weissella*

Figure 01. Aspect microscopique du genre <i>Lactobacillus</i>	06
Figure 02. <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i> au microscope électronique	07
Figure 03. <i>Leuconostoc cremoris</i> au microscope électronique	08
Figure 04. <i>Streptococcus thermophilus</i> au microscope électronique	08
Figure 05. <i>Pediococcus acidilactici</i> au microscope électronique.....	09
Figure 06. <i>Enterococcus faecium</i> au microscope électronique	09
Figure 07. <i>Bifidobacterium sp</i> au microscope électronique	10
Figure 08. Schéma de la reproduction des moisissures	16
Figure 09. Observation microscopique d'une tête Aspergillaire	18
Figure 10. Appareil reproducteur des mucorales	18
Figure 11. Schéma d'un <i>Penicillium</i>	19
Figure 12. Observation microscopique d'un <i>Penicillium</i>	19
Figure 13. Aspect microscopique des conidies de <i>Fusarium</i>	20
Figure 14. Observation microscopique du genre <i>Fusarium</i>	20
Figure 15. Observation microscopique du genre <i>Alternaria</i>	20
Figure 16. Structure chimique d'Aflatoxine B1	23
Figure 17. Structure chimique de l'ochratoxine A	24
Figure 18. Structure chimique du patuline... ..	24
Figure 19. Structure générale des fumonisines	25
Figure 20. Structure chimique de la zéaralénone... ..	25
Figure 21. Structure chimique de trichothécènes groupe B	26
Figure 22. Nature chimique des substances antifongiques produites par les bactéries Lactiques	29

La contamination fongique des denrées alimentaires par des champignons mycotoxigéniques, n'est pas seulement un problème de qualité alimentaire mondial pour les fabricants de produits alimentaires, mais elle pose également de graves problèmes de santé en raison de la production d'une variété de mycotoxines, dont certaines présentent des défis considérables en matière de sécurité alimentaire. Dans les productions alimentaires à grande échelle d'aujourd'hui, qui impliquent un certain nombre d'étapes de transformation et l'utilisation d'une variété d'ingrédients, la contamination fongique est considérée comme inévitable, même de bonnes pratiques de fabrication sont suivies (Sadiq *et al.*, 2019). Dans les sociétés modernes, les consommateurs conscients exigent des aliments sains, frais et naturels, sans conservateurs ni stabilisants chimiques ajoutés (Siedler *et al.*, 2019).

La préservation des aliments et les denrées alimentaires se base essentiellement sur la prévention ou l'inhibition de la croissance des microorganismes contaminants. Les méthodes physico-chimiques de préservation provoquent des altérations de qualité nutritionnelle, et organoleptique des aliments, et une diminution de leurs utilités suite au développement des résistances par les microorganismes contaminants pathogènes. Cette résistance est attribuée à l'utilisation abusive et souvent prolongée des produits chimiques, ce qui permet aux souches de développer des mécanismes de résistance. Face à ces problèmes, la recherche scientifique s'oriente vers une approche qui est la bio-préservation ; C'est-à-dire l'application de microorganismes et / ou leurs métabolites pour prévenir la détérioration et pour prolonger la durée de conservation des aliments (Stiles *et al.*, 1996, Gould, 2000 et Singh, 2018).

L'utilisation de bactéries lactiques (LAB) pour conserver les aliments est l'une des approches les plus anciennes et les mieux caractérisées (Siedler *et al.*, 2019). Les LAB ont été utilisés dans la production alimentaire pendant des siècles, non seulement parce qu'ils étaient savoureux, mais aussi parce qu'ils permettaient de conserver les aliments pendant une longue période. Elles ont un rôle important dans la préparation, la conservation et la transformation de nombreux aliments fermentés, ce qui leur confère le statut GRAS « Generally Recognized As Safe ». De nombreux représentants de ce groupe ont montré une activité antagoniste élevée (Matevosyan *et al.*, 2019).

L'utilisation des bactéries lactiques pour la conservation des aliments est une approche alternative intéressante aux méthodes de conservation physiques et chimiques normalement appliquées dans les aliments. Une sélection rigoureuse de souches spécifiques de LAB aux propriétés antifongiques peut permettre la réduction des moisissures et des genres de levure et peut donc améliorer la durée de conservation de nombreux produits fermentés et réduire la

présence de mycotoxines (Pawloska *et al.*, 2012). Ces dernières forment un problème majeur et incontournable pour la santé du consommateur et la recherche de méthodes de prévention et /ou d'élimination de ses substances constitue un objectif à atteindre. Les bactéries lactiques peuvent former le socle de cette recherche vu, ces capacités de résistance et d'attaque.

C'est sur cette logique que décolle le but de ce travail qui s'intéresse à l'étude de la capacité des bactéries lactiques à exercer leurs activités antifongiques, en vue d'approfondir la recherche en ce qui concerne l'utilisation de ces micro-organismes comme moyen efficace et sain pour la bio-préservation des aliments.



Bactéries lactiques

I.1. Généralités

I.1.1. Définition

Les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes depuis trois milliards d'années. Elles seraient donc apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques qui ont transformé l'atmosphère terrestre ancienne sans oxygène en atmosphère aérobie (Drider et Prevost, 2006).

Le terme bactéries lactiques (Lactic Acid Bacteria : LAB) a été progressivement accepté au début de le 20^{ième} siècle (Khalisanni et al., 2011). D'autres termes tels que « bactéries acidifiantes » et « productrices d'acide lactique » avaient précédemment été utilisés pour les mêmes bactéries provoquant une légère confusion. Le terme de bactéries lactiques est terminé par la publication d'une monographie sur les bactéries lactiques rédigée par Orla-Jensen (1919) (Valirio, 2016). Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme (Salimen et al., 2004). Elles interviennent dans l'industrie laitière et dans la fermentation de nombreux autres produits alimentaires, en contribuant à la texture, à la saveur des aliments et à la production des composés aromatiques. Elles fermentent les glucides en acide lactique d'où une diminution du pH favorable à la bio-conservation des denrées alimentaires (Tabak et Bansoltane, 2011).

I.1.2. Caractéristiques principales

Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène composé de coques et de bacilles non pathogènes, Gram positif, non-sporulantes et immobiles (Badis et al., 2005 ; Yao et al., 2009 ; Bouzaid et al., 2014 et Dhamel et al., 2015). Elles ont également un métabolisme aérobie facultatif et ne produisent pas de catalase. Les bactéries lactiques ont en commun la capacité de fermenter les sucres en acide lactique (Dronault, 2000). Elles sont des microorganismes hétérotrophes anaérobies qui tolèrent l'oxygène dans une certaine mesure. L'oxygène affecte leur métabolisme mais aussi leur croissance, leur survie et l'intégrité de leur ADN (Tailliez, 2001).

Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bifidobacterium* (Matevosyan et al., 2019).

Les bactéries lactiques sont exigeantes sur le plan nutritionnel et nécessitent des glucides, des acides aminés, des peptides, des dérivés d'acide nucléique et des vitamines. Ce sont généralement des acidophiles, différentes espèces s'étant adaptées pour croître dans des conditions environnementales très différentes. Elles sont très répandues dans la nature, leur distribution étant liée à des concentrations élevées de glucides solubles, de produits de dégradation des protéines, de vitamines et d'une faible tension en oxygène (Aguirre et al., 1993 et Alaoui et al., 2016).

I.1.3. Habitat

Les bactéries lactiques sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte (en symbiose), tel que l'homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital on peut les trouver aussi dans la cavité buccale des mammifères (Klein et al., 1998 et Hasssan et Frank, 2001).

Elles se retrouvent dans un large éventail de différentes niches écologiques en raison de leur bonne capacité d'adaptation, elles sont généralement associées à des habitats riches en nutriments, comme les produits alimentaires : les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales. Elles sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Axelson, 2004 et Dortu et al., 2008).

I.1.4. Métabolisme

Bien que les bactéries lactiques constituent un certain nombre de genres divers, elles sont regroupées en tant que homofermentaires ou hétérofermentaires en fonction du produit final de leur fermentation (Alaoui et al., 2016). Les hétérofermentaires produisent de l'acide lactique comme principal produit en plus de l'acide lactique, y compris du dioxyde de carbone, de l'acide acétique et de l'éthanol à partir de la fermentation du glucose (Mozzi et Vignolo, 2010). Les homofermentaires possèdent l'enzyme aldolase et sont capables de fermenter le glucose plus directement en acide lactique que les hétérofermentaires. Les hétérofermentaires utilisent la voie alternative du pentose monophosphate, convertissant six sucres de carbone (hexoses) en cinq sucres de carbone (pentoses) par l'enzyme phos-phokétolase (Jagadeesh, 2015).

- ✓ **Les bactéries lactiques homofermentaires** : les espèces des genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Entérocooccus*, et certaines de *Lactobacillus* dans les conditions standard de croissance, fermentent les sucres par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas en pyruvate, ce dernier est converti en acide lactique par le lactate déshydrogénase (LDH). Dans certaines conditions de croissance (limitation de

carbone, excès du carbone des sucres lentement métabolisé), le métabolisme homolactique peut se transformer en métabolisme mixte caractérisé par la production d'acétate, formate, éthanol et /ou du CO₂ en plus de l'acide lactique (Kowalczyk *et al.*, 2015).

- ✓ **Les bactéries lactiques hétérofermentaires** : les *Leuconostoc*, *Oenococcus*, et certaines espèces de *Lactobacillus* fermentent les sucres généralement par la voie de phosphocétolase. Les pentoses sont fermentés conduisant à la production de pyruvate et acétylcholine qui sont convertis ultérieurement en lactate et acétate respectivement. Les hexoses peuvent être convertis en lactate, éthanol et CO₂ (Kowalczyk *et al.*, 2015).

I.1.5. Classification

Les caractéristiques moléculaires sont devenues importants outils taxonomiques, tels que la teneur en GC de l'ADN, les propriétés électrophorétiques des produits génétiques, ADN : études d'hybridation d'ADN et structures et séquence de l'ARN ribosomal (ARNr). Cela a entraîné des changements spectaculaires dans la taxonomie des LAB (Schleifer, 1987).

La classification des LAB constitue le centre d'une étude taxonomique intense avec une urgence croissante pour une approche polyphasique, caractérisation phénotypique et phylogénétique des bactéries (Stiles et Holzapfel, 1997).

Les bactéries lactiques regroupent treize genres bactériens différents : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (Koaukou et Thonart, 2011).

Elles se trouvent dans deux phylums distincts : les Firmicutes et les Actinobacteria. Dans le phylum des Firmicutes, les genres les plus importants sont : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* et sont des organismes à faible teneur en GC (31- 49 %).

Dans le phylum Actinobacteria, les LAB appartiennent au genre *Bifidobacterium*, qui a une teneur élevée en GC (58-61 %) (Mocanu, 2012 ; et Holzapfel, 2014).

Les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.

- Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.
- Famille des *Aerococcaceae* comprenant les *Aerococcus*.
- Famille des *Leuconostocaceae* comprenant les *Leuconostoc*.
- Famille des *Carnobacteriaceae* comprenant les *canobacterium*.

Historiquement, le genre *Bifidobacterium* était aussi considéré comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques grâce à la similarité de ses propriétés physiologiques et biochimiques et à sa présence dans le même habitat écologique, tel que le tube gastro-intestinal (Klein et al., 1998).

A. Le genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles présentent le genre prédominant des LAB, occasionnellement des réducteurs de nitrate, utilisent le lactose, le glucose et d'autres sucres comme source de carbone et produisent du lactate via un métabolisme homofermentatif, produisant plus de 85 % d'acide lactique à partir du glucose, ou hétérofermentatif, produisant de l'acide lactique, du CO₂, d'éthanol et / ou d'acide acétique en quantités équimolaires.

Ces bactéries produisant des acides peuvent se développer à des environnements à faible pH et inhibent la croissance d'autres microorganismes (Al kassaa et al., 2014 ; Herbel et al., 2013; Arena et al., 2014 et Raman et al., 2016). La figure 01, illustre l'aspect microscopique des bactéries du genre *Lactobacillus*.

Les *Lactobacillus* sont très utiles en microbiologie alimentaire et notamment dans la nutrition humaine en raison de leur contribution à la production des aliments fermentés ainsi que leur utilisation comme probiotiques dans les produits pharmaceutiques (Foschi et al., 2016).

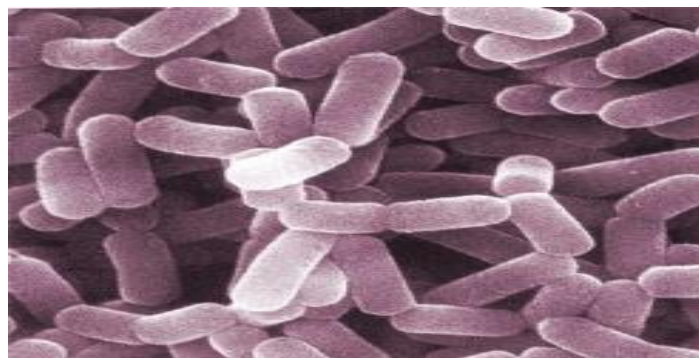


Figure 1. Aspect microscopique électronique du genre *Lactobacillus* (Kechagia et al., 2013).

Le genre *Lactobacillus* est le genre principal et de loin le plus grand et le plus diversifié de la famille de *Lactobacillaceae*, il comprend actuellement 158 espèces, sept de ces espèces sont

constituées de 18 sous-espèces. Il est également très hétérogène, englobant les espèces avec une grande variété phénotypique, biochimiques et physiologiques. L'hétérogénéité se traduit par le pourcentage GC de l'ADN des espèces incluses dans ce genre, cette gamme est de 32 à 55 %. Le pH de croissance est compris entre 3 et 8 avec un optimum habituellement allant de 5,5 à 6,2 et une température de croissance optimale entre 30 et 40 °C (Zhang et Cai, 2014).

B. Le genre *Lactococcus*

Le groupe des lactocoques correspond aux streptocoques mésophiles de la flore lactique. Elles sont généralement micro-aérophiles et se développent à 30°C. Leur fermentation des sucres est homolactique et donne de l'acide lactique comme produit final (Sun et al., 2014).

Les lactocoques peuvent se trouver dans les aliments comme les produits laitiers, elles sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire, les espèces les plus importantes sont : *Lactococcus lactis* (Figure 2) et *Lactococcus cremoris* (Stiles et Holzapfel, 1997).



Figure 2. *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* au microscope électronique (Pot, 2008).

C. Le genre *Leuconostoc*

Le terme *Leuconostoc* vient du mot « Nostoc » qui est une algue bleue mucilagineuse et «Leuco» veut dire blanc (Säde, 2011). La première description du genre *Leuconostoc* a été rapportée par Van Tieghem en 1878 (Zhang et Cai, 2014).

Les *Leuconostocs* (figure 3) sont des bactéries à Gram positif, immobiles, asporulées, anaérobies facultatifs avec une forme ovoïde, associées en paire ou en chaînes courtes, elles sont exigeantes du point de vue nutritionnel et leur croissance est toujours lente, dont leurs optimums de croissance est de 20 à 30 °C (Bjorkroth et al., 2009).

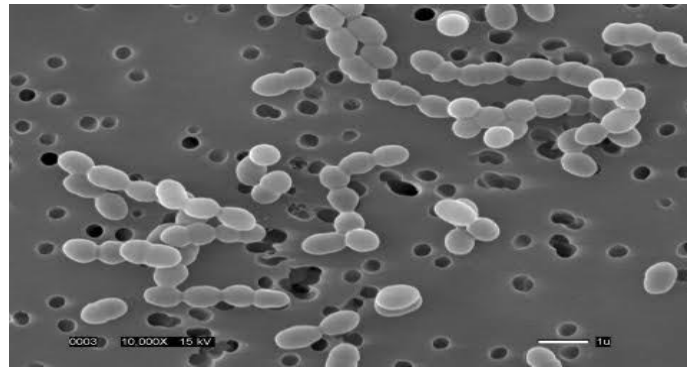


Figure 3. *Leuconostoc cremoris* au microscope électronique (Ogier et al., 2008).

D. Le genre *Streptococcus*

Les streptocoques sont parmi les premières bactéries connues par les microbiologistes, vu leur association à plusieurs maladies humaine et animale. Le genre *Streptococcus* est toujours large et la classification est très mouvementée. Il comprend les *Streptococcus sensu stricto* qui peuvent être divisées en streptocoques pyogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* et des streptocoques orale (viridans) comme *S. salivarius* (Sun et al., 2014).

Les cellules de ce genre sont immobiles, sphériques ou ovoïdes qui ont un diamètre inférieur à 2 µm avec une disposition en paires ou en chaînes longues. La fermentation des carbohydrates produit principalement de l'acide lactique mais il n'y a pas de production de gaz. Le peptidoglycane est du groupe A et leur température optimale de croissance est de 37 °C. La seule espèce de streptocoque qui soit utilisée en technologie alimentaire est *Streptococcus thermophilus* (Figure 4) (Stiles et Holzapfel, 1997 et Sun et al., 2014).

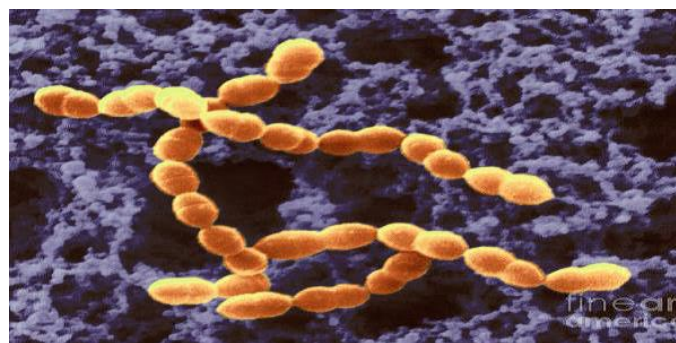


Figure 4. *Streptococcus thermophilus* au microscope électronique (Furet et al., 2004).

E. Le genre *Pediococcus*

Les espèces du genre *Pediococcus* ont été parmi les premières bactéries étudiées par Louis Pasteur en relation avec leur rôle dans la détérioration de la bière. Leur forme sphérique et la formation de tétrades a servi de caractéristiques clés lors de leur reconnaissance précoce. Au

départ, ils étaient le seul LAB divisé en deux plans pour produire des tétrades ou paires (figure 5). Cependant, des changements taxonomiques plus récents ont augmenté le nombre de tétrades formant des genres à trois. Dans le manuel de bactériologie systématique de Bergey, seules 8 espèces ont été reconnues dans ce genre mais maintenant 11 espèces peuvent être distinguées les unes des autres en fonction de leurs caractéristiques physiologiques (Zhang et Cai, 2014).



Figure 5. *Pediococcus acidilactici* au microscope électronique (Furet et al., 2004)

F. Le genre *Entérocooccus*

Le genre *Enterococcus* représente le groupe des entérocoques, ils sont composés de streptocoques fécaux (*Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* (Figure 6)), ce genre comprend des bactéries ovoïdes isolées en paires ou en courtes chaînes. Il se caractérise par sa tolérance à 6,5 % de NaCl, au pH 9,6 et par la croissance à 10 °C et à 45°C avec une température optimale de croissance de 35 à 37 °C. Certaines espèces peuvent survivre à 60 °C pendant 30 min (Thonart et al., 2012 et Zhang et Cai, 2014).

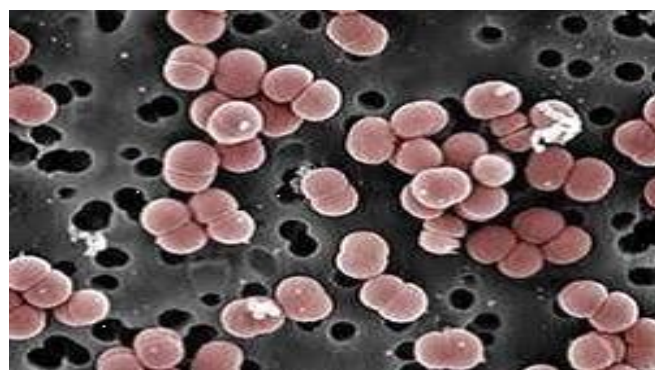


Figure 6. *Enterococcus faecium* au microscope électronique (Wallace et al., 2003).

G. Les genres *Oenococcus* et *Weissella*

Les genres *Oenococcus* et *Weissella* ressemblent le plus étroitement au genre *Lactobacillus*. Ils sont Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatifs. Le genre *Weissella* regroupe

deux types morphologiquement différents : les bacilles (anciennement les Lactobacilles hétérofermentaires "atypique") et les coques de forme ovoïde (*Leuconostocs*, *Oenococcus* et *Streptococcus* "typique") (Björkroth et Holzapfel, 2003).

Les caractéristiques physiologiques tels que l'absence de l'arginine désaminase et la production prédominante du D (-) - lactate à partir du glucose sont partagées par toutes les espèces du genre *Oenococcus*, et seulement par les espèces de *Weissella* ayant une forme ovoïde (*W. paramesenteroides*, *W. hellenica* et *W. thailandensis*) (Hammes et Vogel, 1995).

H. Le genre *Aerococcus* et *Tetragenococcus*

Ce sont des coques formées de cellules groupées en tétrades. Le genre *Aerococcus* qui contient cinq espèces est généralement moins intéressant dans l'agroalimentaire. Cependant, une étude récente a suggéré que ces bactéries pourraient être responsables du verdissement des produits carnés cuits (Peirson et al., 2003).

I. Le genre *Bifidobacterium*

Traditionnellement, le genre *Bifidobacterium* a été associé aux bactéries lactiques. Par la suite, il a été séparé en raison du contenu GC supérieur à 50 % et affecté au phylum *Actinobacteria* (Gomez et Malcata, 1999 et Leahy et al., 2005). Les bifidobactéries (Figure 7) sont également considérées comme des bactéries lactiques, en raison de leurs propriétés physiologiques et biochimiques semblables et du fait qu'elles partagent certaines niches écologiques communes aux bactéries lactiques tel que le tractus gastro-intestinal (Klein et al., 1998). En effet, elles ont généralement un pH optimal de croissance autour de 6.5 à 7 et une température de croissance comprise entre 37 et 41 °C. Elles ont la forme irrégulière d'un V ou une morphologie bifide en forme de Y. Elles sont hétérofermentaires et dégradent les hexoses en produisant de l'acide lactique et acétique (Gomez et Malcata, 1999 et Leahy et al., 2005).



Figure 7. *Bifidobacterium* sp (Wallace et al., 2003)

I.2. Intérêt et innocuité des bactéries lactiques

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire. Le principal intérêt que représentent les bactéries lactiques pour l'industrie alimentaire réside dans l'amélioration de la qualité des produits fermentés en y développant certaines caractéristiques organoleptiques et en augmentant leur durée de conservation (Stiles et Holzpafel, 1997).

I.2.1. Dans le domaine alimentaire

I.2.1.1. Rôle dans la conservation

La bio-conservation ou bio-préservation, est une méthode de conservation des aliments faisant appel à des microorganismes, appelés encore cultures protectrices, ou à leurs métabolites naturels. Ces termes sont généralement utilisés en opposition à l'ajout de conservateurs dits (chimiques) classiquement utilisés dans les industries agroalimentaires (Stiles et al., 1996, Gould, 2000 et Singh, 2018).

Les bactéries de bio-préservation utilisées à un niveau industriel doivent répondre aux critères suivants : être faciles à cultiver autant dans un milieu de culture que dans l'aliment en question, survivre lors du stockage des aliments, être compétitives avec les autres flores, inhiber efficacement les micro-organismes indésirables et pathogènes et ne pas altérer les qualités organoleptiques du produit (Castellano et al., 2008).

Il existe différentes voies permettant la bio-préservation des aliments. Ainsi il est possible d'utiliser des microorganismes, tels que les bactéries lactiques dans des procédés ancestraux, comme la fermentation traditionnellement utilisée pour la fabrication de produit d'origine animale ou végétale. Le rôle conservateur des bactéries lactiques est principalement lié à leur compétitivité qui leur permet de croître et dominer aux dépens des autres espèces, ainsi qu'à leur capacité à produire des molécules antagonistes, peroxyde d'hydrogène, acides organiques et d'autres substances antibactériennes telles que les bactériocines en inhibant certaines souches pathogènes (Laref et al., 2013). Ces bactériocines sont de petits peptides, thermostables que les bactéries utilisent dans le cadre de la compétition contre d'autres bactéries de la même espèce (spectre étroit) ou contre des bactéries d'autres genres (large spectre). Les bactériocines les plus prometteuses dans le développement d'antibiotiques sont celles produites par les bactéries lactiques, avec les genres de base, notamment *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* (Dortu et Thonart, 2008).

I.2.1.2. Rôle dans la fermentation alimentaire :

Les bactéries lactiques sont, de loin, la catégorie de microorganismes la plus utilisée dans la production des produits alimentaires contribuant ainsi à la texture et au goût des produits fermentés. Par ailleurs, la production par ces bactéries de métabolites tels que les peptides antimicrobiens et l'acide lactique, permet d'inhiber la prolifération des microorganismes pathogènes et d'assurer ainsi une bonne conservation des aliments (Pot, 2008). Elles sont utilisées depuis longtemps dans la fabrication de divers produits fermentés (Leroy et Devuyst, 2004).

I.2.2. Dans le domaine de la santé humaine

Plusieurs microorganismes sont déjà utilisés couramment pour leur effet favorable sur la santé pour leurs propriétés probiotiques. En effet, elles améliorent les fonctions digestives et ont un effet très positif sur la microflore intestinale (Larini et al., 2014).

L'intérêt des bactéries lactiques en matière de santé humaine a été initialement proposé au début du 1907, par le russe Metchnikoff. Selon lui, les lactobacilles pouvaient réduire la putréfaction intestinale, en modifiant la microflore intestinale, et ainsi prolonger la vie. Depuis un grand nombre d'études publiées sur l'effet potentiel des bactéries lactiques sur la santé, plus récemment, des études de type pharmaceutique ont été menées à grande échelle dans plusieurs laboratoires afin de démontrer l'effet bénéfique des bactéries lactiques sur la santé. Seul un petit nombre de bactéries lactiques dont les genres bactériens sont *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* ainsi que les bifidobactéries a été ainsi étudié. Les effets bénéfiques potentiels cités sont nombreux et variés. Certains sont maintenant bien établis tels que l'amélioration de la digestion du lactose et le traitement des désordres diarrhéiques, d'autres restent encore controversés tels que la diminution du cholestérol sérique ou encore la réduction de la formation de tumeurs (Dronault et corthier, 2000).

I.2.2.1. Traitement des maladies diarrhéiques

La diarrhée est un effet indésirable relativement fréquent des traitements antibiotiques. Elle relève le plus souvent des effets de l'antibiotique sur la flore intestinale endogène, principalement d'une diminution de sa capacité de fermentation et / ou d'une diminution de l'effet de barrière autorisant alors l'émergence de pathogènes (Marteau et Seksik, 2004).

L'équilibre intestinal peut être rétabli par l'apport de probiotiques, micro-organismes bactériens vivant en nombre suffisant qui exercent une action bénéfique sur l'organisme hôte et améliorent l'équilibre de sa flore microbienne (Lamassiaud, 2009).

L'ingestion de bactéries lactiques vivantes, via des aliments fermentés, peut limiter l'impact des événements perturbateurs, et permet aussi d'accélérer le retour à l'équilibre intestinal. De nombreux travaux scientifiques justifient l'emploi des yaourts et des laits fermentés dans la prévention et l'accompagnement du traitement des diarrhées aiguës. Les yaourts et les laits fermentés contiennent des bactéries lactiques qui réduisent le risque de diarrhée aiguë en moyenne de 57 % chez l'enfant et de 26 % chez l'adulte (Sazawal et al., 2006).

Parmi les mécanismes expliquant cet effet préventif : l'amélioration des fonctions physiologiques du tractus intestinal (maintien d'un pH bas, régulation de la perméabilité de la muqueuse), la réduction de la colonisation par des pathogènes, la stimulation des défenses de l'hôte. Il est par exemple établi que *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium bifidum* influencent différents aspects du système immunitaire (Sazawal et al., 2006).

I.2.2.2. La réduction de la formation des tumeurs

Différents travaux attestent maintenant de propriétés antitumeurs spécifiques des lactobacilles ou des aliments fermentés par ceux-ci, et des relations existantes entre les problèmes de nutrition et les cancers. Plusieurs facteurs ont été suggérés qui peuvent contribuer à expliquer les propriétés antitumeurs des produits fermentés :

- ✓ Inactivation ou inhibition de la formation des composés carcinogènes dans le tractus gastro-intestinal ;
- ✓ Suppression de l'apparition de cancer grâce à la stimulation ou à l'augmentation de la réponse immunitaire de l'hôte.
- ✓ Diminution de l'activité des enzymes des bactéries fécales (B-glucuronidase, azoréductase, nitro-réductase) qui peuvent activer des composés carcinogènes en convertissant les procarcinogènes en carcinogènes (Desmazaud, 1996).

I.2.2.3. La diminution du cholestérol sérique et déconjugaison des sels biliaires

L'effet des bactéries lactiques sur le métabolisme du cholestérol reste encore controversé. Plusieurs études rapportent que la concentration en cholestérol sérique diminue pendant la consommation de grandes quantités (680 à 5000 ml par jour) de produits laitiers fermentés. Gilland (1990) a montré que plusieurs bactéries notamment *Lb. Acidophilus* et *Bf. longum* sont capables de limiter le taux de cholestérol sanguin. Ces mêmes bactéries peuvent assimiler le cholestérol in vitro en présence de taurocholate de sodium. Une partie de ce cholestérol assimilé (environ 20 %) a notamment été retrouvée dans la membrane cellulaire de ces bactéries lactiques (Gilland, 1990).



Moississures

II.1. Généralités

II.1.1. Définition

Le terme « moisissure », au sens large, inclut les champignons filamenteux (mucorales, ascomycètes et deutéromycètes) et les levures appartenant aux ascomycètes et aux basidiomycètes (*Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Pseudozyma*) (Reboux, 2010). Il n'a pas réellement de signification systématique ; il désigne tous les champignons microscopiques qui intéressent l'économie et l'environnement humains, de façon bénéfique ou néfaste.

Sur le plan économique, on peut distinguer deux groupes de moisissures : les moisissures utiles qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques comme *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti* dans la fromagerie ; *P. jensenii* en salaisonnerie. Les moisissures nuisibles toxigènes peuvent se développer dans différents substrats tels que les céréales et les fourrages, et y produire dans certaines conditions de température et d'humidité des molécules toxiques dénommées mycotoxines ou métabolites secondaires (Boudra, 2002).

Le développement des moisissures sur les aliments joue un rôle spécifique dans la détérioration des produits alimentaires, aussi a des conséquences économiques telles que la baisse de la qualité marchande des grains et des fruits, la diminution de la performance du bétail au niveau de la reproduction, l'altération de la qualité organoleptique des aliments dans l'industrie agro-alimentaire (Botton et al., 1990 ; Girardin, 1997 et Sautour, 2002). En plus, la croissance de moisissures peut provoquer la détérioration ou peut rendre les aliments fermentés dangereux pour la santé humaine par la production des mycotoxines (Reddy et al., 2010).

II.1.2. Caractéristiques générales

Les moisissures sont des organismes eucaryotes pluricellulaires capables de se développer sur divers substrats. Elles sont hétérotrophes vis-à-vis du carbone et dégradent les matières organiques en les transformant en matières minérales qu'elles assimilent par absorption (Tabuc, 2007).

Les moisissures sont aérobies, en général acidophiles et mésophiles (Guiraud, 1998). Non photosynthétiques, elles ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. Leur particularité morphologique est d'être étroitement liée à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien très développée. Leur reproduction est aussi une caractéristique remarquable. En fait, les champignons produisent un très grand nombre de spores, ce qui leur assure un grand pouvoir de diffusion ou de contamination. Ces spores sont issues de deux modalités de reproduction sexuée ou asexuée. Les micromycètes deviennent parfois visibles lorsqu'elles forment de véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères. C'est ce qu'on appelle les moisissures (Chabasse et al., 2002).

II.1.3. Écologie

Les moisissures ont un rôle capital dans le cycle de la matière organique, elles participent à la formation de l'humus ; la couche supérieure du sol. Elles sont omniprésentes dans notre environnement (sol, eau, plantes...) et sont véhiculées par l'air, les matières premières, l'homme et les animaux. Il y a environ 99 000 espèces fongiques qui ont été décrites mais on estime que leur nombre total pourrait atteindre 5 millions (Kupferschmidt, 2012).

Les champignons filamenteux sont saprophytes capables de se développer sur de nombreuses matières premières et aliments transformés tels que les céréales, viandes, lait et produits laitiers, fruits, pain... Cette capacité résulte de leur aptitude à croître sur une gamme relativement large de pH, d'activité de l'eau (aw) et dans une moindre mesure de température, à l'exception de certains champignons thermorésistants. Les moisissures sont capables de se développer à des aw comprises entre 0.99 jusqu'à des aw en dessous de 0.85 pour certaines moisissures xérophiles. Certains de ces contaminants sont capables de se développer à de basses températures (en dessous de 0 °C) et d'autres peuvent se développer jusqu'à 45 °C, comme par exemple *Aspergillus niger*. Du point de vue du pH, les différentes moisissures peuvent se développer sur une gamme de 2 à 8.5, avec des optimums se situant plutôt entre 4 et 6 (Pitt et Hocking, 1997).

II.1.4. Spores et cycle de vie

Les conidiospores, appelées également spores, sont les formes de reproduction asexuée des champignons filamenteux (Figure 8). Elles vont germer et émettre un filament qui va croître et se ramifier lorsque les conditions environnementales sont favorables et qu'il y aura une source d'alimentation disponible. Elles forment alors un nouveau mycélium, puis des conidiophores dans le cas d'un deutéromycète (D'Enfer, 1997).

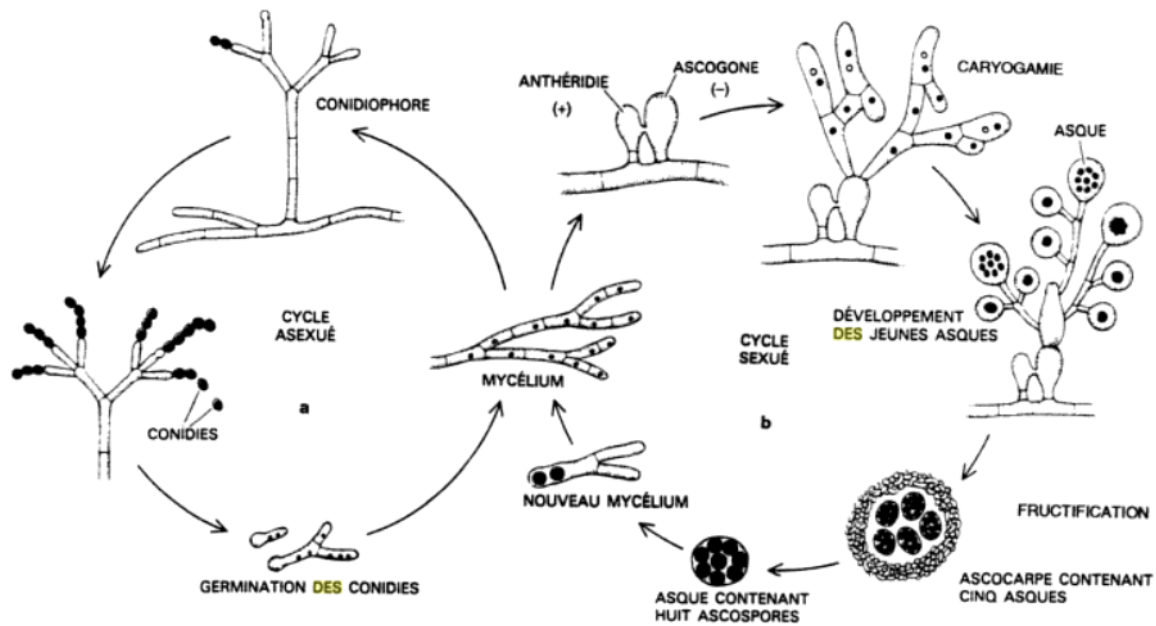


Figure 08. Schéma de la reproduction des moisissures (Meyer *et al.*, 2004)

II.2. Classification des moisissures

Différents groupes de moisissures ont été définis suivant leur mode de reproduction sexuée et les caractéristiques de leurs spores. Le règne des mycètes comprend des divisions, elles même subdivisées en classes. Celles-ci englobent des ordres qui rassemblent des familles. L'identification des champignons est essentiellement morphologique. Un micromycète peut parfois se présenter sous différentes formes : une forme sexuée ou téléomorphe et une forme asexuée ou anamorphe. Lorsque plusieurs aspects coexistent pour la forme asexuée, on parle de synanamorphes. Lorsque l'espèce fongique existe dans la même culture sous forme sexuée et asexuée, on parle d'holomorphe. On différencie quatre divisions selon les modalités de reproduction sexuée : les Mastigomycètes, les Zygomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycètes (ou *fungi imperfecti*) (Chabasse *et al.*, 2002 ; Michel *et al.*, 2002).

- ✓ Les Mastigomycètes, qui sont très rarement impliqués en pathologie humaine, se répartissent en deux classes : les Chytridiomycètes et les Oomycètes. Ils sont caractérisés par la présence de spores munies de flagelles (Chabasse *et al.*, 2002).
- ✓ Les Zygomycètes sont des champignons saprophytes à hyphe non segmenté (Tortora *et al.*, 2003). Les hyphes sont donc plurinuclés sauf lors de la formation des sporocystes et des gamétocystes. Ce groupe prend son nom de leur formation d'un zygote enkysté au cours de leur reproduction sexuée. Ces zygosporos représentent des structures

dormantes capable de supporter des conditions rigoureuses, dont la plupart vivent dans le sol sur des matières organiques animales ou végétales en décomposition (Raven *et al.*, 2007).

- ✓ Les Ascomycètes sont caractérisés par la formation endogène des spores (ascospores) contenues dans l'asque. Ils se subdivisent en Hemiascomycètes dont les asques sont libres et qui correspondent essentiellement à des levures, et en Plectomycètes dont les asques sont groupés dans des réceptacles : apothécie, périthèce et cleistothécium. Les Eusascomycètes regroupent de nombreux parasites des végétaux, mais aussi de nombreuses moisissures contaminant les produits alimentaires (*Aspergillaceae*). Certains, comme *A. fumigatus*, peuvent être responsables d'infections graves (Meyer *et al.*, 2004).
- ✓ Les Basidiomycètes qui ont caractérisé par la reproduction sexée par la production des basidiospores formés par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées appelés basides, ces basidiomycètes ont un thalle cloisonné.
- ✓ Les Deutéromycètes réunissent le plus grand nombre d'espèces pathogènes pour l'homme et les animaux. Cette division, très hétérogène, englobe toutes les espèces de champignons, pour lesquelles la reproduction sexuée n'est pas connue. La majorité des Deutéromycètes sont des formes imparfaites d'Ascomycètes (Botton, 1990 ; Kiffer et Morelet, 1997 et Cahagnier, 1998).

II.3. Les principaux genres des moisissures d'altération

II.3.1. Le genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes (Chabasse *et al.*, 2002) appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Ils sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalin ou coloré, présentent un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores (Figure 09) dressés, terminés en vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou les phalides. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies (Figure 10) (Chabasse *et al.*, 2002 et Reboux *et al.*, 2010). Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, ces genres comprend de 180 à 250 espèces selon les auteurs dont seules *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. terreus*, et *A. niger* sont considérées comme thermotolérantes (Reboux *et al.*, 2010).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes et d'acides organiques (Botton et al., 1990).

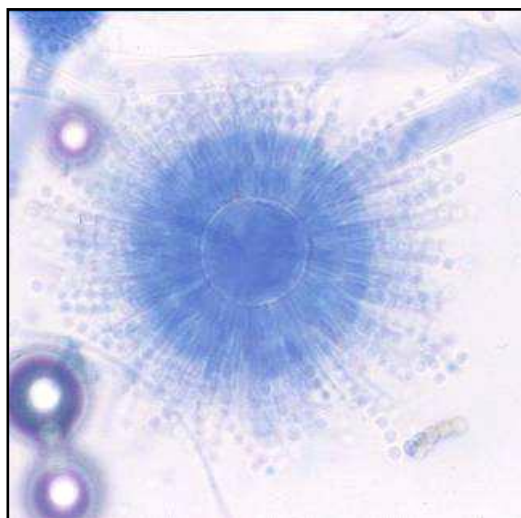


Figure 09. Observation microscopique d'une tête aspergillaire (Reboux, 2008)

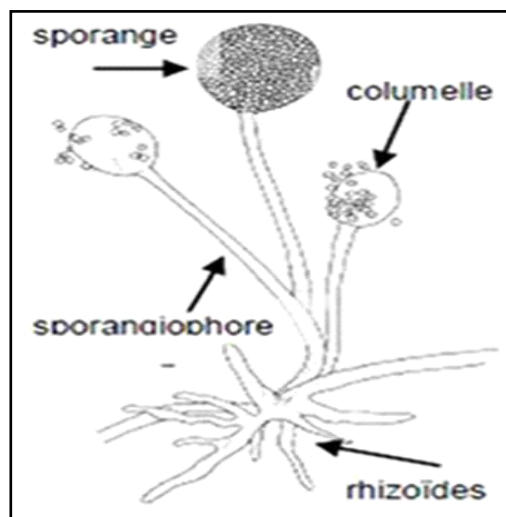


Figure 10. Appareil reproducteur des mucorales (Dufresn et St-Germain, 2013)

II.3.2. Le genre *Penicillium*

De tous les champignons, c'est probablement le genre *Penicillium* qui est le plus ubiquitaire. Il comporte plus de 200 espèces qui se rencontrent partout de l'équateur aux pôles (Reboux et al., 2010). Ce genre se caractérise par l'aspect du conidiophore (Figure 11,12) qui est divisé en articles rappelant ainsi la forme d'un pinceau (Champion, 1997). Les espèces du genre *Penicillium* se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées (Botton et al., 1990).

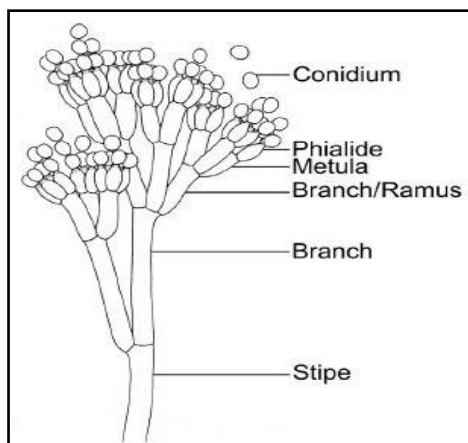


Figure 11. Schéma d'un *Penicillium* (Visagie et al., 2014)

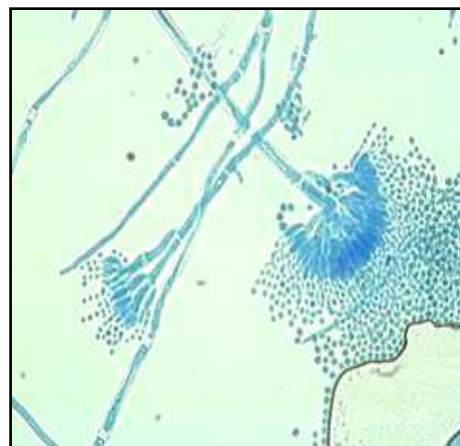


Figure 12. Observation microscopique d'un *Pénicillium* (Reboux et al., 2008)

La majorité d'espèces du genre *Penicillium* sont capables de produire des mycotoxines : l'acide cyclopiazonique (*Penicillium chrysogenum*), l'acide pénicillique (*Penicillium cyclopium*) ; la patuline ou la clavacine (*Penicillium expansum*, *Penicillium griseofulvum*), la citrinine (*Penicillium expansum*), l'ochratoxine A (*Penicillium verrucosum*) (Pitt, 2000).

II.3.3. Le genre *Fusarium*

Le nom *Fusarium* vient de « fusus » qui signifie fuseau d'après la forme de ces macroconidies fusiformes et cloisonnées (Figure 13). Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des Deutéromycètes. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* (Figure 14) sont connues, et appartiennent à la classe des Ascomycètes (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*) (Munkvold, 2017). Ce sont des champignons cosmopolites, on distingue près de 40 espèces largement répandues dans la nature et vivants en saprophytes. Certains sont des phytopathogènes et produisent divers mycotoxines contaminants les denrées alimentaires et provoquant alors des maladies graves chez les herbivores (mycotoxicoses) (Chabasse et al., 2005). Ils sont connus pour leur association intime avec les céréales en tant qu'agent pathogène des plantes et ont été isolés du blé, orge en réduisant le rendement et la qualité de ces derniers, ils ont besoin d'une humidité élevée pour croître (Abramson et al., 2001 et Williams et al., 2012). La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage. La fumonisine est la mycotoxine la plus connue de ce genre (Williams et al., 2012 et White, 2016).

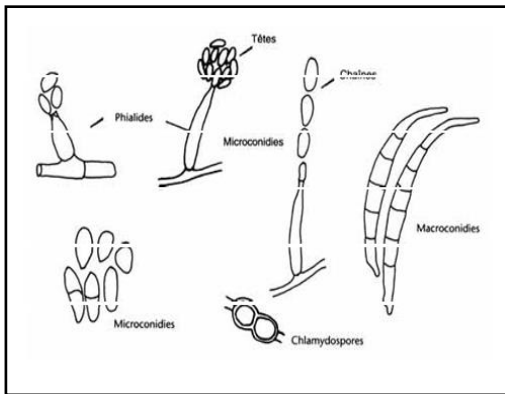


Figure 13. Aspect microscopiques des conidies de *Fusarium* (Chabasse et al., 2002)

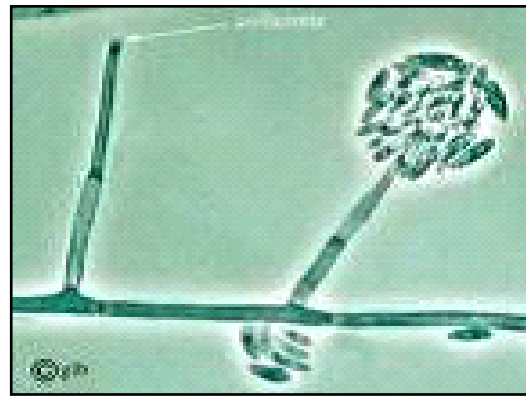


Figure 14. Observation microscopique du genre *Fusarium* (Reboux, 2008)

II.3.4. Le genre *Alternaria*

Le genre *Alternaria* renferme plus de 100 espèces de champignons extrêmement répandues dans l'environnement (Simmons, 1992 et Guillemette, 2003). La plupart de ces espèces sont saprophytes, mais d'autres sont pathogènes pour l'Homme, pour les insectes ou pour les plantes (Guillemette, 2003 et Thomma, 2003). La majorité des espèces du genre *Alternaria* (Figure 15) est cependant associée aux plantes ; plus d'une soixantaine, saprophytes ou pathogènes, sont régulièrement signalées sur semences (Champion, 1997). Les *Alternaria* pathogènes sont généralement inféodés à une famille ou à une espèce donnée. La gamme de plantes hôtes concernées par les attaques d'*Alternaria* est très variée, allant des céréales (*A. triticina*) aux cultures maraichères (*A. dauci* et *A. radicina* sur carotte, *A. solani* sur tomate et pomme de terre, *A. porri* sur poireau, *A. brassicae* et *A. brassicicola* sur radis et chou), aux cultures fruitières (*A. mali* sur pommier, *A. citri* sur citron et orange) ou encore le tabac (*A. longipes*), le coton (*A. macrospora*) ou le lin (*A. linicola*) (Guillemette, 2003 et Calmes, 2011).

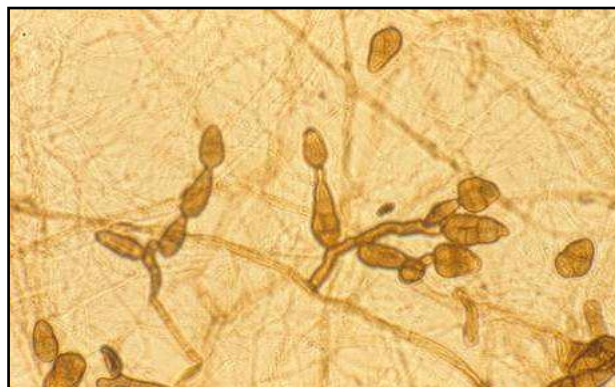


Figure 8. Observation microscopique du genre *Alternaria* (Reboux, 2008)

II.4. Les mycotoxines

II.4.1. Généralités

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant « poison ». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faible concentration, d'induire un effet toxique (Roboux, 2006). Ce sont des métabolites secondaires produits à la fin de la phase stationnaires et phase de déclin. Les mycotoxines peuvent se développer sur la plante au champ ou en cours de stockage et douées de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux. Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (Ruppel et al., 2004 et Ashiq et al., 2015).

Les mycotoxines sont produites par de nombreuses moisissures dotées génétiquement d'un pouvoir toxicogène. Elles doivent cependant croître sur un substrat permettant l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines de ces champignons (Chapelend et al., 2005).

Les mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicité aiguë et chronique allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil pulmonaire, ainsi que sur le système digestif et rénal (Pitt, 2000).

II.4.2. Nature et origine des mycotoxines

La formation de métabolites toxiques dans un substrat à la suite de leur attaque par des moisissures peut être le résultat de trois mécanismes différents :

- ✓ Le champignon, en parasitant un végétal vivant, peut entraîner, soit une exacerbation de certaines réactions métaboliques de la plante, conduisant à des concentrations anormalement élevées d'un constituant habituel, soit la formation par le végétal de produits toxiques n'existant pas dans la plante saine.
- ✓ Le champignon peut transformer un composé peu ou pas toxique en un produit toxique par le jeu des bioconversions. Ainsi, l'acide coumarique, présent en faible concentration peut être transformé par différentes moisissures en 4-hydroxycoumarine, puis en dicoumarol, anticoagulant puissant.
- ✓ La toxine est un métabolite propre de champignon : aflatoxine, zéaralénone (LeBars, 1998, Guerre et al., 2000).

II.4.3. La mycotoxinogénèse

La mycotoxinogénèse est définie comme étant l'ensemble de facteurs de synthèse et d'excrétion des mycotoxines. La synthèse des mycotoxines, encore appelée toxinogénèse, est

un processus d'une grande complexité. Il semblerait qu'il s'agisse d'une réaction du champignon face à des conditions environnementales stressantes (température, humidité trop élevées ou trop basses). La production des mycotoxines est directement liée à la croissance fongique. Par conséquent, les facteurs capables d'influencer la croissance fongique vont aussi jouer un rôle sur la toxinogénèse. D'une manière générale, les conditions environnementales nécessaires à la production de mycotoxines sont plus étroites que celles permettant la croissance fongique (Blumenthal, 2004 ; Bouras et al.2016).

II.4.4. Les différents types des mycotoxines

Plus de 150 champignons mycotoxinogènes sont actuellement connus, la plupart appartenant aux genres *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria*. Puisque la plupart des espèces mycotoxinogènes peuvent produire plus d'une mycotoxine, environ 300 à 400 mycotoxines ont été découvert jusqu'à présent. En raison de leur haut degré de structure, diversité et origines biosynthétiques, classant ces mycotoxines est plutôt difficile. Les principales mycotoxines sont les aflatoxines, fumonisines, trichothécènes (types A et B), ochratoxines, alcaloïdes de l'ergot, citrinine, patuline et zéaralénone et ses métabolites (Pamel et al., 2010 et Gomez et al., 2020).

II.4.4.1. Les Aflatoxines

Les Aflatoxines sont produites essentiellement par *Aspergillus flavus*, et apparaissent sur de nombreux produits crus tels que les céréales, les épices, les figues et les olives (Roussos et al., 2006). Parmi la vingtaine d'aflatoxines recensées, quatre seulement se retrouvent dans les aliments (Aflatoxines B1, B2, G1, G2). Les Aflatoxines sont à l'origine de nombreuses pathologies dont le cancer du foie, l'hépatite chronique, la jaunisse et la cirrhose. Il existe aujourd'hui dans la plupart des pays des contrôles réguliers et systématiques de la teneur en aflatoxines des principaux produits primaires (céréales, fruits secs...). Le lait et la viande sont également très contrôlés (Le Bars, 2000 ; Milita et al., 2010 ; Akaki et al., 2018), La condition optimale pour la production d'aflatoxines par *A. flavus* et *A. parasiticus* sont 33 ° C et l'aw de 0.99 (Milani, 2013).

Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1. Parmi les aflatoxines, l'AFB1 (Figure 16) est la plus fréquente et la plus toxique (Diakite et al., 2017).

Les aflatoxines ont des effets cancérigènes, tératogènes, hépatotoxiques, mutagènes et immunosuppresseurs. Le foie est le principal organe affecté, ils sont associés à la fois à une

toxicité aiguë et chronique cancérogène dans les populations humaines et animales (Bennet et Klich., 2003).

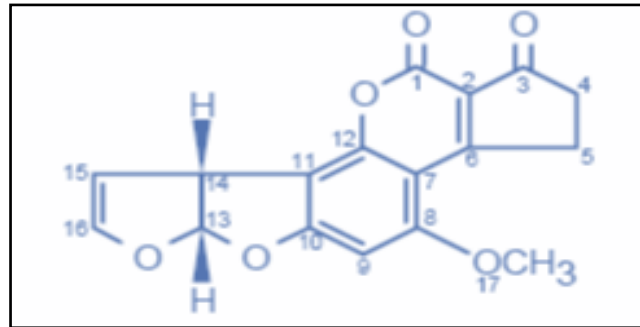


Figure 16. Structure chimique d'Aflatoxine B1 (Yiannikouris et al., 2002).

II.4.4.2. Les Ochratoxines

Parmi les ochratoxines, l'ochratoxine A (OTA) (Figure 17) est la plus toxique, la plus fréquente et la mieux connue, les autres membres de cette famille comme, par exemple les ochratoxines B, C, α et β ont une structure semblable à celle de l'OTA, mais sont moins toxiques et beaucoup plus rares (Brochard et al., 2009 ; Mitchel et al., 2004).

L'OTA est un dérivé de phénylalanine produit par des espèces du genre *Penicillium* et *Aspergillus* (Pitt et Hocking, 1997). Il est connu par ses propriétés néphrotoxiques, cancérogènes, immunotoxiques, génotoxiques et tératogènes pour toutes les espèces animales testées (Pitt, 2000). L'OTA est sécrétée par des moisissures de genre *Aspergillus* (*A. ochraceus*) ou *Penicillium* (*P. verrucosum*). Les *Penicillium* sont particulièrement présents dans nos régions aux climats tempérés et humides et peuvent donc infester des cultures céréalières telles que l'orge, le blé, l'avoine, le seigle ou vivrières (légumineuses) sur pied ou lors du stockage des grains (Frisvad et al., 2004).

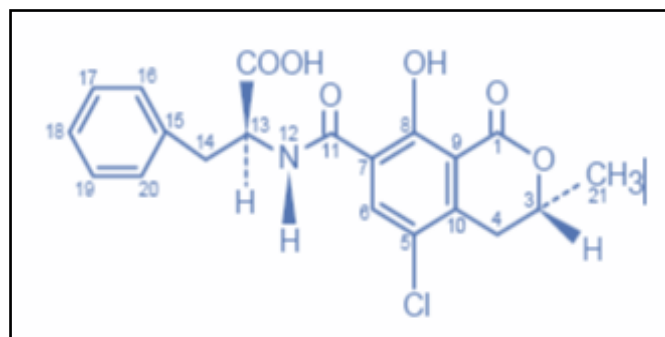


Figure 17. Structure chimique de l'ochratoxine A (Yiannikouris et al., 2002).

II.4.4.3. La patuline

La patuline (Figure 18) a été isolée pour la première fois par Birkinshaw et *al.* en 1943 de *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium expansum*, c'est une petite mycotoxine excrétée par diverses espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus*, il s'agit d'une lactone insaturée, stable à très haute température, bactéricide. Parmi les espèces d'*Aspergillus*, le nombre d'espèces productrices de patuline est limité à trois groupes : *Aspergillus clavatus*, *A. giganteus* et *A. longivesica* (Puel et *al.*, 2010).

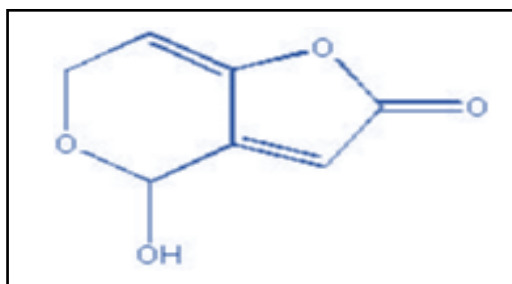


Figure 18. Structure chimique de patuline (Zain, 2011)

II.4.4.4. Les fumonisines

Les fumonisines (Figure 19) produites par différentes espèces de *Fusarium* (*F. moniliforme*, *F. proliferatum* et *F. nygamai*), sont au nombre d'une quinzaine mais la fumonisine B1 (FB1) est de loin la plus répandue et la plus significative en terme de risque associé aux aliments. Elles ont été découvertes en 1988 à l'occasion de l'intoxication spectaculaire à évolution mortelle de chevaux contaminés par leur avoine (Chapelend-Leclerc et *al.*, 2005). Les fumonisines sont largement présentes comme contaminants dans le maïs, le riz, les figes, la bière, et autres produits. Les températures de 15 à 30 ° C et l'activité de l'eau de 0,9 à 0,995, ont été signalée comme des conditions optimales pour leur production (Sanchis et Magan, 2004).

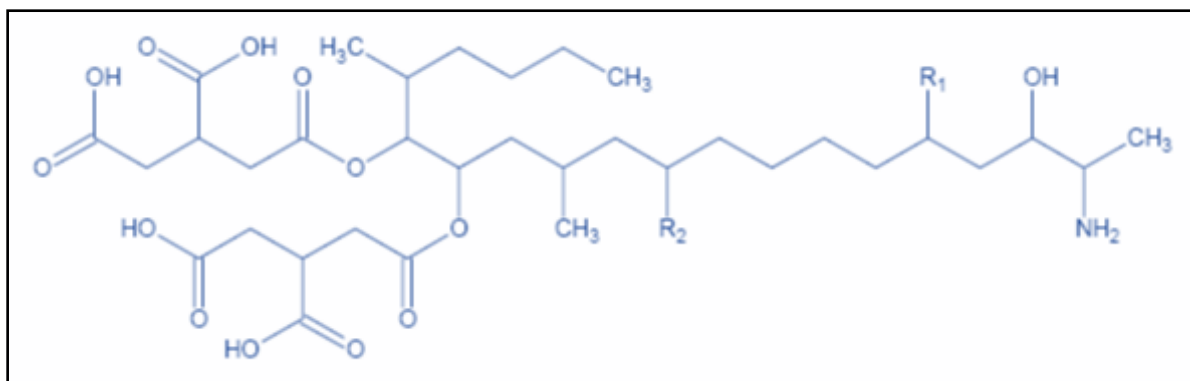


Figure 19. Structure générale des fumonisines (Yiannikouris et *al.*, 2002)

II.4.4.5. La zéaralenone

La zéaralénone (Figure 20) est une lactone de l'acide resocyclique, c'est une toxine œstrogène, également produite par *Fusarium graminearum*. L'effet de la zéaralénone chez les animaux est un syndrome bien défini, elle provoque des problèmes génitaux en particulier chez les porcs. Les symptômes comprennent l'hyperémie et gonflement œdémateux de la vulve en prépubère cochettes ou, dans les cas plus graves, prolapsus du vagin et rectum. La zéaralénone a été impliquée dans plusieurs incidents de changements pubertaires précoces chez les enfants (Pitt et al., 2000 et Desjardins et al., 2006). C'est un stimulant potentiel de la tumorigenèse du sein humain, de plus, il est hépatotoxique, hématotoxique, génotoxique et immunotoxiques (Gao et al., 2013 ; Hueza et al., 2014 et Achiq, 2015).

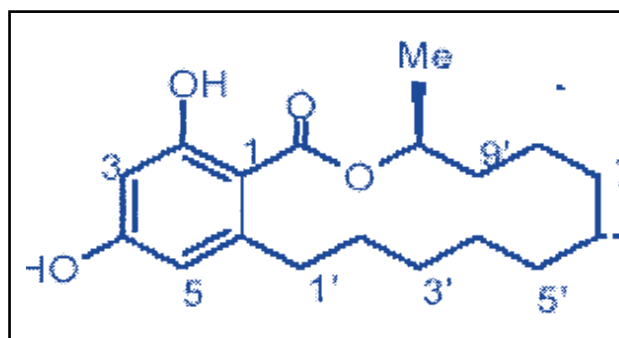


Figure 20. Structure chimique de la zéaralénone (kim et al., 2000).

II.4.4.6. Les trichothécènes

Nombreuses et variées, ces toxines sont produites principalement par *Fusarium tricinctum* sur millet, orge et sont à l'origine de l'aleucie toxique alimentaire (ATA). Les conditions de sécrétion de cette espèce (et de sa voisine *F. sporotrichioides*) sont particulières ; il semble qu'un hiver avec neige abondante, suivi, au printemps, de gelées alternant avec des périodes de dégel, favorise la sécrétion de trichothécènes (Figure 21), en particulier la plus redoutable, la toxine T2 (époxytrichothécène). Il s'agit d'une myélotoxine entraînant une maladie grave, avec leucopénie, agranulocytose et épuisement de la moelle osseuse. Certaines trichothécènes se révèlent de surcroît dotées d'une forte activité immunosuppressive (Chapelend-Leclerc et al., 2005).

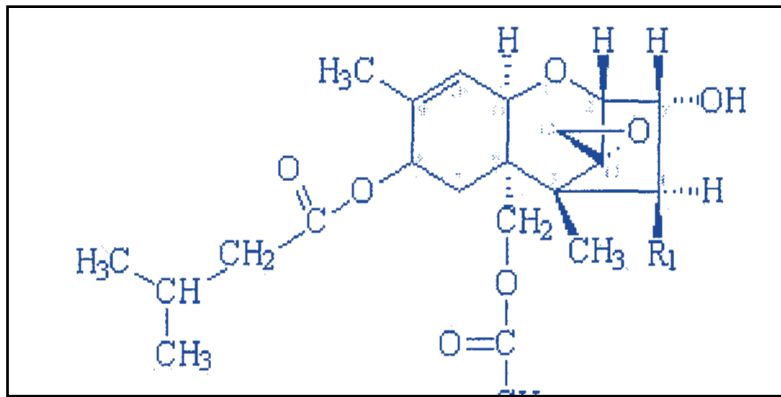


Figure 21. Structure chimique des trichothécènes du groupe B (Pamel *et al.*, 2010)



*Activités antifongiques des
bactéries lactiques*

III.1. Contrôle de la croissance des moisissures par les bactéries lactiques

La détérioration fongique par les moisissures attire de plus en plus l'attention en raison d'énormes pertes économiques causées par ces micro-organismes omniprésents. La croissance des moisissures sur les denrées alimentaires est déterminée principalement par le pH, la température, l'oxygène, l'activité de l'eau (a_w), et d'autres micro-organismes. Elles sont capables de pousser à un pH bas et de tolérer une faible activité de l'eau (a_w), où ils ont moins de concurrents procaryotes (Reverberi et al., 2010). Leur croissance peut entraîner plusieurs types d'altération des aliments, par exemple : mauvais goût, production de toxines, décoloration, pourriture et formation de composés extracellulaires pathogènes ou allergènes. Les hors-saveurs et la désintégration complète de la structure alimentaire sont principalement due aux enzymes fongiques comme les lipases, les protéases et les glucidases qui sont actifs dans ou sur les aliments même après élimination ou destruction du mycélium (Schwenniger et al., 2008 et Adeyeye, 2016).

Depuis de nombreuses années, il est clair que les moyens les plus efficaces de prévenir la contamination des aliments par des mycotoxines visent à éviter la croissance de champignons mycotoxinogènes (Piard et Desmazeaud, 1992 ; Bonestroo et al., 1993 ; Ghanbari et al., 2018 et Goma et al., 2018). Le domaine de recherche des bactéries lactiques antifongiques est encore très nouveau, il y a beaucoup de rapports sur la production de composés antibactériens par les bactéries lactiques, mais les rapports sur l'inhibition des levures et des moisissures sont relativement peu (Strom et al., 2002).

La plupart des publications sur l'activité antifongique des bactéries lactiques ont illustré leurs effets inhibiteurs, mais ont rarement identifié les composés antifongiques (Magnusson, 2003). La majorité de substances antifongiques purifiées à partir des bactéries lactiques sont des composés de faible masse moléculaire, par exemple acides phénylacétiques, dipeptides cycliques et les acides gras à chaîne courte ou moyenne (Schnurer et Magnusson, 2005).

Plusieurs études ont visé à identifier par criblage in vitro à grande échelle des souches de bactéries lactiques présentant un potentiel antifongique intéressant (Magnusson et al., 2003 ; Crowley et al., 2012 et Cheong et al., 2014). En conséquence, les souches lactiques possédant un large spectre d'activité antifongique ont été proposées pour l'application dans différents systèmes alimentaires.

III.2. Activité antifongique des bactéries lactique

Les espèces de *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont les plus étudiées pour leur activité antifongique et sont également les plus évaluées in situ dans les dernières années. Parmi eux, *Lb. plantarum* est l'espèce la plus intéressante. Cette dernière et ses métabolites ont été testés dans une large gamme d'aliments où elle inhibe différentes espèces fongiques comme *Aspergillus*, *Penicillium* et *Rhizopus*, elle est largement présente dans les aliments fermentés, et elle est potentiellement testée comme culture antifongique dans une variété d'applications. Ainsi, la souche *Lb. plantarum* TK9 est active contre *Penicillium* dans l'altération des agrumes, des pommes et du yogourt (Zhang et al., 2016). En outre, une étude récente a montré que *L. plantarum* UFG 121 est capable de retarder la croissance de *F. culmorum* dans une boisson à base d'avoine fermenté (Russo et al., 2017).

Plusieurs études in vitro ont montré une activité de la souche *Pediococcus pentosaceus* contre *A. flavus* et *A. niger* (Sadeghi et al., 2016). Par exemple, 5 souches dont 2 pédiocoques et 3 lactobacilles ont été sélectionnées en fonction de leurs propriétés antifongiques vers trois espèces d'*Aspergillus* productrices d'ochratoxine A. Une souche de *Pediococcus spp.* a été sélectionnée pour l'utilisation comme démarreur dans la fermentation du cacao inoculé avec *A. carbonarius*, où elle réduit les populations des champignons et la production des toxines (Ngang et al., 2015).

Gerez et al., 2013 ont également étudiés la capacité de certaines souches de bactéries lactiques à inhiber *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* (les principaux contaminants du pain). Ils ont analysé 95 souches de bactéries lactiques et ont indiqué que seulement quatre souches : *Lb. plantarum* CRL 778, *Lb. reuteri* CRL 1100, *Lb. brevis* CRL 772 et *Lb. brevis* CRL 796 montrent une activité antifongique contre les moisissures testées.

Mauch et al., 2010 ont étudié l'effet de *Lb. brevis* sur la germination conidienne du *F. culmorum*. Ils ont observé que la germination a été complètement retardée de 6 ou 48 h.

Laitilia et al. 2002 ont étudié aussi, l'effet antifongique de *Lb. plantarum* E76 lors du maltage d'orge naturellement contaminée à l'échelle de laboratoire. L'ajout de la souche E76 au stade précoce du maltage réduit le fusarium de l'orge de plus de 20 %.

Actuellement, plusieurs équipes de recherche peuvent identifier les substances antifongiques produites par les bactéries lactiques ainsi que l'effet synergique de l'acétate de sodium contenu dans le milieu de culture avec les acides organiques produits par ces bactéries (Stile et

al., 2002). Outre que les métabolites antifongiques, la compétition nutritionnelle a été prouvée aussi comme un obstacle antifongique (Bayrok et Ingledw, 2004).

III.3. Les substances antifongiques des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques peuvent produire des composés doués d'activité antifongique comme les composés protéiques, les acides phényllactiques, les dipeptides cycliques, les acides gras hydroxylés, des substances de type bactériocine et autres substances à faible poids moléculaire (figure 22).

L'inhibition de synthèse des mycotoxines par les bactéries lactiques se fait par l'intermédiaire des composés de faible poids moléculaire, encore mal définis mais supposés protéiques, relâchés après lyse cellulaire ou pendant la croissance (Gourama et Bullerman, 1997 et Daliè *et al.*, 2010).

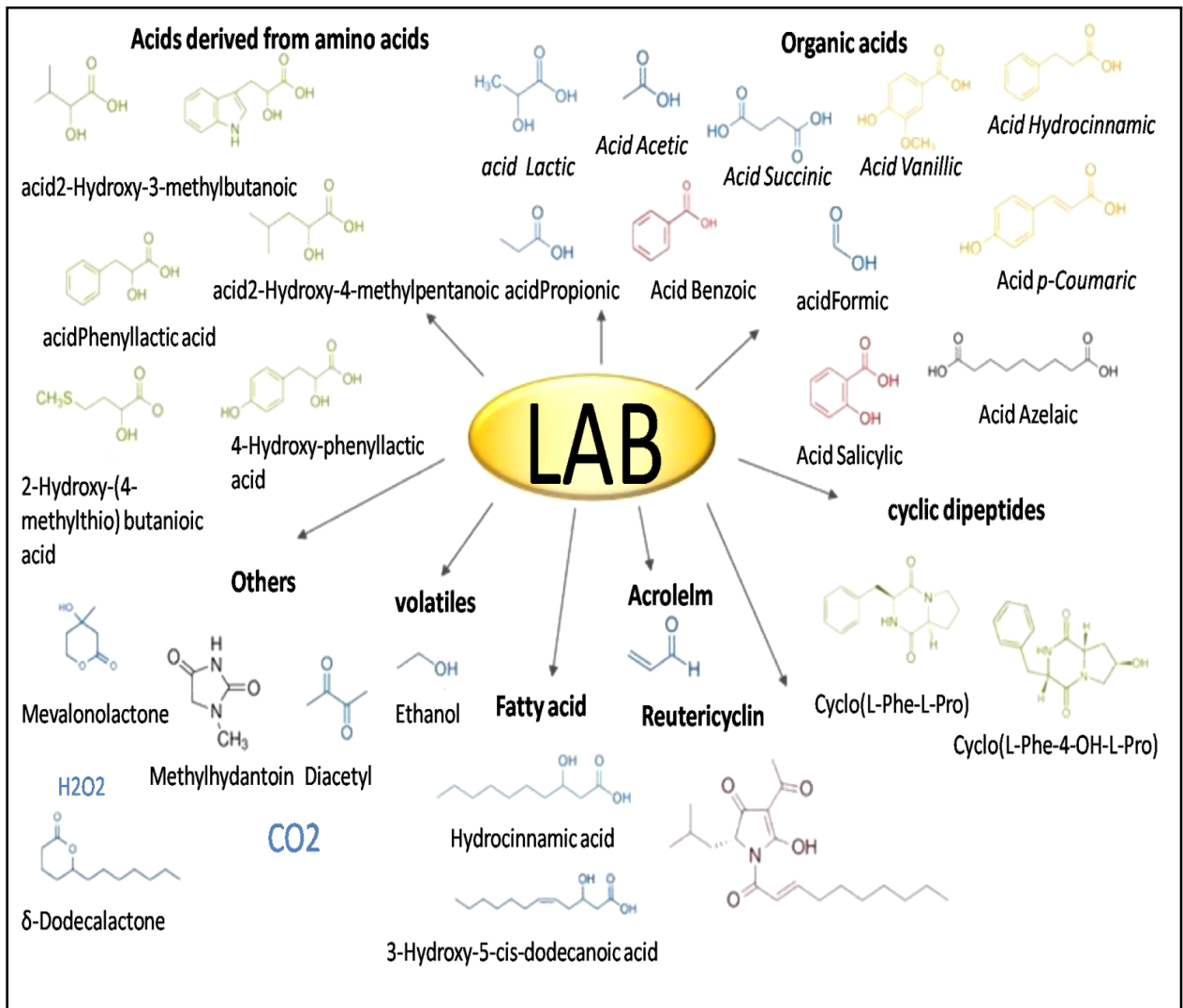


Figure 22. Nature chimique des substances antifongiques produites par les bactéries lactiques (Tiré de Siedler *et al.*, 2019).

III.3.1. Acides organiques

Les bactéries lactiques produisent des acides organiques (figure 22) tels que l'acide acétique et l'acide propionique comme produits finaux de fermentation des glucides, la production de ces faibles acides organiques entraîne un environnement acide qui limite généralement la croissance des bactéries et des champignons, y compris de nombreux microbes pathogènes et d'altération (Crowley *et al.*, 2013).

Les acides organiques agissent sur la membrane plasmique en neutralisant son potentiel électrochimique et augmentant sa perméabilité. La forme hydrophobe de l'acide diffuse sur la membrane cellulaire et se dissocie à l'intérieur de la cellule libérant des ions qui acidifient le cytoplasme (Axelsson, 2004 ; Piard et Desmazeaud, 1991). En plus de l'effet pH, l'acide non dissocié effondre le gradient d'électrochimie de protons, provoquant une bactériostase et finalement la mort des cellules sensibles (Eklund, 1989).

Selon Lavermicocca *et al.* 2000, l'acide acétique possède un effet synergique avec l'acide lactique pour prévenir la croissance fongique, cependant, l'acide acétique est décrit comme plus puissant en raison de sa valeur plus élevée de pKa lui faisant avoir un niveau de dissociation plus élevé à l'intérieur de la cellule. L'acide propionique exerce également des activités anti-moisissures et anti-levures et affiche une valeur de pKa de 4.87, ce qui est supérieur de celle de l'acide acétique (Crowley *et al.*, 2013), Dans une étude récente, Quattrini *et al.* 2018 ont rapporté que l'acide acétique est le métabolite antifongique le plus efficace des bactéries lactiques.

III.3.2. Reutéline

Les bactéries lactiques ne peuvent pas dégrader le glycérol via la voie oxydative qui est incomplète chez elles. La seule voie de dégradation du glycérol se fait à travers la synthèse de la reutéline (Magnusson, 2003). Cette dernière est une substance antimicrobienne à large spectre produite par *Lb. reuteri* et l'un des inhibiteurs de faible masse moléculaire. La production de reutéline a été également signalée chez *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. collinoides* et *Lb. coryniformis*. Une activité antifongique a été mise en évidence contre des espèces d'*Aspergillus* et *Fusarium* (Layva *et al.*, 2017).

Selon Blagojev *et al.*, 2012, l'ajout de glycérol à certaines cultures de bactéries lactiques qui produisent de la reutéline augmente leur activité antifongique.

III.3.3. Dipeptides cycliques

Les dipeptides cycliques font partie des dérivés peptidiques les plus courants dans la nature. La propriété antifongique des dipeptides cycliques produits par les bactéries lactiques a été démontrée dans plusieurs études. Le cyclo dipeptide cyclique (glycyl-L-leucyl) isolé à partir du filtrat de culture de *Lb. Plantarum* est considéré comme un composé qui retarde la croissance de la moisissure *F. avenaceum* qui attaque les céréales. Certains travaux ont montré que l'acidification et la température jouent un rôle important dans la production des dipeptides cycliques (Crowley *et al.*, 2013 ; Rautenbach *et al.*, 2016).

De nombreuses activités sont imputées aux dipeptides cycliques, comme des activités antimicrobiennes et anti-tumorales (Ström *et al.*, 2002 et Rhee, 2004). Ces dipeptides cycliques sont pour la plupart des composés intermédiaires dans la production des peptides non ribosomiques (Ström, 2005).

Niku-Paavola *et al.* 1999 ont isolé un dipeptide cyclique, le cyclo(glycyle-L-leucyle) d'une culture de *Lb. plantarum*, capable de retarder la croissance de la bactérie à Gram négatif *Pantoea agglomerans* et de la moisissure *F. avenaceum*.

Strom *et al.* 2002 ont mis en évidence la production de deux dipeptides cycliques, le cyclo(L-Phe-L-Pro) et le cyclo(LPhe-trans-4-OH-L-Pro), chez une souche de *Lb. plantarum* présentant une activité antifongique. La concentration minimale d'inhibition (CMI) du Cyclo(L-Phe-L-Pro) était de 20 mg/mL contre *A. fumigatus* et *P. roqueforti*.

III.3.4. Acides gras

Les acides gras possèdent des capacités antibactériennes et antifongiques, on pense que les acides gras antifongiques partagent les bicouches lipidiques des membranes fongiques entraînant une perte de l'intégrité de la membrane. Une fluidité accrue provoque la perméabilité de la membrane entraînant une libération incontrôlée d'électrolytes et de protéines intracellulaires, conduisant finalement à une désintégration cytoplasmique des cellules fongiques. Certains acides gras peuvent agir en synergie avec d'autres métabolites inhibiteurs et s'est révélé être responsables de l'arrêt de la croissance des espèces de *Penicillium* et d'*Aspergillus* (Crowley *et al.*, 2013).

Les bactéries lactiques lipolytiques peuvent produire des quantités importantes d'acides gras antimicrobiens qui contribuent à la qualité sensorielle des aliments fermentés. L'acide caproïque isolé de *Lb. sanfrancisco* CB1 était de loin la principale substance antifongique

puissante, et il pouvait agir en synergie avec d'autres acides, tels que les acides propionique, butyrique et valérique (Earnshaw, 1992).

Sjorgen et al. 2003 ont observé que les composés d'acide gras hydroxylés avec 12 atomes de carbone avaient la plus forte activité antifongique contre un large spectre de moisissures et de levures. Les concentrations minimales d'inhibitions (CMI) de ces composés contre les moisissures et les levures variaient entre 10 et 100 µg/ml, ce qui pourrait être comparé aux médicaments antifongiques standards.

III.3.5. Peroxyde d'hydrogène

La plupart des bactéries lactiques ont des flavoprotéines oxydases, ce qui leur permet de produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de l'oxygène (Schnurer et Magnusson, 2005). L'utilisation de l'oxygène comme accepteur d'électrons est évidemment favorisée par de nombreuses espèces microbiennes. Les bactéries lactiques sont incapables de produire de la catalase, elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène qui s'accumule donc dans l'environnement. L'activité antifongique du peroxyde d'hydrogène est attribuée à un fort effet oxydant sur la membrane lipidique et les protéines cellulaires des organismes cibles (Blagojev et al., 2012 ; Olonisakin et al., 2017).

III.3.6. Acide phényllactique

La première description des effets antifongiques de l'acide phényllactique (PLA) a été réalisée par Lavermicocca et al. (2000) à partir d'une souche de *Lb. plantarum* 21B. Une autre étude de la même équipe (Lavermicocca et al., 2003) a établi que la CMI du PLA contre *A. niger* était de 20 mg/ml à pH 4, cette CMI étant augmentée à des pH supérieurs. A part *Lb. plantarum*, d'autres espèces de bactéries lactiques telles que *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. coryniformis*, *Lb. citreum* et *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* produisent de PLA. Cette molécule est issue du métabolisme de la phénylalanine et de la tyrosine dont la biosynthèse résulte de la transamination de la phénylalanine en acide phénylpyruvique qui est ensuite réduit en PLA (Magnusson et al., 2003 et Valerio et al., 2004).

III.3.7. Dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est produit principalement par les bactéries lactiques hétérofermentaires. Il peut jouer un rôle en créant un environnement anaérobie qui inhibe les décarboxylations enzymatiques, son accumulation dans la bicouche lipidique de la membrane peut provoquer un dysfonctionnement de la perméabilité (Ammor et al., 2006). Le CO₂ peut

effectivement inhiber la croissance de micro-organismes colonisant de nombreux produits alimentaires, notamment les bactéries psychrotrophes Gram-négatives et les moisissures (Farber, 1991 et Le Lay *et al.*, 2016).

III.3.8. Bactériocines

Différentes définitions des bactériocines ont été données au cours du temps. Cependant, la définition qui reste la plus largement acceptée est celle proposée par Klaenhammer (1998) qui considère les bactériocines comme des protéines, ou complexes de protéines, avec une activité bactéricide contre des espèces proches de la souche productrice (Dortu et Thonart, 2009), ou bien sont des peptides antimicrobiens, dont l'activité peut être bactéricide (entraînant la mort cellulaire) ou bactériostatique (entraînant un ralentissement de la croissance). Les bactéries productrices sont protégées de l'action de leurs propres bactériocines par un ou plusieurs protéines d'immunité (Dridier et Prevost, 2009 et Rebuffat, 2011). Les bactériocines sont classées en trois classes différentes :

III.3.8.1. Bactériocines de la classe I

Cette classe regroupe tous les peptides thermorésistants subissant des modifications post-traductionnelles et contenant certains acides aminés inhabituels. Elle se subdivise en lantibiotiques, labyrinthopeptides et sactibiotiques. Elle comporte des petites bactériocines, trouvées non seulement chez les bactéries lactiques mais chez de nombreuses autres bactéries à Gram positif. Ces bactériocines comportent un nombre variable d'acides aminés modifiés liés par des ponts soufre intra-chaînes. Leur spectre d'activité relativement large, touchant à la fois à des espèces pathogènes mais aussi à des bactéries lactiques elles-mêmes (Dortu et Thonart, 2009)

III.3.8.2. Bactériocines de la Classe II

Ou les bactériocines sans modifications post-traductionnelles. Les bactériocines appartenant à la classe II possèdent uniquement des acides aminés standards, sont des peptides de taille inférieure à 10 kDa, stables à la chaleur, ne contenant pas d'acides aminés modifiés. Leur point isolélectrique varie entre 8 et 10. Cette classe est divisée en trois sous-classes (Savado *et al.*, 2016).

✓ La sous-classe II A

Contient entre 27 et 48 acides aminés et ont toutes une partie N-terminale hydrophobe contenant la séquence consensus YGNGV ainsi qu'un pont disulfure et une partie C-terminale moins conservée, hydrophobe ou amphiphile qui détermine la spécificité d'action (Fimland *et al.*, 2000 et Richard *et al.*, 2006).

✓ La sous classe II B

Contient les bactériocines ayant besoin de deux peptides pour avoir une activité. Deux types de bactériocines de classe IIB peuvent être distingués : le type E (Enhancing) où la fonction d'un des deux peptides est d'augmenter l'activité de l'autre et le type S (Synergy) où les deux peptides sont complémentaires, ils doivent être présents pour avoir une activité.

✓ La sous classe II C

Contient les bactériocines ne pouvant pas être classées dans les autres sous classes (Nigutova et al., 2007 et Yang et al., 2012).

III.3.8.3. Bactériocines de la Classe III

Protéines de taille supérieure à 30 kDa et sensibles à la chaleur. La structure et le mode d'action de ces bactériocines diffèrent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe ne contient que quatre bactériocines : l'helveticin J produite par *Lb. helveticus*, l'enterolysin A produite par *E. faecium*, la zoocin A produite par *S. zooepidemicus* et la millericin B produite par *S. milleri* (Nilsen et al., 2003 et Nigutova et al., 2007).

III.4. Facteurs affectant la production et l'activité des substances antifongiques

Les composés antifongiques produits par les bactéries lactiques ne présentent une activité optimale que sous certaines conditions. Notamment leur activité antifongique dépend de la température et de pH (Rousse et al., 2008). De même, leur production dépend du milieu de culture et de la phase de croissance (Dalié et al., 2010).

Batich et al., 1990 ont constaté que l'activité antifongique de *Lb. acidophilus* est maximale dans le milieu Elliker par rapport au milieu M17 et Man Rogosa et Sharpe (MRS), et l'augmentation de la période d'incubation a entraîné une baisse dans l'activité antifongique. Sathe et al. 2007 ont démontré que l'activité anti-fongique de *Lb. plantarum* CUK501 est maximale à 30 °C, lorsque la culture est à la fin de la phase logarithmique.

D'après Black et al. 2013, l'inhibition fongique par les acides gras hydroxylés produits par *Lb. hammessi* DSM16381 augmente en présence des acides dont la longueur de la chaîne carbonique est plus longue.

La plupart des expériences de dépistage in vitro des activités antifongiques des bactéries lactiques ont été réalisées en utilisant des milieux synthétiques, tels que le milieu gélosé MRS. La composition de MRS peut avoir un impact important sur l'expression de l'activité antifongique, car il contient de l'acétate, qui peut renforcer l'activité antifongique des bactéries lactiques et gonfler artificiellement le nombre d'isolats actifs, comme mentionné dans

plusieurs études. En effet, l'acétate de sodium présent dans le milieu MRS participe en synergie avec les acides organiques produits par les bactéries lactiques et augmente l'effet inhibiteur (Schnuurer et Magnusson, 2005),

D'autre part, l'activité antifongique de la majorité des souches des bactéries lactiques a été perdue après la neutralisation, traitement déterminant le caractère acide des métabolites antifongiques : lactique, acétique et phényllactique (Geraz et al., 2013). Cependant, les études des effets de ces composés sur les champignons sont compliquées par la sensibilité de la plupart des champignons aux métabolites antifongiques (Sevgi et Ignatova, 2014).

III.5. Interactions entre les bactéries lactiques et les mycotoxines

Le potentiel de dégradation des mycotoxines a été utilisé pour améliorer la sécurité des denrées alimentaires et des aliments pour animaux. Il existe une myriade des rapports sur la capacité des espèces des bactéries lactiques à inhiber la biosynthèse des mycotoxines, en raison de la production de métabolites spécifiques, qui restent, jusqu'à présent, en grande partie inconnue. Dans la partie suivante, différents mécanismes rapportés pour l'interaction entre les bactéries lactiques et les mycotoxines seront examinés (Dal Bello et al., 2007 et Axel et al., 2015).

III.5.1. Liaison des mycotoxines par les bactéries lactiques

La capacité des bactéries lactiques à se lier aux mycotoxines dans les milieux liquides a été largement étudiée. Des études ont montré que cette capacité, ainsi que la stabilité des interactions impliquées sur la liaison des mycotoxines par les bactéries lactiques dépendent de plusieurs facteurs intrinsèques (la souche) et extrinsèques (la densité des cellules bactériennes, la charge des mycotoxines, le sel et la concentration en urée) (El-Nezami et al. 1998, et El-Nezami et al., 2002).

Hatab et al., 2012 ont également étudié la capacité des souches des bactéries lactiques à éliminer la patuline du milieu liquide (jus de pomme). Les 10 souches utilisées dans les expériences peuvent éliminer la toxine à des quantités significativement différentes, dont la meilleure capacité de faire des liaisons est celle de *Lb. rhamnosus* 6224 (80,4%) et *Enterococcus faecium* 21605 (64,5%). Selon les auteurs, l'élimination optimale des mycotoxines a été obtenue à 30 °C.

Selon El-Nezami et al. 1998 l'élimination de l'aflatoxine B1 dans les milieux liquides artificiellement contaminés par les bactéries lactiques était également dépendante de la souche. Il a été démontré que la capacité des souches à éliminer l'aflatoxine dépendait de la

température (élimination maximale à 37 °C) et la concentration des cellules bactériennes (au moins 2×10^9 CFU/ml nécessaires pour une élimination significative). La capacité des souches de *Lb. rhamnosus* d'éliminer l'aflatoxine de la solution est considérablement améliorée après le traitement avec 1M d'HCl (El-Nezami et al., 1998).

Les souches de *Lactobacillus* et de *Propionibacterium* ont été évaluées par El-Nezami et al. (2002) concernant leur capacité à éliminer sept toxines de *Fusarium* (trichothécènes). Les résultats ont montré que *Lb. rhamnosus* GG et *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS étaient capable de se lier de 18 à 93 % du désoxynivalénol, et fusarénol en solution, tandis que *Lb. rhamnosus* LC-705 éliminent 10 à 64% de désoxynivalénol et de diacétoxyscirpénol en milieu liquide. En comparant les capacités des bactéries lactiques et les bactéries propioniques à éliminer la toxine dans la solution, Niderkorn et al. (2006) ont constaté que l'élimination du désoxynivalénol et des fumonisines était spécifique de la souche, et généralement les bactéries propioniques étaient moins efficaces que les bactéries lactiques. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec *Lb. rhamnosus* pour l'élimination de désoxynivalénol (55%), *Leuconostoc mesenteroides* pour la fumonisine B1 (environ 82%), et *L. lactis* pour la fumonisine B2 (100 %) (Niderkorn et al., 2006).

El-Nezami et al. 1998 et El-Nezami et al. 2000 ont utilisé des expériences in vitro et in vivo pour évaluer la capacité des bactéries lactiques pour éliminer les toxines des milieux liquides et empêcher l'absorption de la toxine, respectivement. Lorsque des expériences in vitro ont été utilisées, environ 80 % de la quantité initiale de l'aflatoxine B1 a été éliminée par *Lb. rhamnosus*. Lorsque la même bactérie a été testée in vivo 54 % des aflatoxine B1 a été éliminée (El-Nezami et al., 2000).

El-Nezami et al. 2002 ont également étudié les mécanismes de liaison impliqués dans l'élimination des toxines de *Fusarium* dans la solution. Dans cette recherche, *Lb. rhamnosus* a été étudiée pour sa capacité à éliminer ou à dégrader la zéaralénone et l' α -zéaralénol de Solution. Les résultats ont indiqué que la liaison plutôt que le métabolisme était également le mécanisme d'action utilisée par cette bactérie lactique puisque les cellules viables et non viables (traités par la chaleur et l'acide) ont pu éliminer environ 50 % de la toxine du milieu liquide. En outre, parce que les produits de dégradation n'ont pas été détectés dans la solution, il a pris en charge l'hypothèse que la liaison était le mécanisme utilisé par les bactéries pour éliminer la toxine de la solution.

III.5.2. Impact direct sur la croissance fongique

L'influence directe des LAB sur la production de mycotoxines se fait parfois par l'arrêt de leur croissance en raison de la compétition pour l'espace et les nutriments et la production des acides et des métabolites antifongiques ou d'une combinaison de ces facteurs. On pense souvent que les espèces sont corrélées à leur croissance car la production de mycotoxines est initiée à la fin de la phase de croissance fongique. Par conséquent, l'inhibition de la croissance des champignons mycotoxiques est souvent considérée comme la stratégie la plus efficace pour éviter la production des mycotoxines (Zhang et al., 2019).

Par exemple, Gomaa et al. (2018) ont analysé l'effet des métabolites antifongiques produits par différentes espèces de bactéries lactiques, récupérées de certains produits laitiers traditionnels, sur la production d'AFB1 par *A. flavus*. Les résultats montrent que la souche *Lb. brevis* présentait le potentiel le plus élevé pour affecter la croissance et la production d'AFB1 par *A. flavus*, réduisant à la fois la croissance et la production de mycotoxines d'environ 96%.

III.5.3. Rôle du stress induit par les bactéries lactiques dans la régulation de la production de mycotoxines

L'apparition de la production de mycotoxines par les moisissures est souvent corrélée avec réponse au stress. Par exemple, la synthèse des fumonisines par *F. verticillioides* s'est avérée être considérablement augmentée par la co-culture de *F. verticillioides* avec la souche *Pediococcus pentosaceus* L006 ou dans un milieu dans lequel *Pd. pentosaceus* L006 était déjà inoculée. Une augmentation de la production de mycotoxines en présence de la souche lactique pourrait éventuellement être liée à une réponse au phénomène du stress ou la perturbation provoquée par *Pd. pentosaceus* dans l'environnement (Dalie et al., 2012).

Hassan et Bullerman 2008 ont également signalé une augmentation significative de la production de fumonisines par *F. proliferatum* sous la condition de sa croissance avec *Lb. paracasei subsp. tolerans*, ce qui était probablement dû au stress perçu par les moisissures en présence de l'espèce lactique, qui a favorisé la production de mycotoxines. Il a été démontré que *A. flavus* produit des aflatoxines sous le stress oxydatif, qui pourrait être inversé en ajoutant des antioxydants (Furukawa et Sakuda., 2019).

III.5.4. Détoxification des mycotoxines par les bactéries lactiques

Le processus de détoxification biologique des mycotoxines par les bactéries lactiques implique une dégradation chimique / enzymatique, conversions métaboliques, ou processus

d'adsorption par lesquels elles lient les mycotoxines à leurs composants de la paroi cellulaire (Dali et al., 2010).

Fuchs et al. (2008) ont étudié la désintoxication de deux mycotoxines abondantes ; ochratoxine A (OTA) et patuline (PAT) par des bactéries lactiques. Ils ont analysé la capacité de trente souches lactiques différentes pour éliminer les deux toxines du milieu liquide, dans un essai de dépistage par l'utilisation de HPLC couplée à la détection UV (pour PAT) ou à la détection de fluorescence (pour OTA), et identifié deux souches très efficaces : *Lb. acidophilus* VM 20, qui a causé une diminution de l'OTA de ≥ 95 % et de *Bifidobacterium animalis* VM 12, qui a réduit le niveau de PAT de 80 %. Par la suite, des expériences ont montré que l'efficacité de ces souches est influencée par différents facteurs, tels que la concentration de toxines, la densité cellulaire, la valeur de pH et la viabilité des bactéries.



*Analyse de quelques articles
scientifiques*

IV. 1. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* Isolated from a sourdough bread culture

Yousef I. Hassan, Lloyd B. Bullerman

International Journal of Food Microbiology 121 (2008) 112–115

doi : 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.038

Activité antifongique de *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolé d'une culture d'un levain panaire

IV.1.1. Objectifs de la recherche

- ✓ Isolement de souches de bactéries lactiques à partir de quatre échantillons différents de levain panaire.
- ✓ Recherche d'une activité antifongique des souches lactiques contre *Penicillium expansum* NRRL 2304.
- ✓ Sélection des isolats les plus inhibiteurs contre une gamme de souches fongiques.
- ✓ Identification de la souche lactique la plus pertinente.

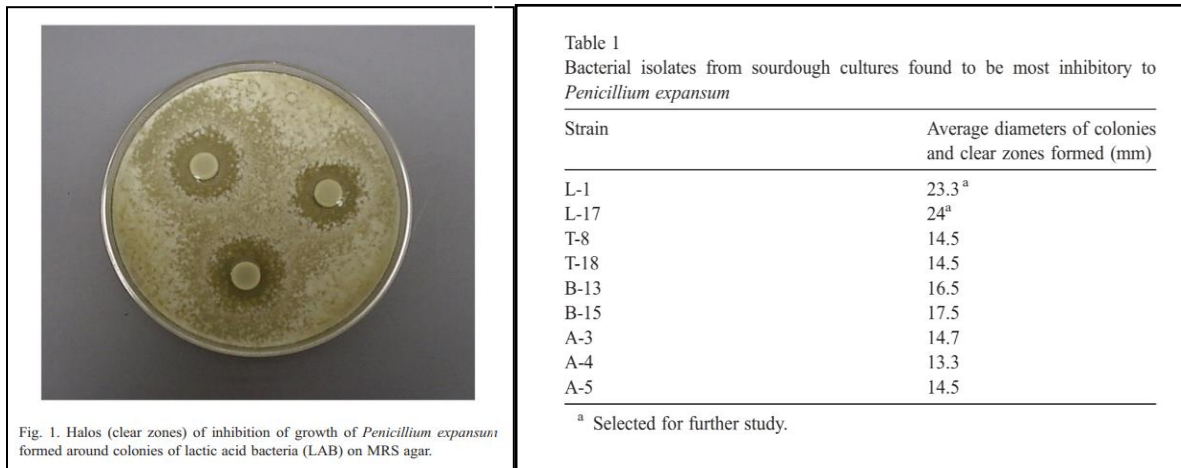
IV.1.2. Méthodologie

- ✓ Pour l'isolement des bactéries lactiques quatre échantillons de levain panaire ont été mélangés avec de l'eau et de la farine (50 ml / 50 g) puis incubés à 35 °C pour la revivification des bactéries lactiques. L'ensemencement a été réalisé sur milieu Mann Rogosa Sharpe (MRS) ou milieu sourdough bacteria (SDB).
- ✓ Les souches lactiques ont été initialement testées pour leur activité antifongique contre la souche fongique *Penicillium expansum* NRRL 2304, à cause à leur sensibilité et leurs caractéristiques de croissance assez lente, la rendant appropriée pour détecter une telle activité antifongique. La méthode utilisée est celle de **Cabo et al. (2002)**.
- ✓ Par la suite, les souches lactiques les plus inhibitrices ont été utilisées pour tester leur activité antifongique contre les espèces fongiques suivantes : *Aspergillus flavus* NRRL 1290, *A. candidus* C 25, *A. niger* NRRL 326, *A. parasiticus* NRRL 2999, *Penicillium crustosum* NRRL 969, *P. expansum* NRRL 2304, *P. roqueforti* NRRL 849, *Fusarium graminearum* R 4053, *F. proliferatum* M 5991 et *F. proliferatum* M 5689, la méthode utilisée est celle décrite par **Cabo et al. (2002)**.
- ✓ Les souches lactiques les plus pertinentes ont été identifiées en utilisant le kit API 50 CHL, ensuite, par identification moléculaire par amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD) et amplification du gène 16S rRNA.

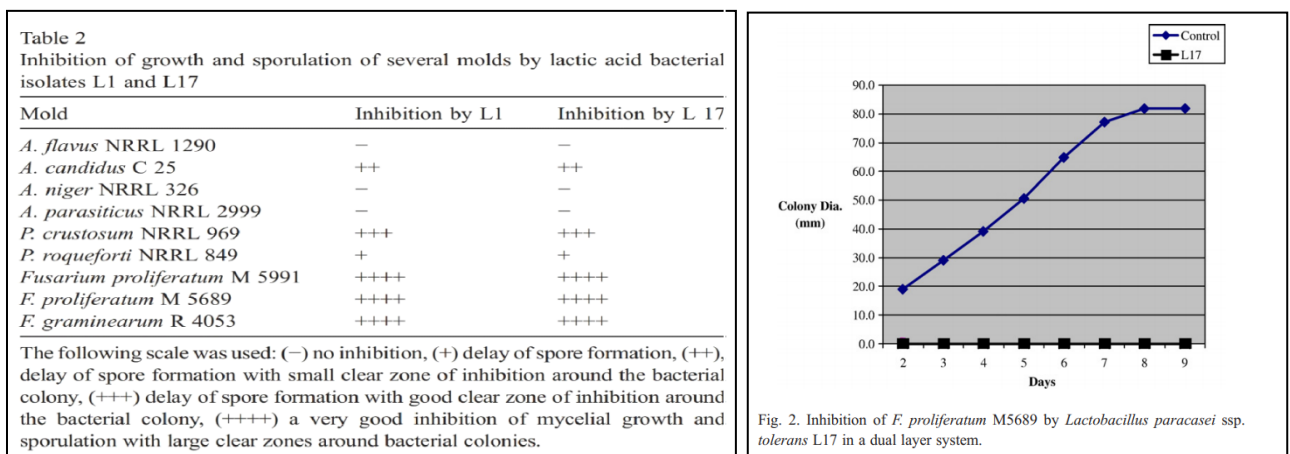
IV.1.3. Résultats

Deux isolats ont été sélectionnés pour leur activité antifongique contre *P. expansum*. Cette sélection était basée sur le diamètre du « halo » ou de la zone inhibitrice formé autour des disques des bactéries lactique sur gélose MRS (figure 1).

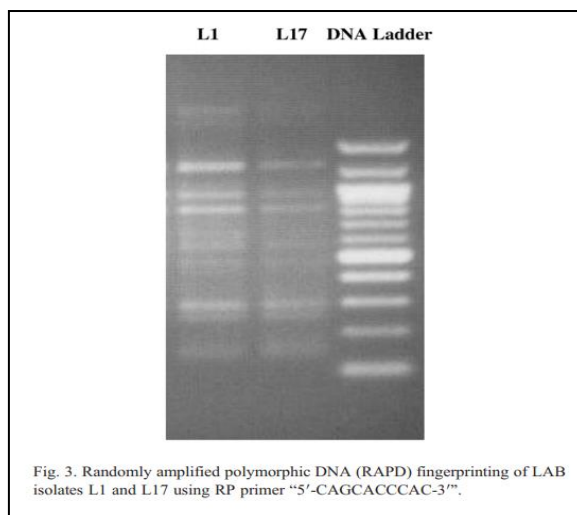
D’après le tableau 1, les deux isolats de bactéries lactiques L-1 et L-17 sont les plus inhibiteurs de *P. expansum*. Ils présentaient des halos de diamètres de 23.3 et 24 mm respectivement.



Les deux souches lactiques L-1 et L-17, présentaient également une forte inhibition des moisissures du genre *Fusarium*, une bonne inhibition a été aussi notée avec *P. crustosum* NRRL 969. L’activité antifongique est modérée contre *A. candidus* C 25, faible contre *P. roqueforti* NRRL 849 est nulle contre les trois souches restantes (tableau 1).



La figure 2, montre une inhibition complète de *F. proliferatum* M5689 en présence de *Lb. paracasei* ssp. *tolerans* L17 et cela apparait entre le huitième et le neuvième jour.



D'après les résultats sur l'identification de la souche lactique, les tests d'identifications de fermentation de l'API 50 CHL a identifié que les deux isolats correspondent à *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Alors que l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe a confirmé que les deux isolats provenaient d'une seule souche et que la même souche a été isolée deux fois. L'amplification de l'ADN par la technique PCR a révélé que l'isolat appartenait à l'espèce *L. paracasei* et il est étroitement lié à *L. paracasei* ssp. *tolerans* plutôt que *L. paracasei* ssp. *paracasei*.

IV.1.4. Conclusion

La capacité de la souche *L. paracasei* ssp. *tolerans* à inhiber la croissance des espèces de *Fusarium* pourraient éventuellement donner une approche unique pour surmonter la croissance d'espèces de *Fusarium* contaminantes pendant le processus de maltage. La coexistence des deux *L. paracasei* ssp. *tolerans* et *F. graminearum* pourrait entraîner l'inhibition de la croissance de *F. graminearum* et/ou production des mycotoxines.

IV.2. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe-L-Pro) and Cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid

Katrin Ström, Jörgen Sjögren, Anders Broberg, and Johan Schnürer

Appl Environ Microbiol. 2002 Sep ; 68(9) : 4322-4327.

doi : 10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002

***Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 Produit les Dipeptides Cycliques Antifongiques Cyclo (L-Phe – L-Pro) et Cyclo (L-Phe – trans-4-OH-L-Pro) et l'Acide 3-phényllactique**

IV.2.1. Objectifs de la recherche

- ✓ Isolement de la souche lactique *Lactobacillus plantarum* (MiLAB 393) à partir d'ensilage d'herbe et de ces composés antifongiques actifs et détermination de son activité antifongique.
- ✓ Fractionnement du surnageant de la souche lactique sur colonne C18 SPE et de la fraction aqueuse d'acétonitrile à 95 % sur colonne HPLC C18 préparative.
- ✓ Détermination des composés dipeptides cycliques antifongiques cyclo (L-Phe– L-Pro), cyclo (L-Phe – trans-4-OH-L-Pro) et acide 3-phényllactique avec spectroscopie par résonance magnétique nucléaire, spectrométrie de masse et chromatographie en phase gazeuse.

IV.2.2. Méthodologie

- ✓ Pour l'isolement des bactéries lactiques, une solution mère a été préparée à partir de 10 g d'ensilage et 90 ml d'eau peptonée stérile. L'ensemencement a été réalisé sur milieu MRS. L'identification de *Lactobacillus plantarum* (MiLAB 393) a été faite par étude du profil fermentaire (API 50) et par amplification du gène 16S rRNA.
- ✓ Dans le cadre de la détermination de l'activité antifongique de *Lactobacillus plantarum* (MiLAB 393) contre *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Fusarium sporotrichioides*, *Penicillium commune* et *P. roqueforti*, ainsi que certaines levures, la méthode adoptée est celle de **Magnusson et Schnürer (2001)** qui consiste à ensemercer la souche lactique sur MRS agar en deux lignes de 2 cm et recouvrir la culture par du milieu malt extract agar (MEA) agar contenant 10^4 spores/ml.
- ✓ Pour la détermination des valeurs de CMI, des composés commerciaux disponibles ont été utilisés : 3-phenyl-l-lactic acid, 3-phenyl-d-lactic acid et cyclo(l-Phe-l-Pro). La méthode utilisée est celle des puits décrite par Magnusson et Schnürer (2001).
- ✓ Le surnageant de la souche lactique a été préparé après centrifugation de la culture bactérienne et filtration par utilisation des filtres millipore (0.45 μ m). Le surnageant obtenu est fractionné par la suite sur colonne C18 SPE.
- ✓ En fin, les structures des composés antifongiques ont été déterminées en utilisant la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (MS) et la chromatographie en phase gazeuse (GC).

IV.2.3. Résultats

D'après les résultats de l'identification de la souche lactique, le schéma de fermentation de l'API 50 CHL a identifié la souche comme une souche de *L. plantarum* avec une probabilité

de 99,9 %. Et la recherche dans GenBank montre une homologie de 100 % avec la séquence correspondante de *L. plantarum*.

Mold or yeast strain	Inhibition ^b
Molds	
<i>A. fumigatus</i>	+++
<i>A. nidulans</i>	++
<i>F. sporotrichioides</i>	+++
<i>P. commune</i>	++
<i>P. roqueforti</i>	-
Yeasts	
<i>C. albicans</i>	++
<i>D. hansenii</i>	++
<i>K. marxianus</i>	+++
<i>P. anomala</i>	(+)
<i>R. mucilaginosa</i>	++
<i>S. cerevisiae</i>	(+)
<i>Z. bailii</i>	-

^a The grading of the inhibition is based on the area of the inhibition zone surrounding the bacterial inocula.
^b Inhibition was graded as follows: -, no visible inhibition; (+), visible inhibition only in the soft agar above the bacterial streak; +, inhibition area per bacterial streak of 0.1 to 3.0% of the petri dish; ++, inhibition area per bacterial streak of 3.0 to 8.0% of the petri dish; +++, inhibition area per bacterial streak of >8.0% of the petri dish.

L. plantarum MiLAB 393 avait une activité contre plusieurs espèces de moisissures et levures (tableau 1). *F. sporotrichioides* et *A. fumigatus* étaient les plus sensibles parmi les moisissures. Aucune activité n'a pu être détectée contre la moisissure d'altération des denrées alimentaires et des aliments pour animaux *P. roqueforti* résistante aux conservateurs.

D'après la figure 1, le composé A a été identifié comme acide 3-phényllactique en comparant les données de RMN, ESI-MS et HPLC avec des données d'acide 3-phényllactique commercial. Le composé B a été identifié comme cyclo (Phe- Pro) en comparant les données de RMN, FAB-MS et HPLC avec données du cyclo commercial (L-Phe – L-Pro). La RMN et les données FAB-MS du composé C étaient en bon accord avec les données précédemment publiées sur le cyclo (L-Phe – trans-4-OH-L-Pro).

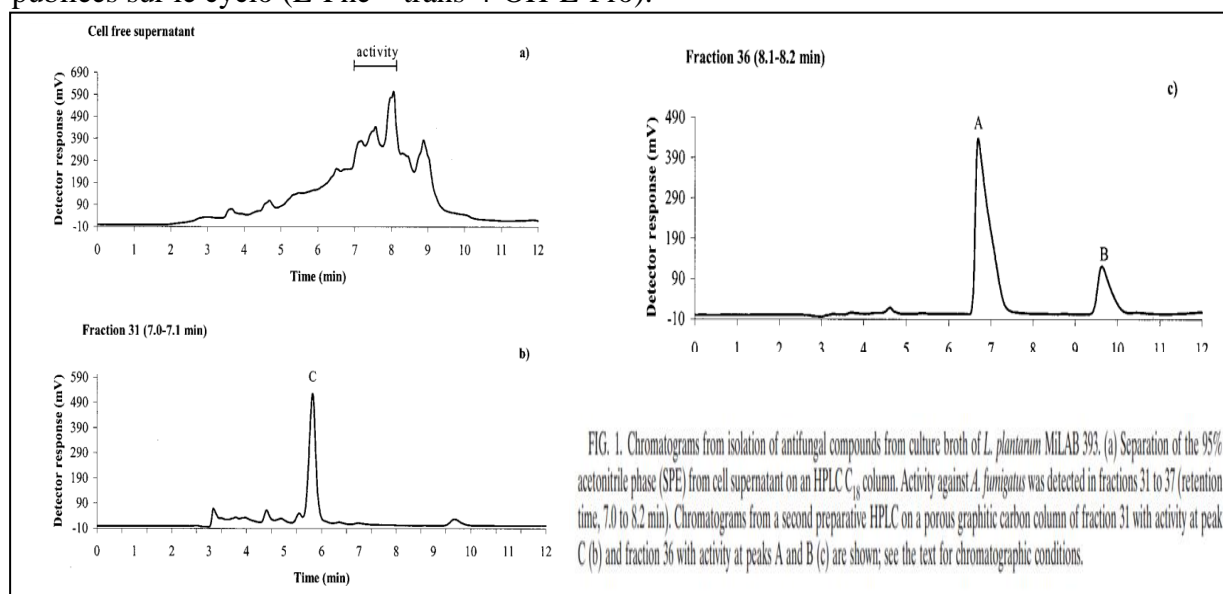


FIG. 1. Chromatograms from isolation of antifungal compounds from culture broth of *L. plantarum* MiLAB 393. (a) Separation of the 95% acetonitrile phase (SPE) from cell supernatant on an HPLC C_{18} column. Activity against *A. fumigatus* was detected in fractions 31 to 37 (retention time, 7.0 to 8.2 min). Chromatograms from a second preparative HPLC on a porous graphitic carbon column of fraction 31 with activity at peak C (b) and fraction 36 with activity at peaks A and B (c) are shown; see the text for chromatographic conditions.

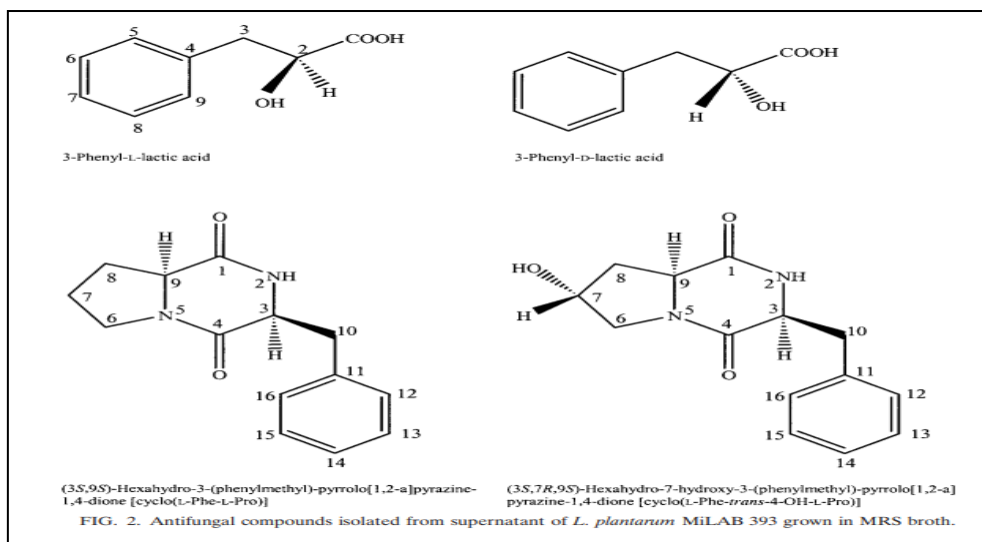


TABLE 2. GC analysis of amino acids constituting compounds B, cyclo(Phe-Pro), and C, cyclo(Phe-4-OH-Pro), isolated from *L. plantarum* MiLAB 393^a

Compound	Retention time (min)		
	Reference	Compound B	Compound C
D-Pro	10.12		
L-Pro	10.31	10.31	
<i>trans</i> -4-OH-D-Pro ^b	11.91		
<i>trans</i> -4-OH-L-Pro	12.11		12.15
<i>cis</i> -4-OH-D-Pro	14.46		
<i>cis</i> -4-OH-L-Pro	14.70		
D-Phe	20.33		
L-Phe	20.57	20.56	20.60

^a The cyclic dipeptides were hydrolyzed with 6M HCl and subsequently derivatized with 2-(S)-butanol and perfluoropropionic anhydride. The GC analysis was performed using a nonchiral GC column (see the text for details).

^b The amino acid *trans*-4-OH-D-Pro was not commercially available. To obtain a reference compound behaving identically on a nonchiral GC column, the enantiomeric compound *trans*-4-OH-L-Pro was derivatized with 2-(R)-butanol and perfluoropropionic anhydride.

IV.2.4. Conclusion

Les concentrations inhibitrices fongiques des composés antifongiques isolés dans ce travail sont élevées par rapport aux médicaments antifongiques, tels que l'amphotéricine B et la nikkomycine Z, qui inhibent la croissance fongique à des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre (4). L'activité antifongique des dipeptides cycliques isolés est très probablement un effet secondaire ; la principale raison de la production pourrait plutôt être liée à la détection du quorum ou à d'autres mécanismes inconnus. Néanmoins, l'activité antifongique de ces substances est très probablement d'une importance considérable pour l'activité inhibitrice fongique de la souche bactérienne MiLAB 393.

Une évaluation plus poussée du LAB pour ses propriétés antifongiques pourrait conduire à des systèmes de bio-préservation utiles, empêchant la détérioration fongique et la formation de mycotoxines dans les aliments pour animaux et les denrées alimentaires.

IV.3. Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf to Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth

DALIE D. K. D.,^{1*} A. M. DESCHAMPS,² V. ATANASOVA-PENICHON,¹
AND F. RICHARD-FORGET¹

Journal of Food Protection, Vol. 73, No. 6, 2010, Pages 1129–1137

Potential de *Pediococcus pentosaceus* (L006) isolé de Feuille du maïs pour supprimer la croissance fongique produisant de la fumonisine

IV.3.1. Objectifs de la recherche

- ✓ Isolement de bactéries lactiques à partir de divers tissus de maïs (épi, grain, feuille, racine et tige), et sélection de souche à activité antifongique.
- ✓ Caractérisation biochimique, physiologique et moléculaire de la souche lactique la plus pertinente.
- ✓ Production et caractérisation des métabolites antifongiques.

IV.3.2. Méthodologie

- ✓ Pour l'isolement des bactéries lactiques, une solution mère a été préparée à partir de 1 g d'échantillon de maïs et 5 ml du bouillon Mann Rogosa Sharpe (MRS), après incubation à 30 °C pendant 48 à 72 heures en anaérobiose, des boîtes de Petri contenant la gélose MRS ont étéensemencées et incubées à 30 °C pendant 48 à 72 heures en anaérobiose. 10 % de colonies de chaque boîte sont aléatoirement sélectionnées et ont été soumises à des tests de coloration de Gram et de catalase.
- ✓ Les souches lactiques sont testées pour leur activité antifongique contre les espèces fongiques suivantes : *F. proliferatum* INRA 58 et *F. verticillioides* INRA 62 selon la méthode de **Magnusson et al. (2003)**.
- ✓ Par la suite, la souche lactique montrant la plus forte activité antifongique a été identifier biochimiquement en utilisant le kit API 50 CHL et physiologiquement en testant sa croissance à différentes températures, différents pH et différentes concentrations en NaCl. En fin une identification moléculaire a été réalisée par amplification du gène 16S rRNA.
- ✓ Les métabolites antifongiques produits par la souche lactique ont été caractérisés en testant leur sensibilité à différentes températures, pH et enzymes protéolytiques.

IV.3.3. Résultats

D’après le tableau 2, presque la totalité des isolats lactiques ont présenté des activités antifongiques contre les deux souches fongiques. L’isolat L006 est très actif contre les deux espèces de *Fusarium* en même temps (figure 1).

TABLE 2. Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria isolates

Isolate	Antifungal activity against ^a :		Source
	<i>F. proliferatum</i> INRA 58	<i>F. verticillioides</i> INRA 62	
L001	+	+	Maize grain (rotten)
L002	-	-	Maize grain (rotten)
L003	+	+	Maize grain (rotten)
L004	+	+	Maize leaf (rotten)
L005	++	++	Maize leaf (rotten)
L006	+++	+++	Maize leaf (rotten)
L007	++	++	Maize ear (rotten)
L008	-	-	Maize stem (rotten)
L009	+	+	Maize leaf (rotten)
L010	-	-	Maize leaf (rotten)
L011	-	-	Maize leaf (rotten)
L012	+	+	Maize leaf (rotten)
L013	-	-	Maize leaf (2 mo old)
L014	+	+	Maize root (2 mo old)
L015	+	+	Maize root (1 mo old)
L016	+	+	Maize root (2 mo old)
L017	+	+	Maize root (2 mo old)
L018	+	+	Maize root (2 mo old)
L019	++	+	Maize leaf (2 mo old)
L020	+	+	Maize leaf (2 mo old)
L021	+	+	Maize stem (2 mo old)
L022	+	+	Maize stem (2 mo old)
L023	+	+	Maize root (2 mo old)
L024	+	+	Maize root (1 mo old)
L025	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L026	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L027	+	+	Maize leaf (1 mo old)
L028	+	+	Maize leaf (1 mo old)
L029	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L030	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L031	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L032	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L033	+	+	Maize grain (sound)
L034	++	+	Maize grain (sound)
L035	+	+	Maize grain (sound)
L036	-	+	Maize grain (sound)
L037	+	+	Maize grain (sound)
L038	++	+	Maize grain (sound)
L039	+++	+	Maize grain (sound)
L040	+	+	Maize grain (sound)
L041	+	+	Maize grain (sound)
L042	+	+	Maize grain (sound)
L043	++	+	Maize grain (sound)
L044	+	+	Maize grain (sound)
L045	+++	+	Maize grain (sound)
L046	+	+	Maize grain (sound)
L047	++	+++	Maize grain (sound)
L048	++	++	Maize grain (sound)
L049	+	+	Maize grain (sound)
L050	++	+	Maize grain (sound)
L051	+	+	Maize grain (sound)
L052	++	+	Maize grain (sound)
L053	+	+	Maize grain (sound)
L054	+	+	Maize ear (old)
L055	++	+	Maize ear (old)
L056	++	+	Maize ear (old)
L057	++	+	Maize ear (old)
L058	++	+	Maize ear (old)
L059	+	+	Maize ear (old)
L060	+	+	Maize root (old)
L061	++	+	Maize root (old)
L062	+	+	Maize root (old)
L063	-	-	Maize leaf (old)
L064	++	+	Maize leaf (old)
L065	++	+	Maize stem (old)
L067	+	+	Maize stem (old)

^a +, no fungal growth on 0.1 to 3% of the plate area per bacterial streak; -, no suppression of fungal growth; ++, no fungal growth on 3 to 8% of the plate area per bacterial streak; +++, no fungal growth on >8% of plate area per bacterial streak.

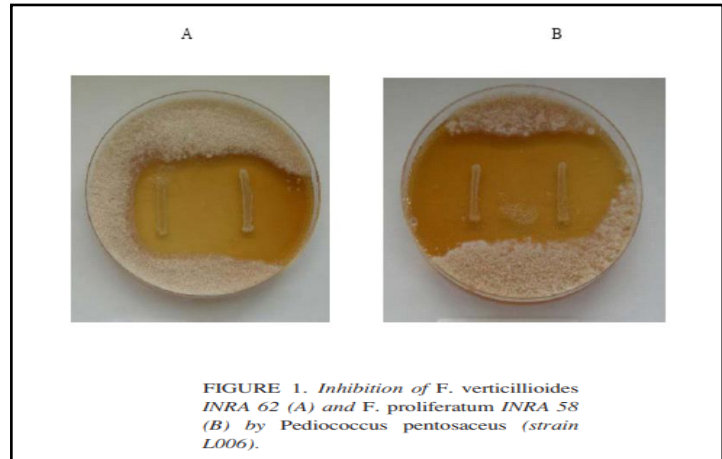


FIGURE 1. Inhibition of *F. verticillioides* INRA 62 (A) and *F. proliferatum* INRA 58 (B) by *Pediococcus pentosaceus* (strain L006).

TABLE 3. Physiological and biochemical characteristics of *P. pentosaceus* (strain L006)

Characteristic	Profile of the isolate (L006) ^a
Growth at:	
10°C	+
30°C	+
37°C	+
45°C	+
Growth in NaCl concn of:	
6.5%	+
18%	-
Growth at pH:	
4.4	+
9.6	+
Fermentation of:	
L-Arabinose	+
Ribose	+
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Rhamnose	+
N-Acetylglucosamine	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Trehalose	+
Gentiobiose	+
Tagalose	+
Gluconate	+

^a +, positive result; -, negative result.

L’identification réalisée par la corrélation de la base de données API (tableau 3) a indiqué que l’isolat (L006) pourrait être *P. pentosaceus*. L’analyse de la séquence du gène de l’ARNr 16S a confirmé une identité avec un ATCC de *P. pentosaceus*.

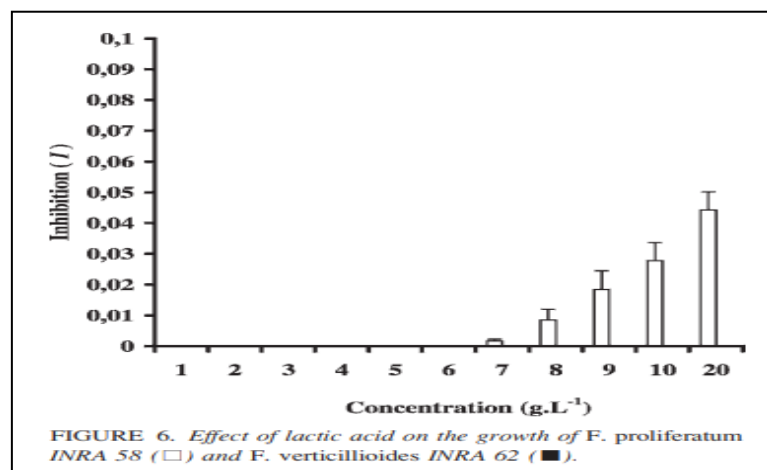
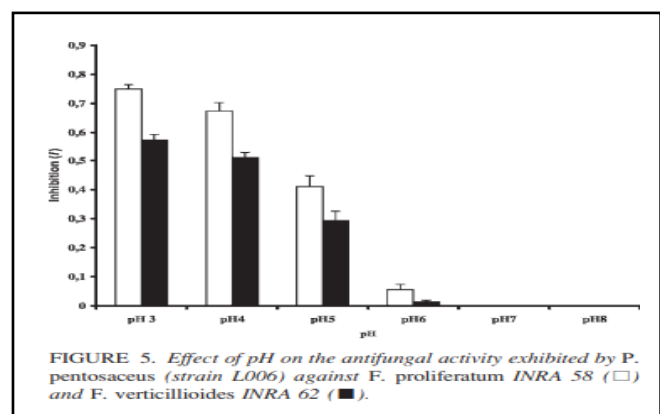
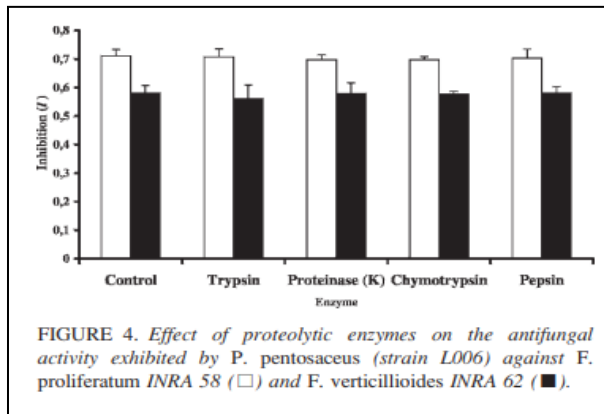
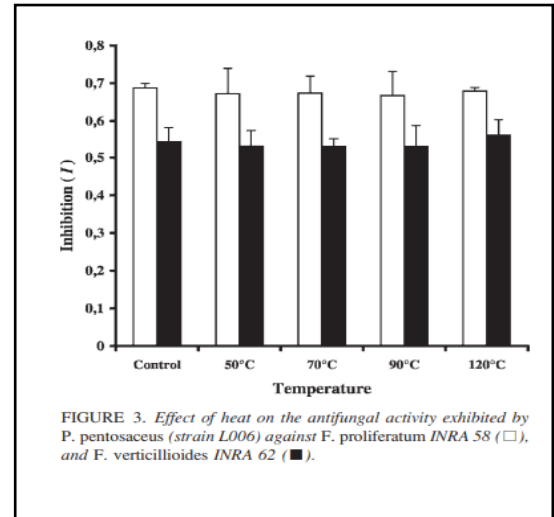
L’isolat L006 était aussi très actif contre un large panel de souches fongiques incluant cinq espèces de *F. proliferatum* et *F. verticillioides* (tableau 4). De plus la figure 2 montre qu’il existe une corrélation entre la croissance cellulaire, le pH et la production des métabolites antifongiques. Ces derniers gardent leur activité antifongique après traitement à 120 °C

pendant 20 minutes (figure 3). Comme le montre la figure 4, le traitement du surnageant avec certaines enzymes protéolytiques telles que la trypsine, la pepsine, l' α -chymotrypsine et la protéinase K, n'affecte pas son activité antifongique. Cependant, les résultats rapportés dans la figure 5 démontrent que l'activité antifongique du surnageant diminue lorsque le pH augmente, indiquant que l'efficacité de ces métabolites antifongiques dépend du pH.

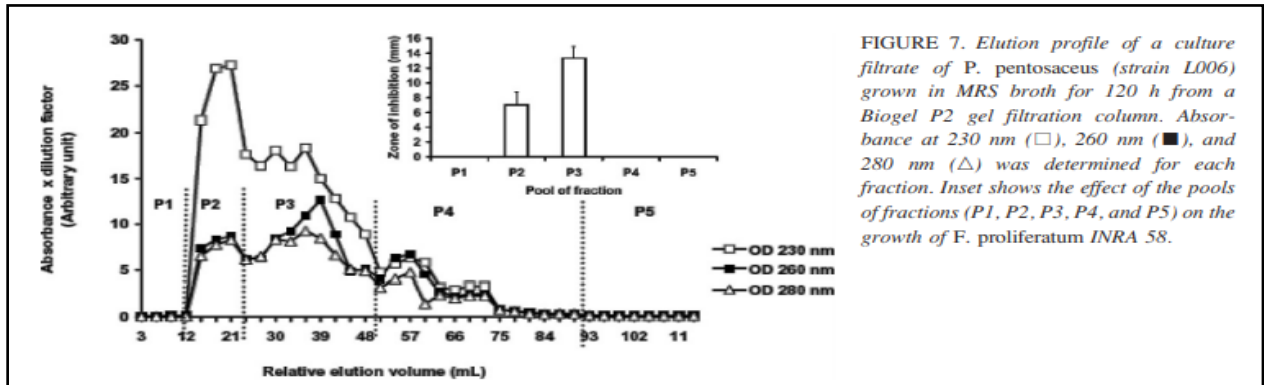
TABLE 4. Antifungal spectrum of *P. pentosaceus* (strain L006) as determined by the overlay technique

Species of <i>Fusarium</i>	Strain	Toxicigen potential (mg kg ⁻¹)	Inhibition by L006 ^a
<i>F. verticillioides</i>	INRA62	5,400	+++
	INRA 363	1,330	++
	INRA 369	1,830	++
	INRA 371	2,190	++
	INRA 368	2,670	++
	INRA 382	1,600	++
<i>F. proliferatum</i>	INRA 58	210	+++
	INRA 393	270	++
	INRA 424	1,140	++
	INRA 381	1,120	++
	INRA 367	2,700	++
	INRA 365	430	++

^a +++ , no fungal growth on >8% of plate area per bacterial streak; ++ , no fungal growth on 3 to 8% of the plate area per bacterial streak.



Une purification partielle des métabolites antifongique a été réalisée et les résultats sont montrés dans la figure 7.



IV.3.5. Conclusion

P. pentosaceus (souche L006) était capable d'exercer un fort antagonisme contre un large panel de souches ciblées, ce large spectre est un avantage significatif pour l'utiliser dans la lutte biologique pour inhiber la production de fumonisine. Cet isolat peut résister aux conditions de stress, car il peut croître à un pH extrême (4.4 et 9.6) et température (10 et 45°C), cela permet de l'utiliser dans des conditions pratiques pour contrôler la croissance des moisissures mycotoxinogènes.

La qualité sanitaire des produits alimentaires peut être menacée par toute une gamme de contaminants, incluant des toxines d'origine naturelle. Parmi celles-ci figurent les mycotoxines, responsables d'intoxications alimentaires, qui sont produites par des moisissures pathogènes.

Depuis ces dernières années, les méthodes de prévention utilisant l'antagonisme microbien sont en plein essor comme en témoignent les nombreuses publications parues chaque année sur ce sujet. En revanche, force est de souligner que ces méthodes sont encore dans la majorité des cas au stade expérimental. La prévention par les micro-organismes revêt deux aspects, elle peut se faire soit par utilisation directe des micro-organismes antagonistes, soit par application des produits finaux de leur métabolisme. L'utilisation de micro-organismes non pathogènes comme les bactéries lactiques, représente une solution efficace et saine.

Les bactéries lactiques, au statut généralement reconnu comme sûr (GRAS), sont appréhendées comme un choix approprié pour être utilisés comme conservateurs naturels pour contrôler la croissance fongique et la production de mycotoxines. Les espèces des bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites antifongiques tels que : les acides organiques, la reutérine, les dipeptides cycliques, les acides gras, le peroxyde d'hydrogène, l'acide phényllactique, le dioxyde de carbone et les bactériocines. Ces métabolites sont aptes à inhiber la croissance fongique. Le potentiel de nombreuses espèces lactiques à éviter la détérioration associée aux champignons a été exploité dans une variété de denrées alimentaires et aliments pour animaux. En effet, la bio-préservation en utilisant les bactéries lactiques est une alternative très prometteuse, ceci par l'efficacité d'action et l'omniprésence de ces agents antagonistes, leur diversité et leur persistance dans l'environnement.

Cette étude fournit les mises à jour les plus récentes sur l'intérêt des bactéries lactiques : leur innocuité que ce soit dans le domaine alimentaire ou sanitaire et leur capacité à servir l'activité antifongique et les substances anti-mycotoxiques, et ceci en vue de leur utilisation possible comme bio-conservateurs utiles dans l'industrie agro-alimentaire.

A

Abramson D., Demianyk C.J., Fields P.G., Jayas D.S., Mills J.T., Muir W.E., Timlick B. et White N.D.G. 2001. Protection des céréales, des oléagineux et des légumineuses à grains entreposés à la ferme contre les insectes, les acariens et les moisissures. Ed : Centre de recherche sur les céréales. p58.

Adeyeye S. A. O. 2016. Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food and Agriculture*. 2(1) :121-312.

Alaoui A.I., Guilal J., Hamama, A., Saidi B. et Zahar M. 2016. Identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle du sud du Maroc. *The International Journal of Multi-disciplinary Sciences*.1(1) :1-14.

Al kassaa I., Hamze M., Hober D., Chihib N. et Drider D. 2014. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in north Lebanon. *Microbiology and Ecology*. 67: 722–734.

Akaki D., Manizan M.A., Montet D., Brabet C., Koffi-nevry R. et Piro-Metayer I. 2018. Évaluation des pratiques culturelles de l'arachide favorisant la contamination par les aflatoxines dans trois régions de Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological Chemical Sciences*. 12(4): 1590-1600.

Aguirre M. et Collins M.D.1993. A Review : Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*. 75 :95-107.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E. et Chevallier I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 17: 454-461.

Arena M.P., Russo P., Capozzi P., Lopez P., Fiocco D. et Spano G. 2014. Probiotic abilities of riboflavin-overproducing *Lactobacillus* strains: a novel promising application of probiotics. *Applied Microbial Biotechnology*. 98:1-14.

Ashiq S. 2015. Natural occurrence of mycotoxins in food and feed: Pakistan perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(2): 159–175.

Axel C., Rocker B., Brosnan B., Zannini E., Furey A., Coffey A., et Arendt E. K. 2015. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiology*. 47 : 36–44.

Axelsson L. 2004. Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria : Microbiological and functional aspects. Salimen S., Wright A.V. et Ouwehand A. 3^{ème} Ed: New York, USA. 633: 1 - 66.

B

Badis A., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. 2005. Caractérisation phénotypique des Bactéries lactiques isolées à partir de lait de chèvre de deux populations locales "Arabia et Kabyle ». *Sciences Technologie*. 23 : 30-37.

Batich V.K., Lal R. et Grover S. 1990. Studies on environment and nutritional factors on production of antifungal substance by *Lactobacillus acidophilus* R. *Food Microbiology*. 7 : 199-206.

Bayrock et Ingledew W.M. 2004. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous cultures nutrient depletion and/or acid toxicity ?. *Journal industrial Microbiology and biotechnology*. 61 : 362-368.

Bennett J.W. et Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16: 497–516.

Berthiller F., Maragos C.M. et Dall'Asta C. 2015. Introduction to masked mycotoxins. In: Masked Mycotoxins in Food, Formation, Occurrence and Toxicological Relevance. ED The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1–12.

Björkroth J. et Holzapfel W. 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *The Prokaryotes*. 4: 267-319.

Björkroth J. et Holzapfel W. 2003. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Ed: Springer-Verlag, New York.

Blagojev N., Skrinjar M., Veskovc-Moracanin S., et Soso V. 2012. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters* . 17(3) : 7219–7226.

Black B.A., Sun C., Zhao Y.Y., Ganzle M.G., et Curtis J.M. 2013. Antifungal lipids produced by *Lactobacilli* and their structural identification by normal phase LC/Atmospheric pressure photonisation -MS /MS. *Journal of Agricultural food chemistry* . 61 : 5338-5346.

Blumenthal Z.C. 2004. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme

preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39 :214–228.

Bonestroo M.H., Dewit J.C., Kusters B.J.M. et Rombouts F.M. 1993. Inhibition of the growth of yeasts in fermented salads. *International Journal of Food Microbiology*. 17: 311–320.

Boudra H. 2002. La contamination par les moisissures et les mycotoxines des fourrages conservés signification et prévention. *Institut National de la Recherche Agronomique*. 53-70.

Bouras N., Guezlane-Tebibel N., Et Ould El Hadj M.D. 2016. Les Mycotoxines: Un Danger De Santé Public. *Algerian Journal of Arid Environment* .6(1) :32-49

Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. 1989. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Ed Lavoisier. Paris. 216-244.

Bottazzi V. 1988. An introduction to rod-shaped lactic bacteria. Ed Elsevier. 70 : 303-315.

Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles Importance industrielle. Ed : Masson. Paris. p512.

Bouzaid M., Chatoui R., Latrache H. et Hasib A. 2016. Activité antimicrobienne des souches de bactéries lactiques isolées de viande hachée de dromadaire et du lait cru de vache (maroc). *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. 10(1) : 1-12.

Brochard G. et Le Bacle C. 2009. Mycotoxine en milieu de travail. *Institut National de La Recherche Scientifique*. 299-307.

Bullerman L.B. 1977. Incidence and control of mycotoxin producing molds in domestic and imported cheeses. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*. 31 : 435–446.

C

Cabo M.L., A.F. Braber, P.M. Koenraad. 2002. Apparent Antifungal Activity Of Several Lactic Acid Bacteria Against *Penicillium Discolor* Is Due To Acetic Acid In The Medium. *Journal of Food Protection*. 65 :1309-1316.

Calmes B. 2011. Réponses adaptatives d'*Alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacées : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-Transférases. *Thèse de doctorat Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale Ecole Doctorale VENAM*. p14.

Cahagnier B. 1998. Moisissures des aliments peu hydratés. Ed Lavoisier, Paris. 222.

Cahagnier B. 1998. Céréales et produits dérivés. In : Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Bourgeois C. M., Mescle J.F. et Zucca J. Ed : Lavoisier, Paris. 392-414.

Castellano P., Belfiore C., Fadda S. et Vignolo G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*. 79. 483–499.

Champion R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences. Ed : *Quae*, France, 398p.

Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B. et Penn P. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation de biologie médicale*. 25 :36-68

Chabasse D., Pihet M. et Bouchara J.P. 2005. Les moisissures opportunistes : émergentes de nouveaux champignons pathogènes en médecine. *Revue générale*. 337 : 21-36.

Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T. et Villard J. 2005. Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicoses). *Revue Francophone des Laboratoires*. 373 :61-66.

Crowley S., Mahony J. et Van Sinderen D. 2012. Comparative analysis of two antifungal *Lactobacillus Plantarum* isolates and their application as bio-protectants in refrigerated foods. *Journal of Applied Microbiology*. 113 :1417-1427.

Crowley S., Mahony J. et Van Sinderen D. 2013. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*. 33.93-109.

D

Dal Bello F.D., Clarke C.I., Ryan L.A.M., Ulmer H., Schober T.J., Ström K., Sjogren J., Van Sinderen D., Schnurer J., et Arendt E.K. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Cereal Science*. 45 :309–318.

Dalie D., Pinson-Gadais L., Atanasova-Penichon V., Marchegay G., Barreau C., Deschamps A., et Richard-Forget F. 2012. Impact of *Pediococcus pentosaceus* strain L006 and its metabolites on fumonisin biosynthesis by *Fusarium verticillioides*. *Food Control*. 23(2) : 405–411.

Dalié, D.K.D., Deschamps A.M. et Richard-forget F. 2010. Lactic acid bacteria, potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*. 21: 370–380.

- Dang T.D.T., Vermeulen A., Ragaert P. et Devlieghere F. 2009. A peculiar stimulatory effect of acetic and lactic acid on growth and fermentative metabolism of *Zygosaccharomyces bailii*. *Food microbiology*. 26: 320-327.
- D'Enfert C. 1997. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 21: 163-172.
- Desmazeaud M. 1996. Les bactéries lactique dans l'alimentation humain :utilisation et inocuité. *Chahier Agricultures*. 43-331.
- Dhamale K. S., Sonawane P. D., Jaybhaye A.S. et Chand P. 2015. Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial activity and in vitro, in vivo studies of LAB activity on *Fusarium oxysporum* infected tomato seeds. *International Journal of Advanced Research*. 3(5): 954-963.
- Dix N.J. et Webste J.1995. Fungal Ecology. *Chapman Hall Lontion* ISBN. p183.
- Diakite A., Irie M.G.B., N'dri D.K. et Yapo J.A.2017. Détermination De La Contamination Par L'aflatoxine B1 De La Pâte D'arachide Consommée Par La Population En Côte D'ivoire : Intérêt De La Chromatographie Sur Couche Mince. *Internationnel Journal Biological Chemical Science*. 11(4): 1646-1654 .
- Dortu C., Huch M., Holzapfel W.H., Franz C.M.A.P. et Thonart P. 2008. Anti-Listerial Activity Of Bacteriocin-Producing *Lactobacillus curvatus* Cwbi-B28 And *Lactobacillus Sakei* Cwbi-B1365 On Raw Beef And Poultry Meat. *Letters In Applied Microbiology*, 47(6): 581–586.
- Dortu C. et Thonart P. 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie Agronomie Société Environnement*. 13(1) :143-154.
- Drider D., Fimland G., Héchard Y., Mc Mullen L.M. et Prevost H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.70 (2):564-582.
- Drouault S. et Corthier G. 2000. Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Institut National de la Recherche Agronomique*. 32 :101-117.
- Dufresne P. et St-Germain G. 2013. Identification des champignons d'importance médicale : Stage de laboratoire. Ed Laboratoire de Santé Publique du Québec. p57.

E

- El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S. et Ahokas J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*. 36(4) : 321–326.
- El-Nezami H., Kankaanpää P., Salminen S. et Ahokas J. 1998. Physicochemical alterations enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxin from contaminated media. *Journal of Food Protection*. 61(4):466–468.
- El-Nezami H., Mykkänen H., Kankaanpää H., Salminen S. et Ahokas J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*. 63 :549–552.
- El-Nezami H., Polychronaki N., Salminen S. et Mykkänen H. 2002. Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative α -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7) : 3545–3549.
- Eklund T., et Stratford M. 1989. Organic acid and esters. In : food Preservatives. Gould W. et Russel N.G. Ed Springer.48-84.

F

- Farber J.M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology: a review. *Journal of Food Protection*. 54: 58-70.
- Foshi C., Parolin C., Palomino R.A.N., Laghi L., Nardini P. et Cevevini R. 2016. *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. *Scientific Report*. 6 :1-10.
- Fimland G., Axelsson L., et Johansen L. 2000. A C-terminal disulfide bridge in pediocin-like bacteriocins renders bacteriocin activity less temperature dependent and is a major determinant of the antimicrobial spectrum. *Journal of Bacteriology*. 182 :2643- 2648.
- Filténborg O., Frisvad J.C. et Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33 : 85-102.
- Frazier W.C. 1967. Food microbiology. Ed : Academic presse. London. 3-429.

Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .55(23) :32-9727.

Fuchs S., Sontag G., Stidl R., Ehrlich V., Kundi M., et Knasmüller S. 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 46(4) :1398–1407.

Furet J.P., Tailliez P. et Quénéée P. 2004. Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 97 (2):197-207.

Furukawa T., et Sakuda S. 2019. Inhibition of aflatoxin production by paraquat and external superoxide dismutase in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 11(2) :107.

G

Gao F., Jiang L.P., Chen M., Geng C.Y., Yang G., Zhong L.F. et Liu X.F. 2013. Genotoxic effects induced by zearalenone in a humane embryonic kidney cell line. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 755(1): 6-10.

Gerez C. L., Torres M. J., Font de Valdez G., et Rollan G. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*. 64(3). 231–237.

Gerre P., Bailly J.D., Benard G. et Burgat V. 2000. Excrétion lactée des mycotoxines : quels risques pour le consommateur ?. *Ecole nationale vétérinaire de toulouse*. 151 : 7-22.

Ghanbari R., Aghaee E. M., Rezaie S., Khaniki G. J., Alimohammadi M., Soleimani M. et Noorbakhsh F. 2018. The inhibitory effect of lactic acid bacteria on aflatoxin production and expression of aflR gene in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Safety*, 38: 12-413.

Gilliand S.E. 1990. Health and nutrition benefices for lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 87:175-188.

Gomaa E. Z., Abdelall M. F. et El-Mahdy O.M. 2018. Detoxification of aflatoxin B1 by antifungal compound from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*, isolated from Dairy Products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10(2): 201–209.

Gomes A.M. et Malcata F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics .*Trend in Food Science Technology*. 10:139-157.

- Gomez J.V., Tarazona A., Mateo F., Jiménez M., Romera D., et Mateoa E.M. 2020. Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food control*. 118.
- Gomez-Torres N., Avila M., Gaya P. et Garde S. 2014. Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology*. 42: 82-88.
- Gould G.W. 2000. Preservation: Past présent and future. *Bertich Médical Bulletin*. 56: 84-96.
- Gourama H. 1997. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Food science and Technologie*. 30 (3) : 279–283.
- Gourama H., et Bullerman L. B. 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 34 :131–143.
- Guetarni H. 2013. Effets antibactériens des bactéries lactiques isolées à partir des laits crus Algériens sur la croissance de *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat. Université d’Oran Es Senia.p 276.
- Guillemette T. 2003. Contribution à l’étude du déterminisme moléculaire du pouvoir pathogène d’*Alternaria brassicae*, l’agent du black spot des crucifères. Thèse de doctorat. Université d’Angers. 195p.
- Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. Ed : Dunod, Paris. 7-330.
- Guiraud J.P. et Rose J.P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed. AFNOR, Saint-Denis-la-plaine, France. p300.
- Girardin H. 1997. Detection of filamentous fungi in foods. *Sciences des aliments*. 17 :3-19.

H

- Hammes W.P. et Vogel R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: The lactic acid bacteria the genera of lactic acid bacteria. Wood B.J.B. et Holzapfel X.H. London: Blakie. 19-54.
- Hammes W.P. et Hertel C. 2003. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. Ed: Springer Verlag, NewYork. p125
- Harbel S., Vahjen W., Wieler L. et Guenther S. 2013. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. *Gut pathogens*. 5(27): 1-13.
- Hassan Y. I., et Bullerman, L. B. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* spp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *International Journal of Food Microbiology*. 121 : 112–115.

Hassan A.N. et Frank J.F. 2001. Starter cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marth E.H. et Steele J.L. 2^{ème} Ed: New York. 151-205.

Hatab S., Yue T. et Mohamad O. 2012. Removal of patulin from apple juice using inactivated lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 112: 892–899.

Holzappel W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food control*. 8 : 241-258.

Holzappel W.H. et Wood B.J.B. 2014. Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy. USA. 250-500.

Hueza I.M., Raspantini P.C., Raspantini L.E., Latorre A.O. et Gorniak S.L. 2014. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. *Toxins*. 6(3): 95-1080.

I

International Agency for Research on Cancer (**IARC**). 1993. Evaluation of carcinogenic risks of chemical to humans. In: Some naturally occurring substances: Food Items and Constituents. Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC monographs, Lyon, France. 56: 359-362.

J

Jagadeesh K.S. 2015. Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. *South Indian Journal of Biological Sciences*. 1(2): 70-71.

K

Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N. et Fakini. 2013. Health Benefits of Probiotics: A Review. *Hindawi Publishing Corporation*. 2013: 1-7.

Klaenhammer, T. R. 1998. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. *International Dairy Journal*. 8 : 497–505.

Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 103-125.

Khalisanni K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*. 1(3) : 1-13.

Kheladi M. 2009. L'industrie agroalimentaire : Réalité, Enjeux et problèmes. *Recherches économiques et managériales*. 6 : 32-67.

Kiffer E. et Morelet M. 1997. Les deutéromycètes: Classification et clés d'identification génétique. *Ed : Quae*. p19.

Kim D.H., Lee C.S., Hyun W.J., Ko W.S., et Kim K.S. 2000. Fusarium fruit Rot of citrus in jeju. *Island Microbiology*.28(3) :158-162.

Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 103-125.

Kouakou P. et Thonart P. 2011. Action des cultures protectrices : cas des germes lactiques sur la flore alimentaire indésirable. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*.15(2): 339-348.

Kowalczyk M., Mayo B., Fernández M. et Aleksandrak P.T. 2015. Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of Omic Technologies. In: *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. Mozzi F., Raya R.R. et Vignolo G.M. 15-50.

Kupferschmidt K. 2012. Attack of the Clones. *Science magorg*. 337(6095) : 636-638.

L

Lairini S., Beqqali N., Bouslamti R., Belkhou R. et Zerrouq R. 2014. Isolement des bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels Marocains et formulation d'un lait fermenté proche du Kéfir. *Afrique Science*.10(4) : 267 – 277.

Laitila A., Alakomi H.L., Raaska L., Mittila-sandholm T., et Haikara A.2002. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* mould in vitro and in malting of barley. *Journal Applied of Microbiology*.63.566-576.

Lamassiaud P.S. 2009. La diarrhée aiguë. *Actualité pharmaceutique*. 483: 41-50.

Laref N., Guessas B., et Kihal M.2013. Antifungal compounds production in different temperatures ,PH and on modified MRS Agar by Lactobacillus Strains. *Journal of biological sciences*. 13(2):94-99.

Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A. et Gobetti M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compound from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4084–4090.

Lavermicocca P., Valerio F. et Visconti A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied of Environment Microbiology*. 69(1) :634–640.

Leahy S., Higgins D.G. et Fitzgerald G.F. 2005. A review Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*. 98:1303-1315.

Le Bars J. et Le Bars P. 1998. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing In: Mycotoxins in Food chain, Le Bars J. et Galtier P. *Revue Méditerranéenne Vétérinaire*. 149: 493-500.

Le Bars J. et Le Bars P. 2000. Mycotoxigenesis in grains applications to mycotoxic prevention in coffee. In: Coffee biotechnology and quality. Sera T., Soccol C.R., Pandey A. et Roussos S. Ed : Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 355-368.

Le Lay C., Coton E., Le Blay G., Chobert J.M., Haertlé T., et Choiset Y. 2016. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International of food Microbiology*.

Leyva S. M., Mounier J., Valence F., Coton M., Thierry A., Coton E. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation A review *Microorganisms* .5 :37.

M

Magnusson J., Strom K., Roos S., Sjogren J. et Schnurer J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 219:129–135.

Martaux P. et Seksik P. 2004. Place des probiotiques dans le prélèvement et le traitement des diarrhées poste-antibiotique. *Revue Française des laboratoires*. 368:73-76.

Matevosyan L., Bazukyan I. et Trchounian A. 2019. Antifungal and antibacterial effects of newly created lactic acid bacteria associations depending on cultivation media and duration of cultivation. *BioMed Central Microbiology*.19: 102. 6-8.

Mauch A., Dal Bello F., Coffey A., et Arendt E. K. 2010. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology*, 141:116–121.

Meyer A., Deiana J. et Bernard A. 2004. Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Ed : Doin. 115- 172.

- Milita NM, Mihaescu G, Chifiriuc C, 2010. Aflatoxins health risk factors. *Bacteriologia Virusologia Parazitologia Epidemiologia*. 55 : 19-24.
- Mitchell D., Parra R., Aldred D. et Magan N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 439-445.
- Michel M., Verscheure M., et Lognay G.2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnology Agronomy Society and Environement*. 6 (3) :131–142.
- Mocanu G.D. et Botez E. 2012. Milk and Dairy Products: Vectors to Create Probiotic Products. Ed : *Technology Licensing*. 237-250.
- Mozzi F. et Vignolo G.M. 2010. Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications. *Blackwell Publishing*. 54: 35-57.
- Munkvold G.P. 2017. *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology. Moretti A. et Susca A.Ed Humana Press, New York. 51–106.
- Milani J.M. 2013. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinary Medicine*. 58(8): 405–11.

N

- Ngang E.J., Yadang G., Kamdem., Kouebou P.C., Fanche Y.S., Kougan T.D et Etoa F.X .2015. Antifungal properties of selected lactic acid bacteria and application in the biological control of ochratoxin Aproducing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol science and technology*.25(3) :245-259.
- Niderkom V., Boudra H., et Margavi D.P. 2006.Binding og fusarium mycotoxins by fermentatives bacteria in vitro. *Journal of Applied Micobiology*.101(4) :849-856.
- Nigutova K. et Morovsky M., Pristas P., Teather R.M. Holo H., et Javorsky P. 2007. Production of enterolysin A by rumen Enterococcus faecalis strain and occurrence of enlA homologues among ruminal Gram+ cocci. *Journal Applied of Microbiology*. 102(2) :563-569.
- Niku-Paavola M.-L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., et Haikara A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 86 :29–35.

Nilsen T., F. Nes I. et Holo H. 2003. Enterolysin A, a Cell Wall-Degrading Bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Applied And Environmental Microbiology*.69(5) :2975–2984.

O

Ogier J.C., Casalta E., Farrokh C. et Saïhi A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126-286.

Olonisakin OO, Jeff-Agboola YA, Ogidi CO., et Akinyele BJ.2017. Isolation of antifungal lactic acid bacteria (LAB) from “Kunu” against toxigenic *Aspergillus flavus*. *Preventive Nutrition and Food Science*. 22(2) :138-143.

P

Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A. et Daeseleire E. 2010. Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an UHPLC-MS/MS multi-mycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Springer*. 1-11.

Piard J., et Desmazeaud M.1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Dairy science and technology*.72(2) :113-142.

Pitt J.I. 2000. Toxigenic fungi: which are important?. *Medical Mycology Suppl*. 38: 17-22.

Pitt J.I. et Hocking A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2^{ème}Ed. Blackie Academic and Professional, London.p 503.

Pot B. 2008. The taxonomy of lactic acid bacteria. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Corrieu G. et Luquet F.M. Ed : Lavoisier. Paris.1-106.

Puel O., Galtier P. et Oswald I.P. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. 2 (4): 613–631.

Pot B., Devriese L.A., Uris D., Vandamme P., Haesebrouck F. et Eterkersters K. 1996. Phenotypic identification and differentiation of *Lactococcus* strains isolated from animals system. *Applied Microbiology*. 19: 213-222.

Q

Quattrini M., Liang N., Fortina M. G., Xiang S., Curtis J. M. et Ganzle M. 2018. Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology*. 302: 8–14.

Quiberoni A., Rezaiki L., El Karoui M., Biswas I., Tailliez P. et Gruss A. 2001. Distinctive features of homologous recombination in an « old » microorganism, *Lactococcus lactis*. *Research Microbiology*. 152: 131-139.

R

Raman R.P., Dach G., Prasad P.K., Marappan M. et Pradeep M.A. 2016. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a water additive on host associated microflora, growth, feed efficiency and immune response of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). *Aquaculture Research*. 47(3): 1-15.

Rautenbach M, Troskie AM, Vosloo JA. 2016. Antifungal peptide : to be or not to be membrane active. *Biochimie*. 130 :132-145.

Raven P., Johnson G.B., Losos J. et Singer S. 2007. Ed Biologie de Boeck. Bruxelles. 626p.

Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L. 2010. Pollution atmosphérique, moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées. *Revue française d'Allergologie*. 50 : 611–620.

Reboux G. 2008. Micro-organismes environnementaux en milieu agricole. *Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU de Besançon*. 10-20

Reboux G. 2006. Mycotoxines : effet sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*. 46 : 208 – 212.

Rebuffet S. 2011. Bacteriocins from Gram-Negative Bacteria: A Classification?. In Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications. Springer Science, Business Media. 55-69.

Reddy K.R.N., Salleh B., Saad B., Abbas HK., Abel CA. et Shier W.T. 2010. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*. 29(1): 3–26.

Reverberi M., Ricelli A., Zialic S., Fabbri A.A., Fanelli C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Applied Microbiology Biotechnology* .87 :899–911.

Rhee K.H. 2004. Cyclic dipeptides exhibit synergistic, broad spectrum antimicrobial effects and have anti-mutagenic properties. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24 : 423–427.

Richard C. et al., 2006. Evidence on correlation between number of disulfide bridge and toxicity of class IIa bacteriocins. *Food of Microbiology*. 23(2) :175-183.

Rouse S., Harnett D., Vanglans A., Van Sinderen D. 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*. 104 :915-923.

Russo P., Arena M. P., Fiocco D., Capozzi V., Drider D., et Spano G. 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247 :48–54.

Ruppol P., Delfosse Ph., Hornick J.L. 2004. La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annale de Médecine Vétérinaire*. 148 :141-146.

S

Sadiq F.A., Yan B., Tian F., Zhao Jn., Zhang H. et Chen W. 2019. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18 (5): 1403-1436.

Sadeghi A., Ebrahimi M., Mortazavi S. A., et Abedfar, A. 2019. Application of the selected antifungal LAB isolate as a protective starter culture in pan whole-wheat sourdough bread. *Food Control*. 95: 298–307.

Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L. et Benno Y. 2004. Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salimen S., Von Wright A. et Ouwerhand A. Ed: Newyork Dekker M. 515-530.

Sanchis V. et Magan N. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. Mycotoxins in food. Detection and control. A volume in Wood head Publishing Series in *Food Science , Technology and Nutrition*. 174-189.

- Sathe S.J., Nawani N.N., Dhekephalker P.K., et Kapadnis P.B. 2007. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal Applied of Microbiology*. 103 :2622-2628.
- Sautour M., Mansur C.S., Divies C., Bensoussan M. et Dantigny P. 2002. Comparison of the effects of temperature and water activity on growth rate of food spoilage moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28: 311-316.
- Savadogo A., Taale E., Zongo C., Tosoba F., Karou D.S., Traore A. 2016. Les peptides antimicrobiens d'origine microbienne: cas des bactériocines. *Journal international of food biological and chemical sciences*. 10(1):384-399.
- Sazawal S., Hiremath G., Dhingra U., Malik P., Deb S. et Black R. 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases*. 6: 82-374.
- Schillinger U., Geisen R. et Holzapfel W.H. 1996. Potential of antagonistic microorganism and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science Technology*. 71: 158-164.
- Schleifer K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 46: 201-203
- Schnurer J. et Magnusson J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trend in Food Science and Technology*. 16: 70-78.
- Siedler S., Balti R. et Neves A.R. 2019. Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*. 56: 138-146.
- Singh V.P. 2018. Recent approaches in food bio-preservation: a review. *Open Veterinary Journal*. 8(1):104.
- Sevgi E., et Ignatova I.T. 2014. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria, Isolated from Bulgarian Wheat and Rye Flour. *Journal of Life Sciences*. 9 : 1-6.
- Sjögren J., Magnusson A., Broberg J., Schnurer J. et Kenne L. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* milab 14. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 7554-7557.

Simmons E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: *Alternaria: Biology, Plant Diseases, and Metabolites*. Chelkowski J. et visconti A. Ed: Elsevier. Amsterdam. 1-35.

Stiles J., Penkar S., Plockova N., Chumchalova J. et Bullerman L.B. 2002. Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Food Protection*. 65: 1188–1191

Stiles M. et Holzapfel W. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.

Stiles M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70 : 331–345.

Stroöm K., Sjögren J., Broberg A. et Schnürer J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4- OH-L-Pro) and phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 4322–4327.

Stroöm, K. S., Schnürer, J., and Melin, P. 2005. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *Journal of the Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letter*. 246 :119–124.

Sun Zh., Yu J., Dan T., Zhang W. et Zhang H. 2014. Phylogenesis and evolution of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: fundamentals and practice*. Ed: Springer. 1-78.

Schwenninger SM., Lacroix C., Truttmann S., Jans C., Sporlndli C., Bigler L., et Meile L. 2008. Characterization of low-molecular-weight antiyeast metabolites produced by a food-protective *Lactobacillus-Propionibacterium* coculture. *Journal of Food Protection*. 71(12):2481-2487.

T

Tabuc C. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse et de l'Université de Bucarest. 11-16.

Tailliez P. 2001. Mini-revue : les bactéries lactiques ces êtres vivant apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Le lait*, INRA Edition. 81 (1-2) :1-11.

Thomma B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*. 4: 225–236.

Thonart P., compos D., Destain J., Dubois D.R., et Aguilar G.A. 2012. Les entérocoques : avantages et inconvénients en biotechnologie (synthèse bibliographique). *Biotechnology. Agronomic Society and Environnement*.16(1) : 67-76.

Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. 2003. Le métabolisme microbien. *Introduction à la Microbiologie*. 7 : 378-400.

V

Valirio F., Di Biase M., Lattanzio M.T.V. et Lavermicocca P. 2016. Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenyl pyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 222: 1-7

Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M. et Visconti A. 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 233 :289–295.

Visagie C.M., Houbraken J., Frisvad J.C., Hong S.B., Klaassen C.H.W., Perrone G., Seifert K.A., Varga J., Yaguchi T. et Samson R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycologie*. 78: 343- 371.

W

Wallace T. D., Bradley S., Buckley N. D. et Green-Jonhson J. H. 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: Effects on cytokine production. *Journal of Food Protection*. 66 (3): 466-472.

Wang H., Yan Y., Wang J., Zhang H. et Qi W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *Public Labrary Of Science*. 7(1): 1-7

Williams J.P., Geladi P. et Manly M. 2012. Growth characteristics of three *Fusarium* species evaluated by near-infrared hyperspectral imaging and multivariate image analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 96: 803-813.

White D., 2016. Chemical diversity of a wild population of *Myrciaovata Cambessedes* and antifungal activity against *Fusarium solani*. *Industial Crops and Products*. 86: 196-209.

Y

- Yao A.A., M. Egounlety L.P., Kouam, P. et Thonard P. 2009. Les bactéries lactiques dans les aliments ou les boissons amylicées de l'Afrique de l'Ouest : leur utilisation actuelle. *Annales de médecine vétérinaire* .153 : 54-65.
- Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*. 2 :1-12.
- Yateem A.A., Balba M.T., Al-Surrayai T., Al-Mutairi B. et Al-Daher R. 2008. Isolation of acid lactic bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Science* .3: 194-199.
- Yiannikouris A. et Jouany J.P. 2002. Mycotoxins in feeds for ruminants ; fate and effects on animals. *Institut National de la Recherche Agronomique*. 15: 3-16.
- Zain M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 15(2): 129-144.
- Zhang H. et Cai Y. 2014. Lactic acid bacteria fundamentals and practice. Ed :Springer Dordrecht Heidelberg. New York London. 536.
- Zhang H., Chen W., Faizan A.S., Yan B., Zhao J. et Tian F. 2019. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A Comprehensive Review. *Food Sciences and Food Safety*.18: 1403-1420.



Annexe

Short communication

Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture

Yousef I. Hassan, Lloyd B. Bullerman *

Food Science and Technology Department, University of Nebraska-Lincoln, 349 Food Industry Complex, Lincoln, Nebraska 68583-0919, USA

Received 30 October 2006; received in revised form 24 August 2007; accepted 2 November 2007

Abstract

Lactic acid bacteria were isolated from four different sourdough bread cultures previously investigated for antifungal activity. A total of 116 isolates were obtained and screened for antifungal activity against a battery of molds. The most inhibitory isolate obtained was identified by API 50 CHL and 16s ribosomal RNA genotyping and found to be *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans*. This isolate completely inhibited the growth of *Fusarium proliferatum* M 5689, M 5991 and *Fusarium graminearum* R 4053 compared to controls in a dual agar plate assay.
© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sourdough starters; Antifungal activity; *Lactobacillus paracasei*; *Fusarium* species

1. Introduction

Sourdough starter cultures have been shown to contain lactic acid bacteria (LAB) that can inhibit the growth of certain molds (Corsetti et al., 1998; Magnusson and Schnurer, 2001; Roy et al., 1996). The active microorganisms in sourdoughs that are apparently responsible for this effect are believed to be different species of *Lactobacillus* genus such as *L. plantarum*, *L. sanfranciscus*, *L. rhamnosus* and *L. paracasei* (Meroth et al., 2003). Isolates of these species produce combinations of lactic acid, acetic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins and other low molecular weight compounds that can delay mold growth (Batish et al., 1997).

Lavermicocca, Valerio, Evidente, Lazzaroni, Corsetti and Gobbetti (2000) isolated strains from sourdough that showed strong antifungal activity by conidial germination assay. A 10-fold-concentrated culture filtrate of *Lactobacillus plantarum* grown in wheat flour hydrolysate almost completely inhibited *Eurotium repens*, *Eurotium rubrum*, *Penicillium corylophilum*, *P. roqueforti*, *P. expansum*, *Endomyces fibuliger*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*,

Monilia sitophila and *Fusarium graminearum*. Further study revealed that the cultures were producing the novel antifungal compounds phenyllactic and 4-hydroxy-phenyllactic acids. In a different study Lavermicocca, Valerio and Visconti (2003) reported that phenyllactic acid (PLA) was found in the supernatant of all cultures of *Lactobacillus plantarum* which showed antifungal activity. Less than 7.5 mg of PLA per ml was required to obtain 90% inhibition of mold growth.

Magnusson and Schnurer (2001) studied the antifungal activity of *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*, and found that this strain had strong inhibitory activity in dual agar plate assays against *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Talaromyces flavus*, *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, and *F. sporotrichoides*. The activity was stable during heating with a maximum effect at pH 3–4.5. Notably, the activity was irreversibly lost after treating the supernatant with proteolytic enzymes (proteinase K, trypsin, and pepsin). Further purification revealed that the antifungal agents were cyclo (L-Phe–L-Pro), cyclo (L-Phe–trans-4-OH–L-Pro) and 3-phenyllactic acid. In a different study, combining these three compounds together produced a very weak synergistic effect (Strom et al., 2002).

Preliminary studies in our laboratory have showed that four different sourdough bread cultures had the ability to inhibit mold growth (Bullerman et al., 2006). The objective of this study was

* Corresponding author. Tel: +1 402 472 2801; fax: +1 402 472 1693.
E-mail address: lbullerman1@unl.edu (L.B. Bullerman).

to further examine isolates of LAB from those four sourdough bread cultures and select the most inhibitory isolate for further study on preventing mold growth, especially of those species known to produce mycotoxins.

2. Materials and methods

2.1. Cultures and isolates

Four sourdough cultures were studied as sources of lactic acid bacteria. Sourdough starters were rejuvenated by adding water and wheat flour (50 ml: 50 g) followed by incubation at 35 °C for 18 hr. Commercial deMann Rogosa Sharpe (MRS) and laboratory prepared sourdough bacteria (SDB) agar (Kline and Sugihara, 1971) plates containing 0.004 g/l cyclohexamide were used to support the growth of LAB during isolation. Gram positive, catalase negative isolates were selected and stored in freezer at –20 °C in MRS broth supplemented with 20% glycerol. Potato Dextrose Agar (PDA) slants were used to support the production of spores of all fungi tested except for *Fusarium* species where Carnation Leaf Agar (CLA) slants were used to support sporulation. After growing molds at room temperature (23–25 °C) for 7–10 days, spores were harvested from slants in Tween 80 (0.025%) to prepare inoculum containing 1×10^4 spores/ml for every mold except *Fusarium*, where the heaviest spore suspension possible (c. a. 1×10^6 spores/ml) was obtained. This heavier spore suspension of *Fusarium* spp. was required to form a uniform lawn of mold growth around the bacterial colonies being screened for antifungal activity.

2.2. Initial screening of bacteria for antifungal activity

Reactivated bacterial isolates, grown in 10 ml of MRS or SDB at 35 °C overnight, were tested for their antifungal activity against *Penicillium expansum* NRRL 2304 as an initial screening step. *Penicillium expansum* was selected because of its sensitivity, slow growing characteristics making it suitable for detecting any antifungal activity. The method of Cabo, Braber and Koenraad (2002) was followed with a minor modification. The plates were dried overnight (or for 3 h in a 35 °C incubator) before inoculating with the LAB. A total of 5 µl of each LAB isolate were added as discrete spots on MRS or SDB plates in triplicate. The inoculated plates then were incubated for 24 h at 35 °C in an inverted position. Then plates that contained well grown LAB colonies were overlaid with c. a. 10 ml of soft PDA (0.8% agar) containing a final mold spore concentration of 1×10^4 spores/ml and incubated at room temperature (c. a. 23–25 °C). The incubation period lasted up to 3–4 days and zones of inhibition around the LAB spots were recorded on the third day. These data were used to make the initial selection of LAB isolates.

2.3. Screening the most inhibitory isolates against a battery of molds

The following molds were used in this step: *Aspergillus flavus* NRRL 1290, *A. candidus* C 25, *A. niger* NRRL 326,

A. parasiticus NRRL 2999, *Penicillium crustosum* NRRL 969, *P. expansum* NRRL 2304, *P. roqueforti* NRRL 849 (all obtained from the culture collection of the NRRC, USDA, Peoria, IL), *F. graminearum* R 4053 and *Fusarium proliferatum* M 5991 and M 5689 (obtained from the *Fusarium* Research Center, Pennsylvania State University, University Park, PA.).

The method of Cabo, Braber and Koenraad (2002) as previously described was used to test the antifungal activity of the most inhibitory LAB isolates against this battery of mycotoxigenic and food spoilage molds. These molds were selected because of their prevalence or common occurrence and ability to produce mycotoxins. Data were recorded daily beginning with the second day of incubation, according to the following scale: (–) no inhibition, (+) spore formation delayed but no clear zone, (++) spore formation delayed with a small clear zone around the colony, (+++) spore formation delayed with good clear zone around the colony, (++++ extensive inhibition of spore formation and mycelial growth with definite clear zones around colonies.

2.4. Inhibition of mold growth

Dual agar plate assay was used to study the antifungal effect of the LAB isolates on the growth of *F. proliferatum* and *F. graminearum*. The dual agar plate assay consisted of two different agar layers, one employed to support the growth of LAB isolates and one the growth of molds. LAB were grown overnight in MRS broth and 100 µl of actively growing culture was mixed with 10 ml of commercial MRS agar in the bottom of a Petri plate. After solidification, the MRS agar was incubated for 24 h at 35 °C and then overlaid with Potato Dextrose agar (PDA) made with 0.8% (w/w) agar, which was allowed to solidify. 5 µl of mold spores suspension was inoculated as a discrete spot onto the center of the surface of the PDA agar layer in each plate. Plates were incubated aerobically in an upright position up to 9 days at 25 °C. Diameters of the growing mold colonies were measured daily and used to plot growth curves. The experiment was repeated three times.

2.5. Identification of bacterial isolates

The most inhibitory LAB isolates were identified using an API 50 CHL kit (Biomérieux, France). The isolates were matched to species level through carbohydrate fermentation patterns.

2.6. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting

RAPD fingerprinting was conducted according to Ward and Timmins (1999). DNA was extracted from cultures grown overnight using High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Molecular Bio-chemicals, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions. Lysozyme (10 mg/ml) and mutanolysin (1000 u/ml) were added as lysing enzymes and the mixture was incubated at 37 °C for 60 min. The PCR amplification was conducted using "5'-CAGCACCCAC-3'" short primer. The reaction mix (50 µl) contained 100 pmol of primer, 0.2 mM dNTPs, 3.5 mM MgCl₂, reaction buffer, 1.5 U of *Taq*

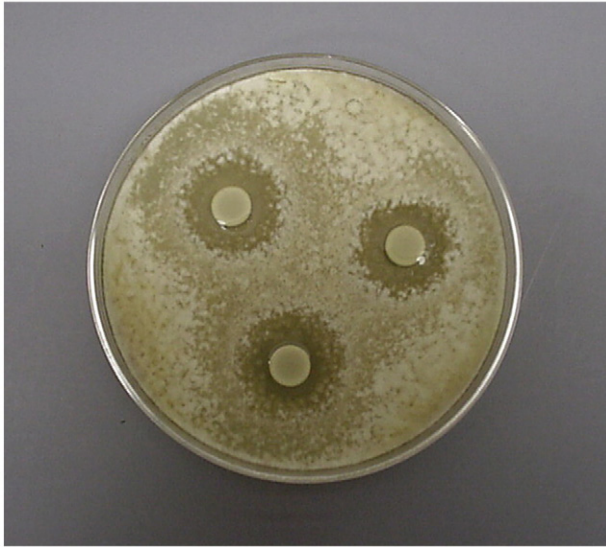


Fig. 1. Halos (clear zones) of inhibition of growth of *Penicillium expansum* formed around colonies of lactic acid bacteria (LAB) on MRS agar.

polymerase, and 1 μ l of DNA solution. The thermo-cycling program was: 1 cycle 94 °C for 3 min, 45 °C for 45 s, 72 °C for 1 min; 30 cycles of 94 °C for 45 s, 45 °C for 45 s, 72 °C for 1 min; 1 cycle of 94 °C for 45 s, 45 °C for 45 s, and 72 °C for 5 min. The final PCR products were separated on (1.0 %) agarose gels with a 100 bp DNA ladder (New England Biolabs).

2.7. 16s ribosomal RNA (rRNA) identification

The 16s ribosomal RNA (rRNA) identification was conducted in Midi Labs (125 Sandy Dr., Newark, DE 19713).

3. Results and discussion

A total of 116 lactic acid bacteria isolates were obtained from the four sourdough starter cultures. Of these, two isolates showed promising antifungal activity after initial screening using *P. expansum* and were selected for further study. This selection was based on the diameter of the “halo” or inhibitory zone formed around the LAB colony growing on MRS agar (Fig. 1). A larger zone of inhibition of spore formation was also observed

Table 1
Bacterial isolates from sourdough cultures found to be most inhibitory to *Penicillium expansum*

Strain	Average diameters of colonies and clear zones formed (mm)
L-1	23.3 ^a
L-17	24 ^a
T-8	14.5
T-18	14.5
B-13	16.5
B-15	17.5
A-3	14.7
A-4	13.3
A-5	14.5

^a Selected for further study.

Table 2

Inhibition of growth and sporulation of several molds by lactic acid bacterial isolates L1 and L17

Mold	Inhibition by L1	Inhibition by L 17
<i>A. flavus</i> NRRL 1290	–	–
<i>A. candidus</i> C 25	++	++
<i>A. niger</i> NRRL 326	–	–
<i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	–	–
<i>P. crustosum</i> NRRL 969	+++	+++
<i>P. roqueforti</i> NRRL 849	+	+
<i>Fusarium proliferatum</i> M 5991	++++	++++
<i>F. proliferatum</i> M 5689	++++	++++
<i>F. graminearum</i> R 4053	++++	++++

The following scale was used: (–) no inhibition, (+) delay of spore formation, (++) delay of spore formation with small clear zone of inhibition around the bacterial colony, (+++) delay of spore formation with good clear zone of inhibition around the bacterial colony, (++++) a very good inhibition of mycelial growth and sporulation with large clear zones around bacterial colonies.

around the clear zone and was likewise recorded and used as the basis for selection. These two isolates belonged to the same single sourdough starter culture and behaved similarly in their pattern of antifungal activity. During screening, MRS agar was found to be the best medium for supporting growth of the LAB for screening of antifungal activity compared to sourdough bacteria agar (SD) which was not suitable for this purpose. Table 1 shows the LAB isolates that were the most inhibitory to *P. expansum*.

Testing the spectrum of antifungal activity of these two LAB isolates against species of three mold genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, representing both toxigenic and deteriorative fungi showed a strong activity against all *Fusarium* species, followed by *Penicillium* species to a lesser degree. *Aspergillus* species were most resistant to the antifungal activity and were the most difficult to inhibit (Table 2). In the dual layer method, the ability of these isolates to inhibit growth of *Fusarium* species was demonstrated. Fig. 2 shows complete inhibition of *F. proliferatum* M5689 in the presence of the *L. paracasei* ssp. *tolerans*.

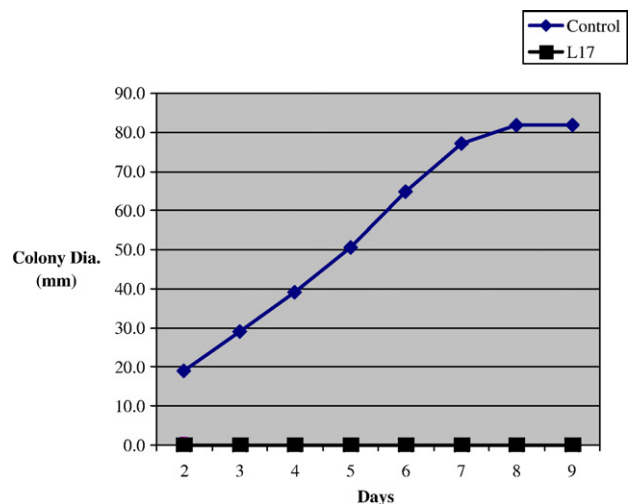


Fig. 2. Inhibition of *F. proliferatum* M5689 by *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* L17 in a dual layer system.

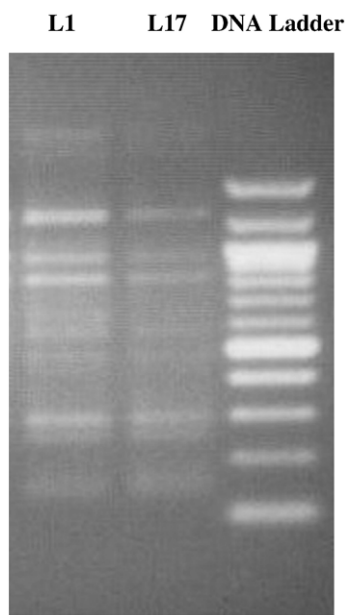


Fig. 3. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting of LAB isolates L1 and L17 using RP primer “5'-CAGCACCCAC-3'”.

Only a few papers from scientific literature cite a wide spectrum antifungal activity for lactic acid bacteria isolates (Strom et al., 2002; Lavermicocca et al., 2000). The rest suggest a more strain specific antifungal activity against species of one or two major mold genera (Okkers et al., 1999; Niku-Paavola et al., 1999; Florianowicz, 2001; Gourama and Bullerman, 1997). Our results show that *L. paracasei* ssp. *tolerans* was able to inhibit closely related mold species in the same genus to a similar degree.

API identification matched the two isolates to *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Further, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) typing generated similar DNA patterns and confirmed that both isolates originated from a single strain and that the same strain was isolated twice (Fig. 3). 16s ribosomal RNA (rRNA) identification revealed that the isolate belonged to the *L. paracasei* species and it's closely related to *L. paracasei* ssp. *tolerans* rather than *L. paracasei* ssp. *paracasei*. The ability of this strain to suppress growth of *Fusarium* species could possibly give a unique approach to overcome the growth of contaminating *Fusarium* species during malting process. The co-existence of both *L. paracasei* ssp. *tolerans* and *F. graminearum* might result in the inhibition of growth of *F. graminearum* and/or production of any mycotoxins or gush inducing factors (Lowe and Arendt, 2004). More experiments are being conducted in our lab to elucidate the mechanism of the reported antifungal activity and any practical use of the reported isolate as a bio-control agent.

Acknowledgement

Authors would like to acknowledge America-Mideast Educational and Training Services (AMIDEAST) for the financial

support granted to the first author to carry out this study as a part of the Fulbright Foreign Student Program.

References

- Batish, V.K., Roy, U., Lal, R., Grover, S., 1997. Antifungal attributes of lactic acid bacteria — a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 17, 209–225.
- Bullerman, L.B., Giesova, M., Hassan, Y., Deibert, D., Ryu, D., 2006. Antifungal activity of sourdough bread cultures. In: Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U. (Eds.), *Advances in Food Mycology*, 571. Springer science and business media, New York, pp. 307–316. NY 10013.
- Cabo, M.L., Braber, A., Koenraad, M.F.J.P., 2002. Antifungal activity of several lactic acid bacteria: the role of acetic acid. *Journal of Food Protection* 65, 1309–1316.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P., 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50, 253–256.
- Florianowicz, T., 2001. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *European Food Research and Technology* 212, 282–286.
- Gourama, H., Bullerman, L.B., 1997. Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *International journal of Food Microbiology* 34, 131–143.
- Kline, L., Sugihara, T.F., 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Applied Microbiology* 21, 459–465.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A., 2003. Antifungal activity of phenyl-lactic acid against molds isolated from bakery products. *Applied Environmental Microbiology* 69, 634–640.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M., 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4084–4090.
- Lowe, D., Arendt, E., 2004. The use and effect of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 163–180.
- Magnusson, J., Schnurer, J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1–5.
- Meroth, B., Walter, J., Hertel, C., Brandt, M., 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 475–482.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T., Haikara, A., 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology* 86, 29–35.
- Okkers, D.J., Silvester, L.M.T., Joubert, M., Odendaal, H.J., 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 726–734.
- Roy, U., Batish, V.K., Grover, S., Neelakantan, S., 1996. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *Food Microbiology* 32, 27–34.
- Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A., Schnurer, J., 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied Environmental Microbiology* 68, 4322–4327.
- Ward, L.J., Timmins, M.J., 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in applied microbiology* 29, 90–92.

Lactobacillus plantarum MiLAB 393 Produces the Antifungal Cyclic Dipeptides Cyclo(L-Phe–L-Pro) and Cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-Phenyllactic Acid

Katrin Ström,^{1*} Jörgen Sjögren,² Anders Broberg,² and Johan Schnürer¹

Departments of Microbiology¹ and Chemistry,² Swedish University of Agricultural Sciences, SE-750 07 Uppsala, Sweden

Received 16 January 2002/Accepted 26 June 2002

We have isolated a *Lactobacillus plantarum* strain (MiLAB 393) from grass silage that produces broad-spectrum antifungal compounds, active against food- and feed-borne filamentous fungi and yeasts in a dual-culture agar plate assay. *Fusarium sporotrichioides* and *Aspergillus fumigatus* were the most sensitive among the molds, and *Kluyveromyces marxianus* was the most sensitive yeast species. No inhibitory activity could be detected against the mold *Penicillium roqueforti* or the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. An isolation procedure, employing a microtiter well spore germination bioassay, was devised to isolate active compounds from culture filtrate. Cell-free supernatant was fractionated on a C₁₈ SPE column, and the 95% aqueous acetonitrile fraction was further separated on a preparative HPLC C₁₈ column. Fractions active in the bioassay were then fractionated on a porous graphitic carbon column. The structures of the antifungal compounds cyclo(L-Phe–L-Pro), cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid (L/D isomer ratio, 9:1), were determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, and gas chromatography. MIC values against *A. fumigatus* and *P. roqueforti* were 20 mg ml⁻¹ for cyclo(L-Phe–L-Pro) and 7.5 mg ml⁻¹ for phenyllactic acid. Combinations of the antifungal compounds revealed weak synergistic effects. The production of the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe–L-Pro) and cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro) by lactic acid bacteria is reported here for the first time.

Biopreservation, the use of microorganisms to preserve food and feed, has gained increasing interest during recent years due to consumers' demand for reduced use of chemical preservatives. The preserving ability of lactic acid bacteria (LAB) has been used since ancient times in food and animal feed, such as sauerkraut and silage. The antimicrobial effect of the LAB is mainly related to production of lactic and acetic acid, but for some strains, synthesis of bacteriocins is also of great importance (11, 18). Due to the "generally regarded as safe" status of LAB, the interest in using them for biopreservation has increased during recent years.

Molds and yeasts are important spoilage organisms in food and feed systems, where the potential mycotoxin production from molds is of particular concern (16). There are many reports on the production of antibacterial compounds by LAB (11, 17), but reports on inhibition of yeasts and molds are comparatively few. Magnusson and Schnürer (12) described production of a proteinaceous antifungal compound by a *Lactobacillus coryniformis* strain, while Lavermicocca et al. (10) reported isolation of the antifungal compounds phenyllactic acid and 4-hydroxyphenyllactic acid from *Lactobacillus plantarum*. Short-chain fatty acids, in particular caproic acid, produced by the sourdough bacterium *Lactobacillus sanfrancisco* also exhibit anti-mold activities (1). *L. plantarum* can produce

fungus-inhibitory low-molecular-weight substances, such as benzoic acid, methylhydantoin, mevalonolactone, and cyclo-(Gly–L-Leu) (14), while a fungistatic bacteriocin-like substance, pentocin TV35b, was isolated from a *Lactobacillus pentosus* strain (15).

We have isolated a *Lactobacillus plantarum* strain with antifungal properties from grass silage. Three antifungal substances produced by the strain have been isolated, and their structures have been determined. The substances have been identified as 3-phenyllactic acid, with a 9/1 ratio of L and D isomers and the two cyclic dipeptides cyclo(L-Phe–L-Pro) and cyclo(L-Phe–*trans*-4-OH-L-Pro). This is the first report of production of these cyclic dipeptides by LAB. Furthermore, the antifungal properties of these dipeptides have not been clearly established previously.

MATERIALS AND METHODS

Cultures and media. The strain MiLAB 393 was grown on MRS agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) at 30°C in anaerobic jars under CO₂-N₂ atmosphere (GasPak System; BBL, Cockeysville, Md.). The culture was stored anaerobically on MRS agar plates at 5°C or for long-term storage at –70°C in a 15% glycerol salt solution (0.82 g of K₂HPO₄, 0.18 g of KH₂PO₄, 0.59 g of Na-citrate, and 0.25 g of MgSO₄ · 7H₂O per liter). Liquid cultures were grown in MRS broth (Oxoid).

The molds *Aspergillus fumigatus* J9, *Aspergillus nidulans* J283 (FSGC A4 wt), *Fusarium sporotrichioides* J304 (ITEM168), *Penicillium roqueforti* J268 (IBT 6754), *Penicillium commune* J238 (IBT 12400), and the yeasts *Pichia anomala* J121, *Kluyveromyces marxianus* J137 (CBS 6556), *Rhodotorula mucilaginosa* J350 (CFSQE 63), *Debaromyces hansenii* J187 (CBS 6958), *Zygosaccharomyces bailii* J109 (CBS 2852), *Candida albicans* J278 (CBS 562), and *Saccharomyces cerevisiae* J122 (ATCC 9793) are kept in the culture collection of the Department of

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, P.O. Box 7025, SE-750 07 Uppsala, Sweden. Phone: 46 18 673213. Fax: 46 18 673392. E-mail: katrin.strom@mikrob.slu.se.

Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences. The target fungi were chosen to represent potential spoilage fungi in, e.g., silage and dairy products (16). The exception was *A. fumigatus*, which was used in the bioassay, since it appears to be highly sensitive to LAB antifungal compounds (12) as well as being a serious pathogen of animals and humans (2). Molds were grown on malt extract agar slants (Oxoid) at 25°C for 5 to 7 days and stored at 4°C. Spore inocula were prepared by growing the molds on malt extract agar slants until sporulation and spores or conidia were collected by vigorously shaking slants with sterile peptone water (0.2% [wt/vol]). Yeast cell inocula were prepared from washed cultures grown in malt extract broth (2%; DIFCO Laboratories, Detroit Mich.) at 25 or 30°C for 12 h. Both mold (spores or conidia) and yeast cell concentrations were determined using a hemocytometer and adjusted to 10⁵ spores (cells) per ml of sterile peptone water.

Isolation and identification of MiLAB 393. *L. plantarum* MiLAB 393 was isolated from grass silage (*Phleum pratense* and *Festuca pratensis* with <20% red clover [*Trifolium pratense*]) in an experiment investigating the effect of addition of different biological agents on growth of the spoilage mold *P. roqueforti* in silage. The strain MiLAB 393 came from a control silo without chemical or biological additives that showed total growth inhibition of the inoculated *P. roqueforti* (unpublished data). From the silo, 10 g of silage was suspended in 90 ml of sterile peptone water (0.2% [wt/vol]) and mixed in a stomacher for 2 min. Dilutions were prepared using sterile peptone water, and 0.1-ml aliquots were surface spread on MRS agar plates. After anaerobic incubation at 30°C for 48 h, the bacterial cultures were transferred to fresh MRS plates for a second incubation.

MiLAB 393 was identified from both the fermentation pattern and the 16S rRNA gene sequence. The API 50 CHL test (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) was used for identification by fermentation pattern. For 16S ribosomal DNA sequence determination, chromosomal DNA was isolated using the DNeasy tissue kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). PCR amplification (94°C for 30 s, 54°C for 30 s, and 72°C for 80 s, 30 cycles) using primers 16S.S (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') and 16S.R (5'-CGGGAACGTATTCCACCG-3') amplified approximately 1,400 bp of the 16S ribosomal DNA. Sequencing of the amplified DNA was performed using the Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and the automated sequence analyzer ABI PRISM 377XL (Perkin-Elmer). The culture is deposited as strain LMG-P21295 at the BCCM/LMG bacteria collection, Ghent, Belgium.

Determination of antifungal activity. The inhibition spectrum of strain MiLAB 393 was determined by using the overlay method as described by Magnusson and Schnürer (12) but with some modifications of the scale used for gradation. Strain MiLAB 393 was inoculated in two 2-cm lines on MRS agar plates and incubated under anaerobic conditions at 30°C for 48 h. The plates were overlaid with malt extract soft agar containing 10⁴ cells/spores ml⁻¹ and incubated aerobically at 25 to 30°C for 24 to 48 h. Clear zones of inhibition were recorded and scored as follows: -, no visible inhibition; (+), visible inhibition only in the soft agar above the bacterial streak; +, inhibition area per bacterial streak of 0.1 to 3.0% of the petri dish; ++, inhibition area per bacterial streak of 3.0 to 8.0% of the petri dish; or +++, inhibition area per bacterial streak of >8.0% of the petri dish.

Determination of MIC values. MICs were determined for the available commercial compounds, 3-phenyl-L-lactic acid (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany), 3-phenyl-D-lactic acid (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), and cyclo(L-Phe-L-Pro) (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland). Both cyclo(L-Phe-L-Pro) and phenyllactic acid (both D and L form) were dissolved in water with 8% methanol, and the pH was adjusted to 4 with 2 M NaOH. A pH-adjusted 8% methanol-water solution without dissolved substances was used as a negative control. MIC determinations were performed in duplicates as serial twofold dilutions using the microtiter plate well method described by Magnusson and Schnürer (12) and with *A. fumigatus* and *P. roqueforti* as target organisms. In the microtiter plate well method, a 100- μ l sample and 100 μ l of MRS broth or malt extract broth (2%) containing 10⁴ fungal spores ml⁻¹ were added to each well. After 48 h incubation at 30°C, the inhibition was measured by optical density at 550 nm (Microplate Autoreader EL 309, Biotek Instruments, Winooski, Vt.). An inverted microscope and measurement using the naked eye were also used for estimation of fungal growth in the wells. The MIC was determined as the lowest concentration where total inhibition of spore germination was observed. Synergistic inhibitory effects against *A. fumigatus* and *P. roqueforti* were evaluated by testing cyclo(L-Phe-L-Pro) and 3-phenyl-L-lactic acid in combination and together with 100 mM lactic acid. A mixture of cyclo(L-Phe-L-Pro) at a concentration of 40 mg ml⁻¹ and 3-phenyl-L-lactic acid at a concentration of 20 mg ml⁻¹ was used in serial twofold dilutions. The pH of the mixtures was adjusted to 4 with 2 M NaOH. Lactic acid at 100 mM, representative of the concentration

of a 48-h culture filtrate from *L. plantarum* MiLAB 393, had no effect on growth of *A. fumigatus* and *P. roqueforti* at pH 4.0.

Since cyclic dipeptides also are reported to be antibacterial (5), the MIC for cyclo(L-Phe-L-Pro) against the producer strain MiLAB 393 was determined using the microtiter plate method described above.

Preparation of cell-free supernatant. *L. plantarum* MiLAB 393 was inoculated to a concentration of 10⁵ cells ml⁻¹ in 2 liters of MRS broth or in the defined medium DM1 (13) as a still culture at 30°C for 48 h. DM1 contains no peptides or proteins; instead, free amino acids necessary for growth are added to the medium (13). Cell-free supernatant was prepared by centrifugation (7,500 \times g for 15 min) and sterile filtration (0.45 μ m-pore-size filter; Millipore). The cell-free culture filtrate was used for isolation of the antifungal compounds. Uninoculated MRS broth was used as a negative control, fractionated, and evaluated in the biotests using the same procedure as with the cell-free culture filtrate. All fractions from the purification process were evaluated for antifungal activity after concentration under vacuum and/or by freeze-drying or evaporation under compressed air. The microtiter plate bioassay described above was used with *A. fumigatus* as the indicator fungus.

SPE and high performance liquid chromatography (HPLC). The supernatant was fractionated on a solid phase extraction (SPE) column (Isolute, C₁₈ EC, 10 g; International Sorbent Technology Ltd., Hengoed, United Kingdom). The SPE column was activated with 20 ml of acetonitrile and equilibrated with 20 ml of water. Following sample loading, the column was washed with 5% aqueous acetonitrile and subsequently eluted with 95% aqueous acetonitrile. The 95% aqueous acetonitrile fraction was separated on a preparative HPLC system (piston pump 305 and 306; Gilson, Villiers-le-Bel, France) using a Discovery C₁₈ column (100 by 21.2 mm, 5 μ m; Supelco, Bellefonte, Pa.) and a linear gradient from 5% acetonitrile in water to 100% acetonitrile in 10 min followed by 5 min at 100% acetonitrile. The flow rate was 10 ml min⁻¹, and the eluate was monitored using a UV detector (Gilson 118) at 210 nm. All fractions were collected in 96 2-ml deep-well plates using a fraction collector (Gilson Liquid Handler 215). Following bioassay, all active fractions were further fractionated on the same HPLC system using a Hypercarb porous graphitic carbon column (100 by 21.2 mm, 5 μ m; ThermoQuest Runcorn, Cheshire, United Kingdom) and isocratic elution with 40% aqueous acetonitrile containing 0.06% trifluoroacetic acid. Fractions showing activity in the bioassay were dried in a vacuum centrifuge.

Structure determination of antifungal compounds. The structures of the antifungal compounds were determined using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, mass spectrometry (MS), and gas chromatography (GC). NMR spectra were recorded on samples in CD₃OD and/or dimethylsulphoxide-*d*₆ and/or D₂O on a Bruker DRX-600 NMR spectrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany) equipped with a 2.5-mm microprobe. All spectra were recorded at 30°C, and one-dimensional ¹H NMR experiments as well as two-dimensional ¹H-¹H correlation spectroscopy, ¹H-¹³C heteronuclear multiple bond correlation, and ¹H-¹³C heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) experiments were performed according to Bruker standard pulse sequences. Proton chemical shifts were determined from one-dimensional ¹H NMR and from HMQC experiments, and ¹³C chemical shifts were determined from HMQC and ¹H-¹³C heteronuclear multiple bond correlation experiments. Chemical shifts are reported relative to the solvent peaks (CD₃OD: ¹H δ 3.31 and ¹³C δ 49.15, dimethyl sulfoxide-*d*₆ ¹H δ 2.50) except when D₂O was used, where data are given relative to sodium 3-(trimethylsilyl)propionate (¹H δ 0.00). MS was performed on an Esquire ion-trap MS (Bruker) with an electrospray ion source and on a JEOL JMS-SX/SX102A four-sector tandem MS (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan) with a fast-atom-bombardment (FAB) ion source with glycerol as the matrix.

To determine the absolute configuration of the isolated 3-phenyllactic acid, a modified version of a published method (6) was used. An aliquot (<1 mg) of dry sample was dissolved in 1 ml of acetyl chloride-methanol (1:9, vol/vol) and heated for 10 min at 100°C. After cooling to room temperature, 1 ml of 10% disodium hydrogen phosphate solution was added and the sample was extracted twice with 0.9 ml of hexane. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, evaporated to approximately 50 μ l, and analyzed on a GC-MS instrument (HP5890-HP5970; Hewlett-Packard, Palo-Alto, Calif.). GC-MS was performed on a chiral fused-silica (30 m by 0.25 mm) β -Dex 120, coated with 0.25 μ m of 20% permethylated β -cyclodextrin in 80% poly-(35% diphenyl-65% dimethyl)-siloxane (Supelco) using a temperature gradient (140°C for 5 min; 140 to 180°C at 3°C min⁻¹). The GC injector was kept at 200°C, and the GC-MS interface was kept at 200°C. Samples (1 to 5 μ l) were injected in split mode (1:50) three times, and helium was used as the carrier gas (1 ml min⁻¹). Commercial 3-phenyl-L-lactic acid and 3-phenyl-D-lactic acid were used as references.

To determine the absolute configuration of the cyclic dipeptides, a small

TABLE 1. Antifungal inhibition spectrum of strain MiLAB 393 in a dual-culture agar overlay system^a

Mold or yeast strain	Inhibition ^b
Molds	
<i>A. fumigatus</i>	+++
<i>A. nidulans</i>	++
<i>F. sporotrichioides</i>	+++
<i>P. commune</i>	++
<i>P. roqueforti</i>	-
Yeasts	
<i>C. albicans</i>	++
<i>D. hansenii</i>	++
<i>K. marxianus</i>	+++
<i>P. anomala</i>	(+)
<i>R. mucilaginosa</i>	++
<i>S. cerevisiae</i>	(+)
<i>Z. bailii</i>	-

^a The grading of the inhibition is based on the area of the inhibition zone surrounding the bacterial inocula.

^b Inhibition was graded as follows: -, no visible inhibition; (+), visible inhibition only in the soft agar above the bacterial streak; +, inhibition area per bacterial streak of 0.1 to 3.0% of the petri dish; ++, inhibition area per bacterial streak of 3.0 to 8.0% of the petri dish; +++, inhibition area per bacterial streak of >8.0% of the petri dish.

amount (less than 0.1 mg) of each dipeptide was hydrolyzed in 6 M aqueous HCl (1 ml) at 110°C for 24 h. Each hydrolysate was dried under reduced pressure, redissolved in 200 µl of H₂O, transferred to a Reacti-vial (Pierce, Rockford, Ill.), and freeze-dried. To each dried sample, 50 µl of 2-(*S*)-butanol and acetyl chloride (10:1) was added, and the solution was heated at 100°C for 40 min followed by evaporation under a stream of compressed air. Subsequently, perfluoropropanoic anhydride (50 µl) was added, and each vial was heated at 100°C for 40 min to give the corresponding amide. The sample was dried under a stream of compressed air. Reference samples were prepared by derivatization of commercial L-proline, DL-proline, L-phenylalanine, DL-phenylalanine, *cis*-4-hydroxy-L-proline, *cis*-4-hydroxy-D-proline, and *trans*-4-hydroxy-L-proline as outlined above. *trans*-4-hydroxy-D-proline was not available as a reference substance. Instead, *trans*-4-hydroxy-L-proline was esterified with 2-(*R*)-butanol, yielding an ester, which is enantiomeric to *trans*-4-hydroxy-D-proline esterified with 2-(*S*)-butanol. Since enantiomers behave identically on a nonchiral GC column, this substance was used as the missing reference substance, after amide formation as described above.

Prior to GC-MS analysis each sample was dissolved in toluene. GC-MS was performed on a fused-silica capillary column (BP5; 0.25 µm, 30 m × 0.25 mm; SGE Ltd., Ringwood, Australia) using a temperature gradient (120°C for 5 min, 120 to 160°C at 2°C min⁻¹). The GC injector was kept at 240°C, and the GC-MS interface was kept at 260°C. Samples (1 µl) were injected in split mode (1:50), and helium (1 ml min⁻¹) was used as the carrier gas.

RESULTS

Identification of strain MiLAB 393. The partial 16S rDNA sequence, 450 to 550 bp, encoding variable regions V1 and V2 from the isolate was used for searching in GenBank and showed 100% homology to the corresponding sequence of *L. plantarum*. The fermentation pattern from the API 50 CHL test identified the strain as an *L. plantarum* strain with a probability of 99.9%.

Spectrum of antifungal activity. *L. plantarum* MiLAB 393 had activity against several mold and yeast species in an agar overlay method (Table 1). *F. sporotrichioides* and *A. fumigatus* were the most sensitive among the molds, and *K. marxianus* was the most sensitive yeast species. No activity could be detected against the food and feed spoilage mold *P. roqueforti* or the preservative-resistant yeast *Z. bailii*.

Purification and characterization of antifungal compounds.

Antifungal activity of the cell-free supernatant resulting from growth of strain MiLAB 393 in MRS broth was recovered in the 95% acetonitrile phase after SPE on a C₁₈ column, indicating a hydrophobic nature of the antifungal compound or compounds. Further separation of the filtrate (95% acetonitrile phase from SPE) by HPLC using a C₁₈ column and activity assay in microtiter wells against *A. fumigatus* delimited the activity to seven (fractions 31 to 37) of a total of 64 fractions collected (Fig. 1a). After further separation by HPLC using a porous graphitic carbon column, three active compounds, A, B, and C were isolated (Fig. 1b and c). No activity was observed from the corresponding fractions isolated from noninoculated MRS broth. Data from the experiments elucidating the chemical structures of compounds A, B, and C are summarized below.

For compound A, solid; ¹H NMR (600 MHz, D₂O); δ 7.38 (H-5 and H-9), 7.31 (H-6 to H-8), 4.27 (H-2), 3.11 (H-3a), 2.89 (H-3b); GC retention time (*t*_R) (min); D-phenyllactic acid 16.81 (standard 16.82) and L-phenyllactic acid 17.05 (standard 17.07); ESI-MS (*m/z*): 165 (M+H)⁺; HPLC *t*_R (min): 6.7. For compound B, solid; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD); δ 7.95 (NH, dimethylsulphoxide-*d*₆ used as solvent), 7.27 (H-13 and H-15), 7.24 (H-12 and H-16), 7.22 (H-14), 4.44 (H-3), 4.07 (H-9), 3.55 (H-6a), 3.37 (H-6b), 3.17 (2H, H-10), 2.10 (H-8a), 1.81 (2H, H-7), 1.25 (H-8b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD); δ 170.86 (C-1), 166.86 (C-4), 137.37 (C-11), 131.11 (C-16 and C-12), 129.62 (C-13 and C-15), 128.19 (C-14), 60.03 (C-9), 57.71 (C-3), 45.94 (C-6), 38.20 (C-10), 29.34 (C-8), 22.68 (C-7); FAB-MS (*m/z*): 245 (M+H)⁺; HPLC *t*_R (min): 9.6. For compound C, viscous oil; ¹H NMR (600 MHz, CD₃OD); δ 7.95 (NH, dimethyl sulfoxide-*d*₆ used as solvent), 7.27 (H-13 and H-15), 7.24 (H-12 and H-16), 7.22 (H-14), 4.48 (H-3), 4.37 (H-9), 4.28 (H-7), 3.71 (H-6a), 3.29 (H-6b), 3.17 (2H, H-10), 2.07 (H-8a), 1.39 (H-8b); ¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD); δ 171.29 (C-1), 167.19 (C-4), 137.51 (C-11), 131.14 (C-12 and C-16), 129.63 (C-13 and C-15), 128.23 (C-14), 68.65 (C-7), 58.35 (C-9), 57.65 (C-3), 55.19 (C-6), 38.76 (C-8), 37.95 (C-10); FAB-MS (*m/z*): 261 (M+H)⁺; HPLC *t*_R (min): 5.8.

Compound A was identified as 3-phenyllactic acid by comparing data from NMR, ESI-MS, and HPLC with data from commercial 3-phenyllactic acid. The isolated 3-phenyllactic acid was determined to be in a 9/1 ratio of the L and D configuration by analysis of the corresponding methyl ester on a chiral GC column and using commercial D- and L-phenyllactic acid as standards. Compound B was identified as cyclo(Phe-Pro) by comparing data from NMR, FAB-MS, and HPLC with data from commercial cyclo(L-Phe-L-Pro). The NMR and FAB-MS data of compound C were in good agreement with previously published data of cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) (8). Absolute configuration determination of the amino acids constituting the isolated cyclic dipeptides [cyclo(Phe-Pro) and cyclo(Phe-4-OH-Pro)] was done by comparing the retention time of standards and samples from the GC analysis of the derivatized amino acids. The amino acids were identified as L-phenylalanine, L-proline, and *trans*-4-hydroxy-L-proline (Table 2). Thus, the antifungal dipeptides were cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) (Fig. 2).

Production of compounds in defined medium. Since two of the identified active compounds were cyclic dipeptides, the defined medium DM1, containing only free amino acids in-

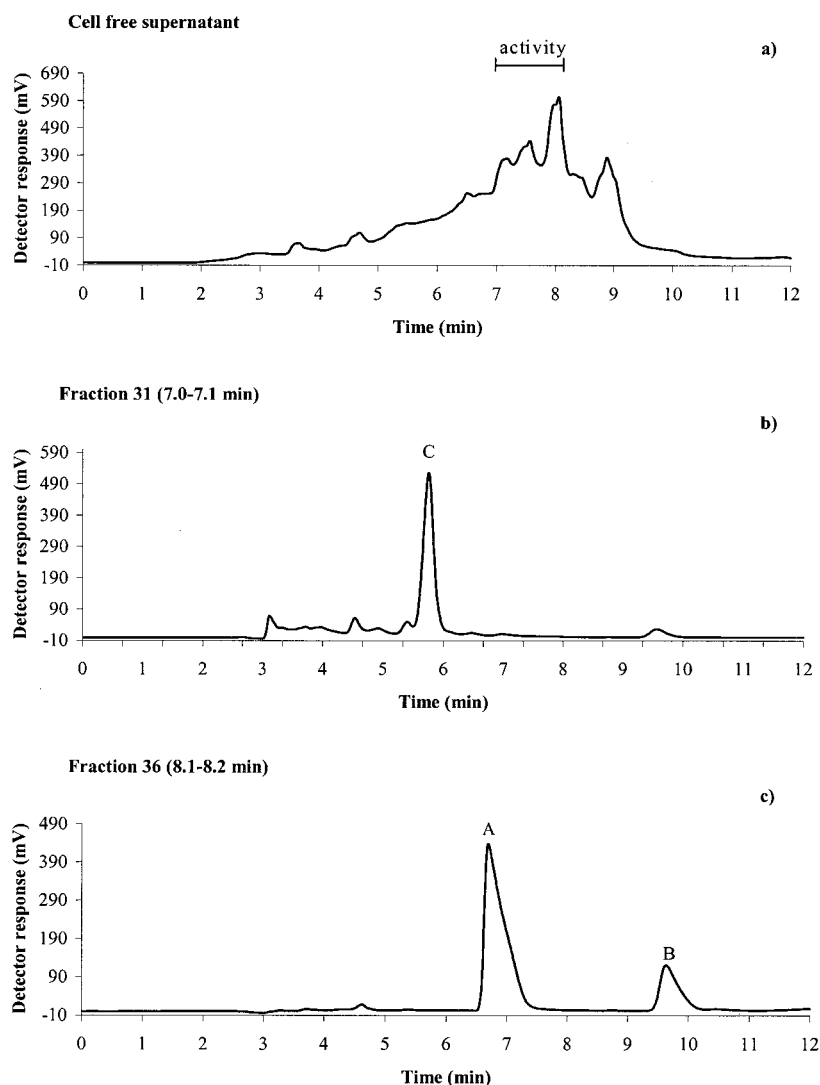


FIG. 1. Chromatograms from isolation of antifungal compounds from culture broth of *L. plantarum* MiLAB 393. (a) Separation of the 95% acetonitrile phase (SPE) from cell supernatant on an HPLC C_{18} column. Activity against *A. fumigatus* was detected in fractions 31 to 37 (retention time, 7.0 to 8.2 min). Chromatograms from a second preparative HPLC on a porous graphitic carbon column of fraction 31 with activity at peak C (b) and fraction 36 with activity at peaks A and B (c) are shown; see the text for chromatographic conditions.

stead of peptides, was used to verify that the cyclic dipeptides were produced by the bacteria. Comparison of HPLC retention time and FAB-MS spectra with a reference compound confirmed that cyclo(L-Phe-L-Pro) was produced in the defined medium. The presence of cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) was confirmed by comparing the retention time from HPLC separation with previously isolated cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro). Thus, the conclusion is that both cyclic dipeptides are produced by the bacteria in DM1. Isolation of the two dipeptides was done by using the same procedure as when MRS broth was used as the medium and with the same volume of supernatant. Comparison of the weight of the isolated dipeptides showed that approximately 10 times less material was produced when DM1 was used.

Determination of MICs. Commercial reference samples of 3-phenyllactic acid, both the L and D forms, and cyclo(L-Phe-L-Pro) were used for determination of fungal inhibitory concentrations with *A. fumigatus* and *P. roqueforti* as indicator

TABLE 2. GC analysis of amino acids constituting compounds B, cyclo(Phe-Pro), and C, cyclo(Phe-4-OH-Pro), isolated from *L. plantarum* MiLAB 393^a

Compound	Retention time (min)		
	Reference	Compound B	Compound C
D-Pro	10.12		
L-Pro	10.31	10.31	
<i>trans</i> -4-OH-D-Pro ^b	11.91		
<i>trans</i> -4-OH-L-Pro	12.11		12.15
<i>cis</i> -4-OH-D-Pro	14.46		
<i>cis</i> -4-OH-L-Pro	14.70		
D-Phe	20.33		
L-Phe	20.57	20.56	20.60

^a The cyclic dipeptides were hydrolyzed with 6M HCl and subsequently derivatized with 2-(S)-butanol and perfluoropropionic anhydride. The GC analysis was performed using a nonchiral GC column (see the text for details).

^b The amino acid *trans*-4-OH-D-Pro was not commercially available. To obtain a reference compound behaving identically on a nonchiral GC column, the enantiomeric compound *trans*-4-OH-L-Pro was derivatized with 2-(R)-butanol and perfluoropropionic anhydride.

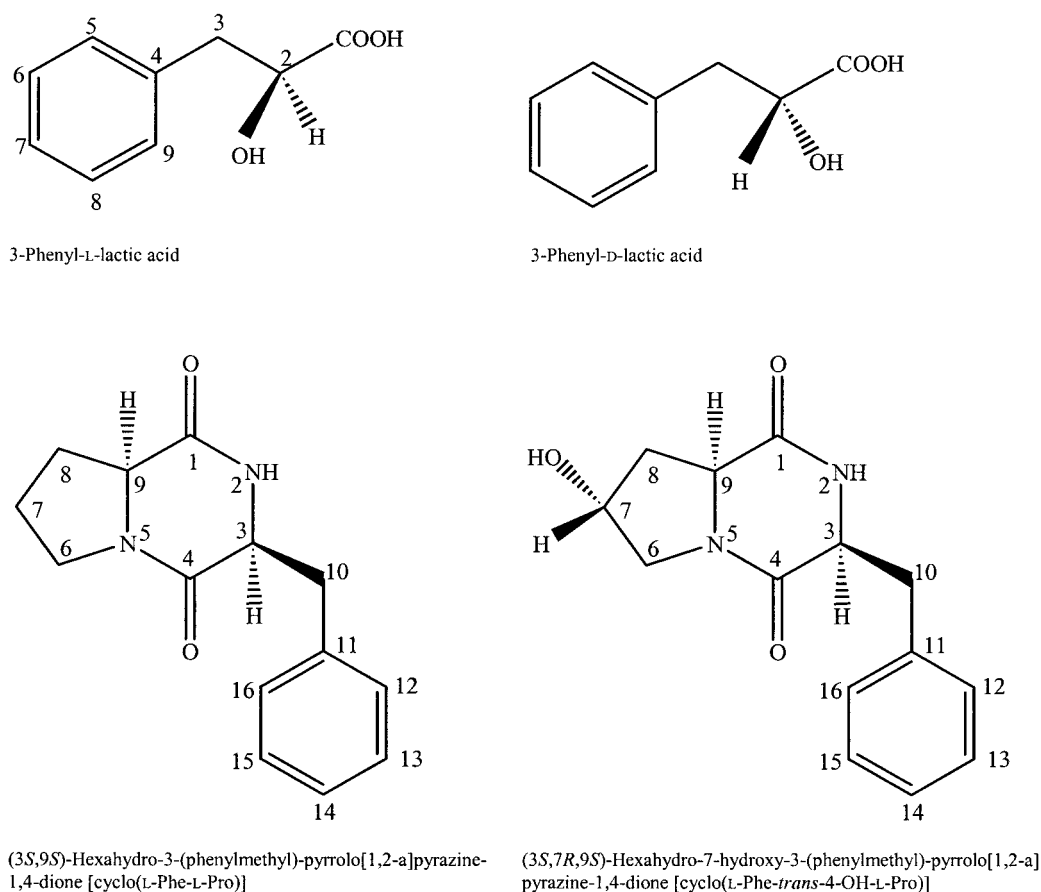


FIG. 2. Antifungal compounds isolated from supernatant of *L. plantarum* MiLAB 393 grown in MRS broth.

organisms. For both fungi the MIC for total growth inhibition was 7.5 mg ml⁻¹ for 3-phenyllactic acid and 20 mg ml⁻¹ for cyclo(L-Phe-L-Pro). When 3-phenyl-L-lactic acid and cyclo(L-Phe-L-Pro) were combined, the mixture containing 5 mg of 3-phenyl-L-lactic acid ml⁻¹ and 10 mg of cyclo(L-Phe-L-Pro) ml⁻¹ gave total inhibition, revealing weak synergistic effects. Addition of 100 mM lactic acid (pH 4) in the mixtures gave no further inhibitory effects. The MIC for the cyclic dipeptide cyclo(L-Phe-L-Pro) against the producer strain MiLAB 393 was 30 mg ml⁻¹.

DISCUSSION

LAB with antifungal activities could have potential as bioreservatives, preventing growth of spoilage molds and yeasts in food and feed systems. In this study we report the antifungal properties and identification of fungal inhibitory substances from the *L. plantarum* strain MiLAB 393. Three antifungal substances were isolated, and the chemical structures were determined as 3-phenyllactic acid (both L and D forms in a 9/1 ratio), cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro). Phenyllactic acid from *L. plantarum* has previously been reported in fungal inhibition (10), and the D-enantiomer of 3-phenyllactic acid from the yeastlike fungus *Geotrichum candidum* has been found to exhibit antibacterial properties (3). We found a lower concentration for inhibition of fungal growth than Lavermicocca et al. (10), who found total inhibition con-

centrations ranging from 50 to 166 mg ml⁻¹ with various fungi. This is probably due to the use of target fungi of different species and possibly a more sensitive test system. We used a microtiter plate well method where the fungal spores are more directly exposed to the substance than in the disk agar diffusion assay used by Lavermicocca et al. (10).

Cyclic dipeptides have previously been reported to be both antibacterial and antifungal (5). Niku-Paavola et al. (14) also reported production of an antifungal cyclic dipeptide, cyclo(Gly-L-Leu), from an *L. plantarum* strain. The cyclic dipeptides identified in this work have to our knowledge never before been shown to be produced from LAB, nor has the antifungal effect of cyclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) been reported earlier. The results further show that combining the peptide cyclo(L-Phe-L-Pro) and 3-phenyllactic acid leads to weak synergistic antifungal inhibitory effects.

Cyclo(L-Phe-L-Pro) has also been isolated from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas alcaligenes* cell-free culture supernatants and reported to be involved in quorum sensing mechanisms (7), which synchronize bacterial physiological responses in a cell density-dependent manner. For gram-positive bacteria, peptide pheromones are the most common signal molecules, whereas gram-negative bacteria use lactone-based pheromones (9). Quorum sensing in LAB is exemplified by larger signal peptides regulating the production of certain bacteriocins (9). The observation by Holden et al. (7) that gram-

negative bacteria could produce the cyclic dipeptide cyclo(L-Phe-L-Pro), which activated quorum sensing mechanisms, and our finding that cyclo(L-Phe-L-Pro) is produced by *L. plantarum* could suggest a possibility of cross talk among signaling systems of gram-positive and gram-negative bacteria.

In the agar test system used for determination of antifungal spectrum in this study, strain MiLAB 393 showed a broad inhibitory spectrum with effect against both filamentous fungi and yeasts. This dual-culture system is based on diffusion of the inhibitory substances into the agar, and consequently lactic acid will also contribute to the inhibition. Both *P. roqueforti* and *Z. bailii* are tolerant of low pH and regarded as resistant to weak acid preservatives (16), which might explain the lack of inhibition of these fungi in this test system. However, total inhibition of spore germination of *P. roqueforti* with 3-phenyllactic acid and cyclo(L-Phe-L-Pro), at the same concentration as with *A. fumigatus*, was observed in the more sensitive microtiter well method.

The fungal inhibitory concentrations of the antifungal compounds isolated in this work are high compared to antifungal drugs, such as amphotericin B and nikkomycin Z, that inhibit fungal growth at concentrations in the microgram-per-milliliter range (4). The antifungal activity of the isolated cyclic dipeptides is most probably a secondary effect; the primary reason for production might instead be related to quorum sensing or other unknown mechanisms. Nevertheless, the antifungal activity of these substances most likely is of considerable importance for the fungal inhibitory activity of the bacterial strain MiLAB 393.

Further evaluation of LAB for antifungal properties could lead to useful biopreservation systems, preventing fungal spoilage and mycotoxin formation in both food and animal feed.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of the Foundation for Strategic Environmental Research (MISTRA) and the Swedish Farmers Foundation for Agricultural Research (SLF) is gratefully acknowledged.

Lennart Kenne, Karin Jacobsson, Hans Jonsson, and Stefan Roos gave helpful comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Corsetti, A., M. Gobbetti, J. Rossi, and P. Damiani. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 Appl. Microbiol. Biotechnol. **50**:253–256.
2. deHoog, G. S. 1996. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. *Mycoses* **39**:407–417.
3. Dieuleveux, V., S. Lemarini, and M. Gueguen. 1998. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **40**:177–183.
4. Frändberg, E., C. Petersson, L. N. Lundgren, and J. Schnürer. 2000. *Streptomyces halstedii* K122 produces the antifungal compounds bafilomycin B1 and C1. *Can. J. Microbiol.* **46**:753–758.
5. Graz, M., A. Hunt, H. Jamie, G. Grant, and P. Milne. 1999. Antimicrobial activity of selected cyclic dipeptides. *Pharmazie* **54**:772–775.
6. Heil, M., F. Podebrad, T. Beck, A. Mosandl, A. C. Sewell, and H. Bohles. 1998. Enantioselective multidimensional gas chromatography mass spectrometry in the analysis of urinary organic acids. *J. Chromatogr. B* **714**:119–126.
7. Holden, M. T. G., S. R. Chhabra, R. de Nys, P. Stead, N. J. Bainton, P. J. Hill, M. Manefield, N. Kumar, M. Labatte, D. England, S. Rice, M. Givskov, G. P. C. Salmond, G. Stewart, B. W. Bycroft, S. A. Kjelleberg, and P. Williams. 1999. Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **33**:1254–1266.
8. Jiang, Z., K. G. Boyd, A. Mearns-Spragg, D. R. Adams, P. C. Wright, and J. G. Burgess. 2000. Two diketopiperazines and one halogenated phenol from cultures of the marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea*. *Nat. Prod. Lett.* **14**:435–440.
9. Kleerebezem, M., and L. E. Quadri. 2001. Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* **22**:1579–1596.
10. Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, and M. Gobbetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:4084–4090.
11. Lindgren, S. E., and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:149–163.
12. Magnusson, J., and J. Schnürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1–5.
13. Moretto, T., B. F. Hagen, and L. Axelsson. 1998. A new, completely defined medium for meat lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* **85**:715–722.
14. Niku-Paavola, M. L., A. Laitila, T. Mattila-Sandholm, and A. Haikara. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* **86**:29–35.
15. Okkers, D. J., L. M. Dicks, M. Silvester, J. J. Joubert, and H. J. Odendaal. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* **87**:726–734.
16. Pitt, J. J., and A. D. Hocking. 1999. *Fungi and food spoilage*, 2nd ed. Aspen Publications, New York, N.Y.
17. Stiles, M. E. 1996. *Biopreservation by lactic acid bacteria*. Antonie Leeuwenhoek **70**:331–345.
18. Vandenberg, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**:221–238.

Research Note

Potential of *Pediococcus pentosaceus* (L006) Isolated from Maize Leaf To Suppress Fumonisin-Producing Fungal Growth

D. K. D. DALIE,^{1*} A. M. DESCHAMPS,² V. ATANASOVA-PENICHON,¹ AND F. RICHARD-FORGET¹

¹Unité MycSA, UPR 1264, INRA, 71 Avenue Edouard Bourleaux, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, France; and ²UMR INRA 1219 Oenologie, ISVV, Université de Bordeaux, 210 Chemin de Leysotte, CS 50008, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

MS 09-346: Received 14 August 2009/Accepted 1 February 2010

ABSTRACT

The present study was aimed at characterizing the ability of lactic acid bacteria isolated from maize to repress the growth of fumonisin-producing fungi. A total of 67 isolates were screened for their antifungal activity against *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides* by using the overlay method. The most efficient antifungal isolate was identified as *Pediococcus pentosaceus* (L006), on the basis of physiological and biochemical characterization and 16S rRNA gene sequencing. Production of the antifungal metabolite by this isolate commenced at the end of the growth exponential phase (8 h) and reached a maximum level after a long period of incubation (120 h). The antifungal metabolites produced were shown to be heat stable, resistant to proteolytic enzyme treatments, and pH dependent. The exact chemical nature of these substances remains to be clarified.

Fusarium spp. are soilborne mold pathogens that cause ear rot of maize (28). Besides the economic losses caused by this disease, further losses may occur due to contamination of maize by certain mycotoxins such as fumonisins. Increased attention has recently been focused on fumonisins due to their widespread occurrence, acute toxicity to some livestock, and potential carcinogenicity (9). These toxins have been linked to several mycotoxicoses in animals including leukoencephalomalacia in horses, pulmonary edema in pigs, and liver cancer in rats. Fumonisins are mainly produced by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*. Therefore, one of the strategies to reduce the accumulation of these toxins in maize is to manage the growth of the producers. In this respect, several methods have been developed including the introduction of resistant cultivars, the modification of cultural practices, and the use of fungicides. However, these different methods cannot fully prevent fumonisin-producing fungal growth in maize (26).

Within this context, the use of biopreservation, i.e., the control of one organism by another, appears to be promising in preventing mycotoxinogenic fungal growth. Some studies have clearly demonstrated that diverse microorganisms can act as natural antagonists of plant pathogens. For instance, some strains belonging to the genera *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and *Bacillus*, isolated from the maize environment, have been used to reduce disease caused by soilborne plant pathogens such as *Fusarium* spp. (41).

Among natural biological antagonists, lactic acid bacteria have a long history of use in food and are generally regarded as safe organisms (23). Furthermore, the use of lactic acid bacteria to control mycotoxinogenic fungal growth could represent an efficient strategy, since it has been reported that these bacteria have strong antimicrobial properties (15, 17, 29, 31, 33).

Different environments such as sourdough (20), grass silage (22, 23), plant material (12, 32, 35), and cheese and milk (34) have been reported to contain efficient antifungal lactic acid bacteria. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3, isolated from grass silage, was able to inhibit the growth of a great number of molds including *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Fusarium poae*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, and *Fusarium sporotrichioides* (22). In sourdough, active microorganisms characterized by a potent antifungal activity belong to different species of the *Lactobacillus* genus such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus paracasei* (25). Recently, an antifungal lactic acid bacterium identified as *Pediococcus acidilactici* LAB 5 isolated from meat was reported as being able to repress the growth of a large panel of food- and feedborne molds and plant-pathogenic fungi (24). Recent research revealed that lactic acid bacteria produce a range of antifungal substances including fatty acids (37), cyclic dipeptides (38), proteinaceous compounds (22), and organic acids (3, 19, 20). However, the exact mechanisms by which lactic acid bacteria exert their antifungal activity remain to be elucidated.

In the present study, we present the isolation of lactic acid bacteria from maize and the screening of their ability to

* Author for correspondence. Tel: +33650592119; Fax: +33557122500; E-mail: doguietd@yahoo.fr.

inhibit the growth of fumonisin producers. The identification and characterization of the most potent antifungal lactic acid bacteria isolate were achieved by conventional microbiological methods and modern molecular techniques. The antifungal spectrum and production of antifungal compounds by this isolate were investigated, and a partial characterization of the metabolites produced was performed.

MATERIALS AND METHODS

Mold cultures. The fungal strains used in this investigation (Table 1) were from the INRA MycSA collection: *F. proliferatum* INRA 58, *F. proliferatum* INRA 393, *F. proliferatum* INRA 424, *F. proliferatum* INRA 381, *F. proliferatum* INRA 367, *F. proliferatum* INRA 365, *F. verticillioides* INRA 62, *F. verticillioides* INRA 363, *F. verticillioides* INRA 369, *F. verticillioides* INRA 371, *F. verticillioides* INRA 368, and *F. verticillioides* INRA 382. These strains are characterized by different toxigenic potentials (Table 1).

Spore inocula were prepared by growing the fungi on potato dextrose agar (PDA) slants at 25°C for 5 to 7 days. Spores were harvested by adding sterile water containing 0.05% Tween 80 to the slants with gentle shaking. The spore count was then determined with the aid of a Malassez cell, and suspensions were adjusted to 10⁷ spores per ml and stored at -20°C until used.

Isolation of lactic acid bacteria. Lactic acid bacteria were isolated from various maize tissues (ear, grain, leaf, root, and stem) collected in fields not treated with pesticides in the southwest of France. The method of accumulation described by Chen et al. (5) with few modifications was used. Briefly, 1 g of maize sample was added to 5 ml of modified de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth (Difco) containing 10 g/liter sodium acetate and incubated under anaerobic condition at 30°C for 48 to 72 h. After incubation, each mixture was diluted in 9 ml of sterile peptone water (0.2%, wt/vol) and spread onto MRS modified agar (Difco) plates with the same concentration of sodium acetate as above. Plates were incubated at 30°C for 48 to 72 h. Ten percent of the colonies with different morphologies were randomly removed from each plate of MRS agar and subjected to Gram staining and catalase tests. Only gram-positive and catalase-negative bacteria were kept and maintained on MRS agar and in MRS broth with 20% glycerol at -80°C until used.

Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria. Antifungal activity of lactic acid bacteria was assayed using the overlay method described by Magnusson et al. (23) with few modifications. Bacteria were inoculated in two 2-cm lines on 15 ml of MRS agar plates and allowed to grow at 30°C for 48 h in anaerobic jars. The plate was then overlaid with 10 ml of PDA made with 0.8% (wt/wt) agar, containing 10⁶ spores of the indicator strains *F. proliferatum* INRA 58 and *F. verticillioides* INRA 62 per ml. After 72 h of aerobic incubation at 25°C, the inhibition zones around the bacterial streaks were measured and scored as follows: a minus sign (-) means no suppression of fungal growth; a plus sign (+) means no fungal growth on 0.1 to 3% of the plate area per bacterial streak; two plus signs (++) mean no fungal growth on 3 to 8% of the plate area per bacterial streak; and three plus signs (+++) mean no fungal growth on >8% of plate area per bacterial streak. Inhibition tests were done in triplicate.

Biochemical and physiological characterization of the most efficient antifungal bacteria isolate. Biochemical char-

TABLE 1. Toxigenic potential of the *F. verticillioides* and *F. proliferatum* strains of the INRA MycSA collection used as targets

Species of <i>Fusarium</i>	Strain	Toxigenic potential (mg kg ⁻¹) ^a
<i>F. verticillioides</i>	INRA62	5,400
	INRA 363	1,330
	INRA 369	1,830
	INRA 371	2,190
	INRA 368	2,670
	INRA 382	1,600
<i>F. proliferatum</i>	INRA 58	210
	INRA 393	270
	INRA 424	1,140
	INRA 381	1,120
	INRA 367	2,700
	INRA 365	430

^a Level of fumonisins (FB₁ plus FB₂) (in milligrams per kilogram of dry matter) produced by a *Fusarium* strain inoculated on sterilized maize kernels (a_w, 1; 25°C) after 21 days of incubation.

acterization was performed using the API 50 CHL test described by Tamminen et al. (39) with few modifications. The purified strain was cultivated on MRS agar plate at 30°C in anaerobic jars, and grown colonies were resuspended in one-quarter-strength Ringer's solution (Merck). The turbidity of the suspension was determined by the McFarland method according to the instructions provided by the manufacturer. The cell suspension was dispensed into API 50 CHL strip wells, which were coated with paraffin oil. The strips were then incubated at 30°C. The result was read after 24 h and checked after 48 h. Fermentation of carbohydrates in the carbohydrate medium was indicated by a yellow color except for esculin (dark brown). Color reactions were scored according to a chart provided by the manufacturer.

Physiological characterization was achieved by studying the growth conditions of the selected isolate in MRS broth at different temperatures (10, 30, 37, and 45°C) and pH values (4.4 and 9.6) and with different concentrations of NaCl (6.5 and 18%) at 30°C for 48 h. Growth was determined in terms of turbidity. The following scale was used: a minus sign (-) means a negative result, and a plus sign (+) indicates a positive result.

Identification by 16S rRNA gene sequencing. Preparation of genomic DNA was performed using the method reported by Hyronimus et al. (14). The 16S rRNA gene fragments were amplified by PCR using the universal primers 20F (5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3') and 1500R (5'-GGTTACCTTGTTAC-GACTT-3'), which amplify a maximum number of nucleotides in 16S rRNA genes from a wide variety of bacterial taxa (40). Databases (GenBank) were scanned for sequences similar to those obtained.

Spectrum of antifungal activity. The overlay method described above was used to monitor the ability of the efficient isolate to repress the growth of a large panel of *F. proliferatum* and *F. verticillioides*, previously characterized for their high production of fumonisins after inoculation on sterilized maize kernels in our laboratory (Table 1).

Production of antifungal metabolites. The most efficient isolate was assayed for production of active antifungal metabolites in MRS broth. Culture grown overnight was used to inoculate 600 ml of MRS broth (1%, vol/vol) and incubated at 30°C for

TABLE 2. Screening of antifungal activity of lactic acid bacteria isolates

Isolate	Antifungal activity against ^a :		Source
	<i>F. proliferatum</i> INRA 58	<i>F. verticillioides</i> INRA 62	
L001	+	+	Maize grain (rotten)
L002	-	-	Maize grain (rotten)
L003	+	+	Maize grain (rotten)
L004	+	+	Maize leaf (rotten)
L005	++	++	Maize leaf (rotten)
L006	+++	+++	Maize leaf (rotten)
L007	++	++	Maize ear (rotten)
L008	-	-	Maize stem (rotten)
L009	+	+	Maize leaf (rotten)
L010	-	-	Maize leaf (rotten)
L011	-	-	Maize leaf (rotten)
L012	+	+	Maize leaf (rotten)
L013	-	-	Maize leaf (2 mo old)
L014	+	+	Maize root (2 mo old)
L015	+	+	Maize root (1 mo old)
L016	+	+	Maize root (2 mo old)
L017	+	+	Maize root (2 mo old)
L018	+	+	Maize root (2 mo old)
L019	++	+	Maize leaf (2 mo old)
L020	+	+	Maize leaf (2 mo old)
L021	+	+	Maize stem (2 mo old)
L022	+	+	Maize stem (2 mo old)
L023	+	+	Maize root (2 mo old)
L024	+	+	Maize root (1 mo old)
L025	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L026	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L027	+	+	Maize leaf (1 mo old)
L028	+	+	Maize leaf (1 mo old)
L029	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L030	+	++	Maize leaf (1 mo old)
L031	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L032	++	+	Maize leaf (1 mo old)
L033	+	+	Maize grain (sound)
L034	++	+	Maize grain (sound)
L035	+	+	Maize grain (sound)
L036	-	+	Maize grain (sound)
L037	+	+	Maize grain (sound)
L038	+++	+	Maize grain (sound)
L039	+++	+	Maize grain (sound)
L040	+	+	Maize grain (sound)
L041	+	+	Maize grain (sound)
L042	+	+	Maize grain (sound)
L043	++	+	Maize grain (sound)
L044	+	+	Maize grain (sound)
L045	+++	+	Maize grain (sound)
L046	+	+	Maize grain (sound)
L047	++	+++	Maize grain (sound)
L048	++	+	Maize grain (sound)
L049	+	+	Maize grain (sound)
L050	++	+	Maize grain (sound)
L051	+	+	Maize grain (sound)
L052	++	+	Maize grain (sound)
L053	+	+	Maize grain (sound)
L054	+	+	Maize ear (old)
L055	++	+	Maize ear (old)
L056	++	+	Maize ear (old)

TABLE 2. Continued

Isolate	Antifungal activity against ^a :		Source
	<i>F. proliferatum</i> INRA 58	<i>F. verticillioides</i> INRA 62	
L057	++	+	Maize ear (old)
L058	++	+	Maize ear (old)
L059	+	+	Maize ear (old)
L060	+	+	Maize root (old)
L061	++	+	Maize root (old)
L062	+	+	Maize root (old)
L063	-	-	Maize leaf (old)
L064	++	+	Maize leaf (old)
L065	++	+	Maize stem (old)
L067	+	+	Maize stem (old)

^a +, no fungal growth on 0.1 to 3% of the plate area per bacterial streak; -, no suppression of fungal growth; ++, no fungal growth on 3 to 8% of the plate area per bacterial streak; + + +, no fungal growth on >8% of plate area per bacterial streak.

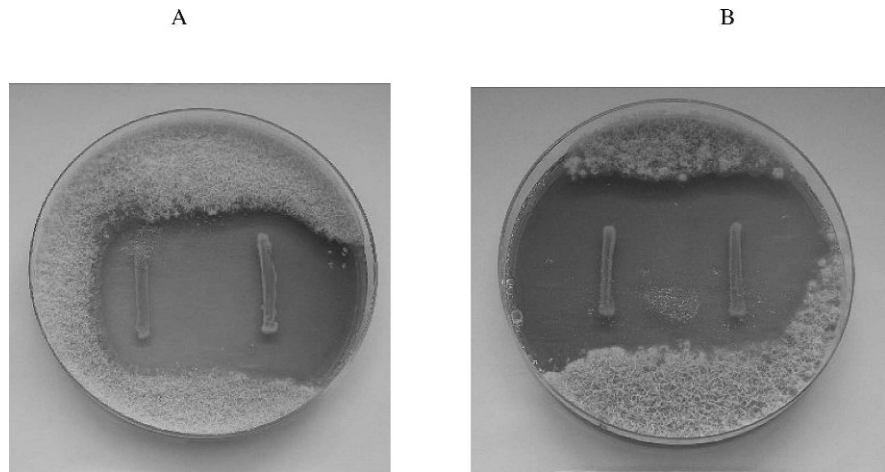
120 h. Samples were first taken at 2-h intervals and later at 24-h intervals at the end of the exponential growth phase. Samples were analyzed for pH, cell growth (optical density at 600 nm), and antifungal activity of cell-free supernatant. The cell-free supernatant was obtained by use of the protocol described by Sathe et al. (35). Antifungal activity of the supernatant was evaluated by the method described by Cabo et al. (3) with a number of modifications. A 2-ml aliquot of the supernatant culture was mixed with 15 ml of double-concentrated PDA and poured onto a plate. After drying, 3 µl of mold spore suspension (10⁶ spores per ml) was spotted onto the agar, and the plates were incubated at 25°C for 5 days. The diameter of the fungal colony was measured and compared with that of a control in which supernatant was replaced by sterile water. The antifungal activity was expressed in terms of inhibition of colony growth, defined as $I = 1 - (D_s/D_c)$, where D_s is the colony diameter of the sample and D_c is the colony diameter of the control. The experiments were performed in triplicate.

Metabolite characterization. To determine the heat stability of antifungal metabolites, a 10-ml aliquot of cell-free supernatant was subjected to heat treatment at 50, 70, and 90°C for 1 h in a water bath and 120°C for 20 min in an autoclave. Cell-free supernatants were then placed on ice, and residual antifungal activity was evaluated using the method described above.

To determine the effect of pH, 10 ml of filter-sterilized (0.22-µm pore size; Millipore) cell-free supernatant fluid was subjected to different pH values (3, 4, 5, 6, 7, and 8) before evaluating the antifungal activity by the method described above. The pH of the cell-free culture supernatant was adjusted with 1 M HCl and 2 M NaOH.

The sensitivity of cell-free culture supernatant to proteolytic enzymes was examined using the following enzymes: trypsin (pH 8.1), pepsin (pH 2.1), α-chymotrypsin (pH 7.5), and proteinase K (pH 8.5). A 10-ml aliquot of cell-free supernatant was adjusted with 1 M HCl and 2 M NaOH to the optimum pH of enzyme activities mentioned above. The supernatants were then treated with 1,000 µg of the enzyme per ml and incubated at 37°C for 1 h. All enzymes were provided by Sigma Chemical (France). Following incubation, the supernatants were heated at 70°C for 20 min to inactivate the remaining enzyme, and the pH was readjusted to the initial pH of 3.8. Residual antifungal activity of

FIGURE 1. Inhibition of *F. verticillioides* INRA 62 (A) and *F. proliferatum* INRA 58 (B) by *Pediococcus pentosaceus* (strain L006).



the cell-free culture supernatant was determined by the method described above.

To determine if production of lactic acid was solely responsible for the growth inhibition of *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, different solutions of lactic acid ranging from 1 to 20 g/liter were prepared in sterile distilled water adjusted to pH 3.8 with 2 M NaOH. The inhibitory effect of these solutions was tested using the method described above. All these experiments were performed in triplicate.

Partial purification of the antifungal metabolites. Cell-free supernatant of *Pediococcus pentosaceus* (strain L006) was 10-fold concentrated by freeze-drying and filtered through a 0.22- μ m-pore-size Millipore filter. A 2-ml sample was loaded onto a Biogel P2 column (16-cm length, 12-cm inside diameter, 55-ml bed) equilibrated with a pH 4.4 acetate 40 mM buffer. The elution rate was 20 ml h⁻¹, and 3-ml fractions were collected. The eluate was monitored at 230, 260, and 280 nm. According to the absorbance monitoring, five pools of 3-ml fractions were collected. Each pool was 20-fold concentrated by freeze-drying and analyzed for its antifungal activity by using a well agar diffusion assay adapted from Effat et al. (10) and *F. proliferatum* INRA 58 as indicator fungus. Briefly, molten PDA was transferred to petri dishes and allowed to solidify. An aliquot of 0.2 ml of spore suspension (10⁶ spores per ml) of *F. proliferatum* INRA 58 was transferred to PDA plates and spread uniformly over the agar surface. Wells with a 9-mm diameter were cut in the agar by use of a sterile stainless tube. An aliquot of 150 μ l of concentrated eluate was added to the wells and allowed to diffuse into the agar at 4°C for 24 h followed by aerobic incubation at 25°C for 72 h. Antifungal activities were measured by the inhibition zones formed around each well. All assays were performed in triplicate. Uninoculated MRS broth was used as a negative control. Two milliliters of 10-fold-concentrated MRS was fractionated by the same procedure, and collected fractions were examined for their antifungal activity.

The gel filtration column was also calibrated with a molecular mass calibration mixture containing tyrosine (180 Da), dCTP (490 Da), vitamin B₁₂ (1,360 Da), and cytochrome *c* (12,400 Da). Absorbance at 280 nm was determined on each 1-ml fraction.

RESULTS

Isolation and screening of lactic acid bacteria for antifungal activity. Sixty-seven presumptive colonies of lactic acid bacteria were isolated on MRS agar. According to microscopic observations, 2% of them were identified as

rods, 22% as short rods, and 76% as cocci. As indicated in Table 2, 60 (89%) of these isolates were able to repress the growth of *F. proliferatum* INRA 58 and *F. verticillioides* INRA 62. Six isolates designated L002, L008, L010, L011, L013, and L063 have no effect on *Fusarium* growth. Two isolates (L005 and L007) have only a slight effect against both indicator strains. The isolate showing the most efficient antifungal activity was L006; *F. proliferatum* INRA 58 was more sensitive than *F. verticillioides* INRA 62 (Fig. 1). L006 was isolated from maize leaf.

Characterization and identification of the isolate L006. As indicated in Table 3, isolate L006 was able to grow at 10 and 45°C, at pH 4.4 and 9.6, and at 6.5% NaCl. However, this isolate cannot grow in medium supplemented with 18% NaCl. Fermentation of different carbohydrates performed with the API 50 CHL system (API bioMérieux) revealed that isolate L006 was able to ferment 18 sugars. Identification conducted by the API database correlation indicated that this isolate (L006) could be *P. pentosaceus*. Nucleotide sequences of 16S rRNA genes of the isolate L006 were used to confirm biochemical species identification. Analysis of the 16S rRNA gene sequence indicated a 100% sequence identity with a *P. pentosaceus* ATCC 25745 sequence. We therefore concluded that isolate L006 is *P. pentosaceus*.

Spectrum of antifungal activity. The antifungal spectrum of *P. pentosaceus* (strain L006) against a large panel of strains, including five species of *F. proliferatum* and *F. verticillioides*, was monitored by the overlay method (Table 4). The inhibitory activity spectrum of *P. pentosaceus* (strain L006) against fumonisin producers appeared to be significantly wide because this strain was able to repress the growth of all the fungal strains used as target organisms.

Production of antifungal metabolites. The relationship between cell growth, pH, and antifungal production during the growth of *P. pentosaceus* (strain L006) in MRS broth (at 30°C) was determined. Results are summarized in Figure 2. It appears that antifungal activity increases with the incubation period. Antifungal activity was first detected

TABLE 3. Physiological and biochemical characteristics of *P. pentosaceus* (strain L006)

Characteristic	Profile of the isolate (L006) ^a
Growth at:	
10°C	+
30°C	+
37°C	+
45°C	+
Growth in NaCl concn of:	
6.5%	+
18%	-
Growth at pH:	
4.4	+
9.6	+
Fermentation of:	
L-Arabinose	+
Ribose	+
Galactose	+
Glucose	+
Fructose	+
Mannose	+
Rhamnose	+
N-Acetylglucosamine	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
Cellobiose	+
Maltose	+
Trehalose	+
Gentiobiose	+
Tagalose	+
Gluconate	+

^a +, positive result; -, negative result.

after 8 h of incubation, when the culture was at the end of its logarithmic phase, and was optimal at the end of the incubation period (120 h), when the culture was at the end of its stationary-phase growth, suggesting that antifungal

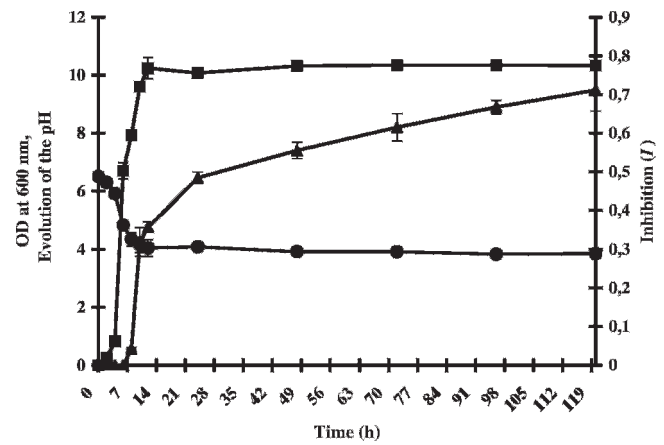


FIGURE 2. Production of antifungal substance by *P. pentosaceus* (strain L006). Relationship between cell density (■), pH (●), and antifungal activity (▲) during growth in MRS at 30°C over 96 h.

substances could be secondary metabolites. In addition, during the incubation period (120 h), the pH declined from 6.5 to 3.8; this decrease of pH was associated with an increase of antifungal activity.

Metabolite characterization. As indicated in Figure 3, cell-free supernatant of the test culture, heated in bath water or autoclaved at 120°C for 20 min, retains full inhibitory activity against both indicator strains, suggesting that antifungal activity of *P. pentosaceus* (strain L006) is heat stable. As it is shown in Figure 4, treatment of the cell-free supernatant with some proteolytic enzymes such as trypsin, pepsin, α-chymotrypsin, and proteinase K does not affect the antifungal activity of the cell-free supernatant. However, results reported in Figure 5 demonstrate that antifungal activity of the cell-free supernatant rapidly decreases when the pH increases, indicating that the efficiency of the antifungal metabolite(s) is pH dependent.

In order to clarify the potential involvement of lactic acid in the inhibitory effect exhibited by *P. pentosaceus* L006, several concentrations of lactic acid ranging from 1 to 20 g/liter were assayed. The results are reported in Figure 6.

TABLE 4. Antifungal spectrum of *P. pentosaceus* (strain L006) as determined by the overlay technique

Species of <i>Fusarium</i>	Strain	Toxicogenic potential (mg kg ⁻¹)	Inhibition by L006 ^a
<i>F. verticillioides</i>	INRA62	5,400	+++
	INRA 363	1,330	++
	INRA 369	1,830	++
	INRA 371	2,190	++
	INRA 368	2,670	++
	INRA 382	1,600	++
<i>F. proliferatum</i>	INRA 58	210	+++
	INRA 393	270	++
	INRA 424	1,140	++
	INRA 381	1,120	++
	INRA 367	2,700	++
	INRA 365	430	++

^a + + +, no fungal growth on >8% of plate area per bacterial streak; + +, no fungal growth on 3 to 8% of the plate area per bacterial streak.

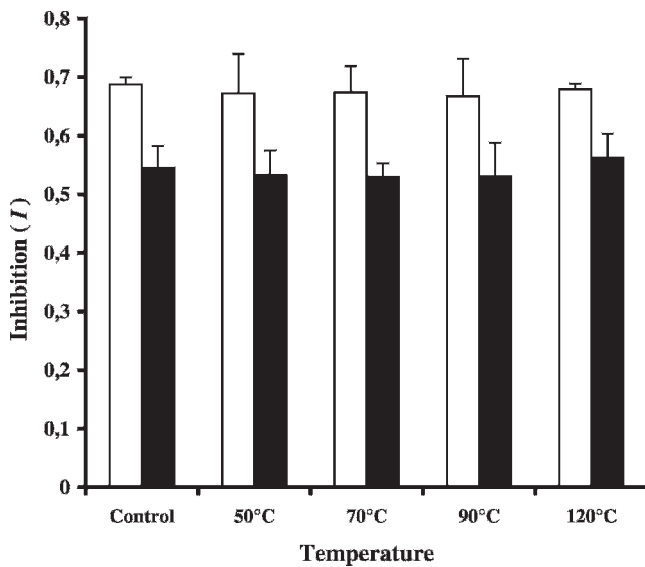


FIGURE 3. Effect of heat on the antifungal activity exhibited by *P. pentosaceus* (strain L006) against *F. proliferatum* INRA 58 (□), and *F. verticillioides* INRA 62 (■).

Even for the higher concentration, i.e., 20 g/liter, the growth-inhibitory effect resulting from lactic acid supplementation was very weak, lower than 0.05. Lactic acid did not cause inhibition of *F. verticillioides*. This result indicated that inhibition of *F. verticillioides* and *F. proliferatum* growth by *P. pentosaceus* strain L006 cannot be ascribed to the sole occurrence of lactic acid in cell-free supernatant.

Partial purification of the antifungal metabolites.

Filtered and 10-fold-concentrated supernatant of *P. pentosaceus* L006 was fractionated by using Biogel P2, which has a maximum 1,800-Da molecular mass exclusion. According to the results of the absorbance monitoring, five pools of 3-ml fractions were defined and labeled P1, P2, P3, P4, and P5, and their efficiency in inhibiting the growth of INRA 58 *F. proliferatum* strain was assessed (Fig. 7). No antifungal activity was recovered in the eluate corresponding to the dead volume of the column (P1). Active compounds were eluted in the two P2 and P3 groups of fractions, which after

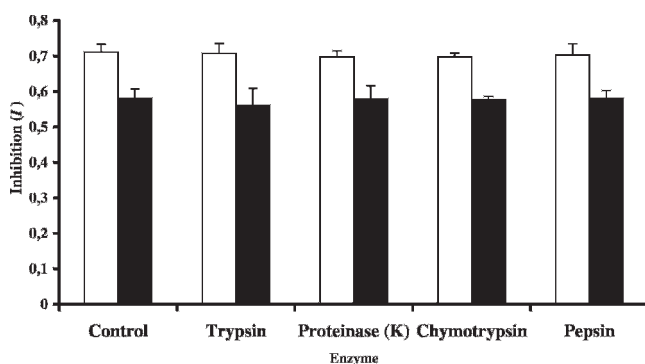


FIGURE 4. Effect of proteolytic enzymes on the antifungal activity exhibited by *P. pentosaceus* (strain L006) against *F. proliferatum* INRA 58 (□) and *F. verticillioides* INRA 62 (■).

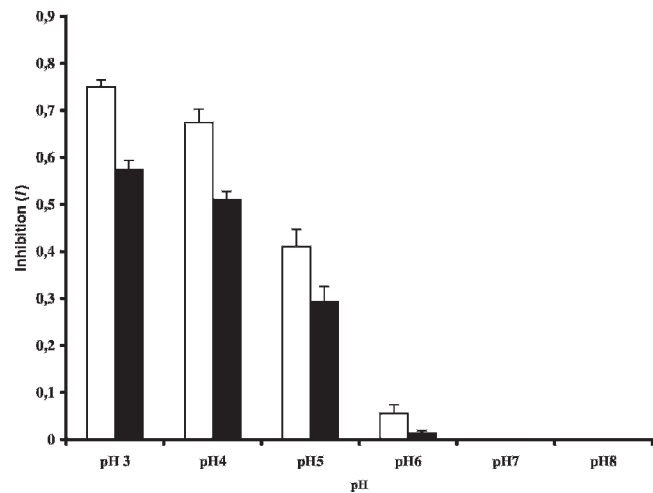


FIGURE 5. Effect of pH on the antifungal activity exhibited by *P. pentosaceus* (strain L006) against *F. proliferatum* INRA 58 (□) and *F. verticillioides* INRA 62 (■).

calibration of the column, were characterized by a molecular mass between 1,400 and 1,800 Da for P2 and 500 and 1,400 Da for P3. In order to provide a negative control, fractionation was performed with uninoculated MRS broth. The eluted fractions were unable to inhibit the growth of *F. proliferatum* INRA 58 (data not shown).

DISCUSSION

Maize, a staple food in many countries, is frequently contaminated by *F. proliferatum* and *F. verticillioides*. These two molds are the main producers of fumonisins. The toxicity of fumonisins to some animals is well documented. In addition, the International Agency for Research on Cancer has evaluated these toxins as “Group 2B carcinogens,” probably carcinogenic to humans (30). Therefore, it

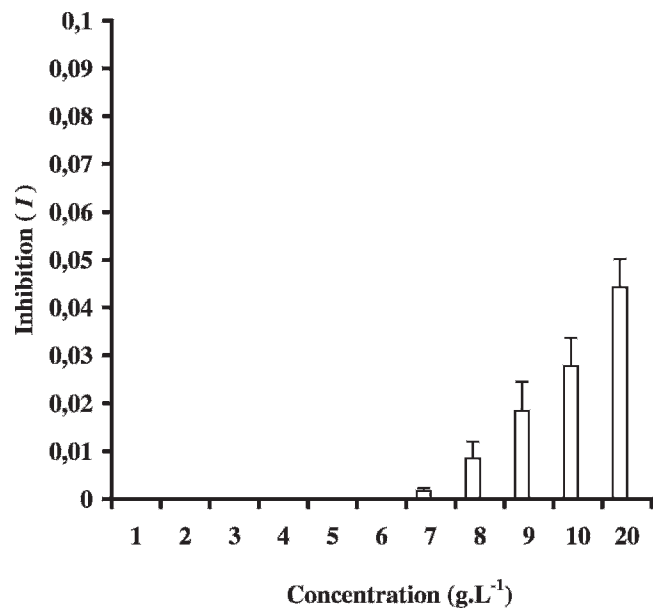


FIGURE 6. Effect of lactic acid on the growth of *F. proliferatum* INRA 58 (□) and *F. verticillioides* INRA 62 (■).

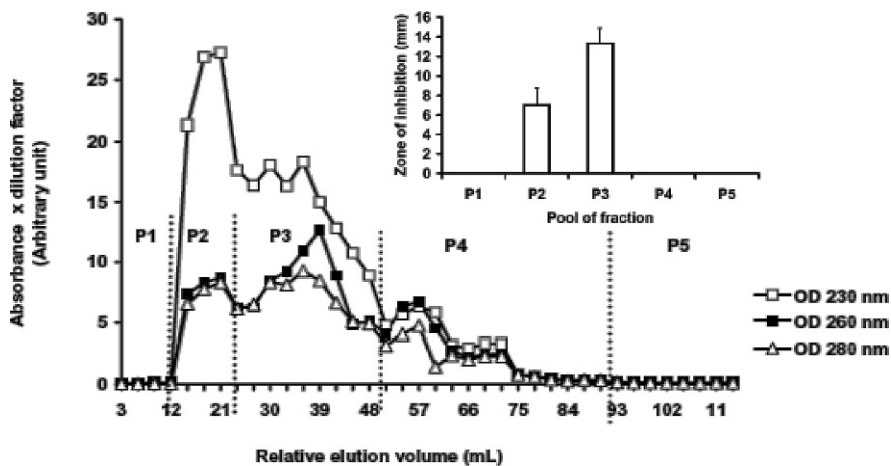


FIGURE 7. Elution profile of a culture filtrate of *P. pentosaceus* (strain L006) grown in MRS broth for 120 h from a Biogel P2 gel filtration column. Absorbance at 230 nm (\square), 260 nm (\blacksquare), and 280 nm (\triangle) was determined for each fraction. Inset shows the effect of the pools of fractions (P1, P2, P3, P4, and P5) on the growth of *F. proliferatum* INRA 58.

is essential to manage and control the presence of fumonisins in maize and maize products. Among the potent biological antagonists that could be used, lactic acid bacteria appear to be efficient biocontrol agents. Their antibacterial activities are well documented, whereas few reports have been published about their antifungal activity.

In this study, lactic acid bacteria were isolated from the maize environment and tested for their potential to suppress fumonisin-producing fungal growth. According to some authors, using the target environment as a source for screening biocontrol organisms could lead to the isolation of efficient agents that could be more adapted to that environment (16). This approach has been used in several investigations (2, 27). Our results clearly indicated that maize samples contained large numbers of different lactic acid bacteria. Assays for antagonism against *F. proliferatum* INRA 58 and *F. verticillioides* 62 revealed that most of them (89%) had the potential to control both phytopathogens. The most promising bacterium isolated with a strong antifungal activity was identified as *P. pentosaceus* (strain L006). This isolate seems to be particularly resistant to stress conditions, since it was able to grow at extreme pH (4.4 and 9.6) and temperature (10 and 45°C). This is in agreement with results reported by Sathe et al. (35), who isolated potent antifungal lactic acid bacteria from fresh vegetables. Most of them were identified as *P. pentosaceus* and were able to grow under the same conditions as described above. The fact that *P. pentosaceus* (strain L006) was able to develop under stress conditions is advantageous because this microorganism could be used under practical conditions to control mycotoxinogenic mold growth.

Other environmental isolates belonging to the *P. pentosaceus* species have previously been reported to be potent antifungal agents (23, 32). However, the present results provide the first evidence for activity of *P. pentosaceus* (strain L006) as an inhibitor of fumonisin-producing fungal growth. In fact, the antifungal spectrum of this organism evaluated against a broad panel of fumonisin producers indicated that *P. pentosaceus* (strain L006) was able to exhibit strong antagonism against a large panel of targeted strains (Table 4). Furthermore, this broad spectrum is a significant advantage for using *P. pentosaceus* (strain

L006) in biological control to inhibit fumonisin-producing fungal growth.

According to the results concerning the production of antifungal metabolites in MRS broth by *P. pentosaceus* (strain L006), antifungal activity was not growth dependent and was maximal at the end of the stationary growth phase. These data suggested that the antifungal compounds could be secondary metabolites that may be released during cell lysis. Our results could be compared to those reported by De Muynck et al. (8), who obtained a high antifungal activity from *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, and *L. plantarum* after 120 h of incubation. In contrast, our findings are not in agreement with those reported for *L. plantarum* CUK 501 (35) and *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* Si3 (22). Production of antifungal substances by the former bacteria began during the exponential growth phase and reached a maximum early in the stationary phase, after which the activity rapidly decreased, suggesting that the production of antifungal compound is growth dependent. The observed decrease in antifungal activity after a long period of incubation was reported to be the result of a proteolytic degradation, of the absorption of the antifungal metabolite to the producer cells, or of the formation of spontaneous aggregates (22). According to Sathe et al. (35), the metabolites produced by *L. plantarum* CUK 501 could be peptide compounds. Similar kinetics have been reported for the production of certain bacteriocins (21), some of which are considered to be antimicrobial peptides produced by certain lactic acid bacteria (4, 6). In our study, the lack of decline in antifungal activity during the incubation period indicates that the major antifungal compounds produced by *P. pentosaceus* (strain L006) do not have the same physicochemical properties as those reported by Sathe et al. (35) and Magnusson and Schnürer (22).

Heat and proteolytic treatment did not affect the antifungal activity exhibited by *P. pentosaceus* (strain L006). This suggests that antifungal metabolites produced by this strain are not proteinaceous compounds. Therefore, the fact that the antifungal activity was completely lost when the pH of the supernatant was neutralized to pH 7 is in accordance with the hypothesis that organic acids and low pH could be responsible for the reported inhibition. The

inhibitory activity of organic acids can result either from a specific effect on some fungal metabolic activities or from the acidification of the cytoplasm. Several authors have reported the contribution of organic acid to the antifungal activity of lactic acid bacteria (7, 13, 36). The antifungal activity displayed by *L. sanfranciscensis* CB1 was ascribed to various organic acids such as acetic, caproic, propionic, formic, butyric, and *n*-valeric acids, acting synergistically (7). Recently, Gerez et al. (11) suggested that the major antifungal compounds produced by *L. plantarum* CRL 778, *L. reuteri* CRL 1100, and *L. brevis* CRL 772 and CRL 796 against bread mold spoilage were acetic and phenyllactic acids. However, our results have indicated that lactic acid, which is the predominant organic acid produced by homofermentative lactic acid bacteria including the *P. pentosaceus* strain (1), was unable to significantly suppress the growth of the fungal indicator strains, even at a concentration as high as 20 g/liter. The weak efficiency of lactic acid to inhibit the growth of *Fusarium* strains has previously been reported by Corsetti et al. (7), who showed that lactic acid did not cause inhibition of *F. graminearum*.

According to Laitila et al. (18) the antifungal activity of lactic acid bacteria can be related to several factors. Thus, organic acids produced by lactic acid bacteria were shown to activate other components such as peptide compounds that are efficient at low pH (8). The same conclusion was reached by Magnusson and Schnürer (22), who demonstrated that the antifungal metabolite produced by *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* was a small peptide with a pH-dependent efficiency. Further study is therefore required to elucidate the real chemical nature of the antifungal metabolite(s) produced by *P. pentosaceus* (strain L006). First results obtained after fractionation of the L006 cell-free supernatant using a gel filtration step (BioGel P-2; Bio-Rad), revealed the occurrence of several antifungal metabolites. Among them, compounds characterized by a molecular mass ranging from 500 to 1,400 Da showed an efficient inhibitory activity. In order to identify their structure, further purification of these active compounds using ionic exchange and liquid chromatography preparative methods is under way.

Our data demonstrate that lactic acid bacteria isolated from the maize environment are efficient antifungal agents. Among these, one isolate was characterized by a high antagonism against fumonisin-producing fungi and identified as *P. pentosaceus* (strain L006). Considering the low pH necessary for the optimal activity of this strain, use of strain L006 could be suitable for the ensiling experiments. By rapidly lowering the pH and producing specific antifungal metabolites that repress the growth of fumonisin producers, *P. pentosaceus* (strain L006) could improve silage quality.

The present study suggests that the use of lactic acid bacteria offers a promising potential alternative as a natural biocontrol agent. However, the results obtained at laboratory scale need to be confirmed under more practical conditions. In addition, more study is needed to study the effect of this promising antifungal lactic acid isolate on fumonisin

accumulation and to investigate its ability to remove this toxin.

ACKNOWLEDGMENTS

These results are part of Doguiet Dalie's Ph.D. project financially supported by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique" of Côte d'Ivoire, as part of the Integrated Research Project "Qualité Sanitaire des Aliments en Aquitaine 2006–2008." The authors thank the technical staff of the Mycology and Food Safety unit (MycSA-INRA, Bordeaux, France) for their assistance. The authors are grateful to Pr. Maria URDACI (ENITA, Bordeaux) for the genotyping identification of the best isolate (L006).

REFERENCES

1. Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology, p. 1–72. In S. Salminen and A. Von Wright (ed.), *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
2. Bleve, G., F. Grieco, G. Cozzi, A. Logrieco, and A. Visconti. 2006. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* on grape. *Int. J. Food Microbiol.* 108:204–209.
3. Cabo, M. L., A. F. Braber, and P. M. F. J. Koenraad. 2002. Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *J. Food Prot.* 65:1309–1316.
4. Caplice, E., and F. Gerald. 1999. Food fermentation: role of microorganisms in food and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50:131–149.
5. Chen, Y.-S., F. Yanagida, and T. Shinohara. 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:195–200.
6. Cleveland, J., T. Montville, F. Nes, and M. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71:1–20.
7. Corsetti, A., M. Gobetti, J. Rossi, and P. Damiani. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:253–256.
8. De Muynck, C., A. I. J. Leroy, S. de Maeseneire, F. Arnaut, W. Soetaert, and E. J. Vandamme. 2004. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol. Res.* 159:339–346.
9. Duvick, J. 2001. Prospects for fumonisin contamination of maize through genetic modification. *Environ. Health Perspect.* 109:337–342.
10. Effat, B. A., G. A. Ibrahim, N. F. Tawfik, and O. M. Sharaf. 2001. Comparison of antifungal activity of metabolites from *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus acidilactici* and *Propionibacterium thoenii*. *Egyptian J. Dairy Sci.* 29:251–262.
11. Gerez, C. L., T. M. I. Torino, G. Rollan, and G. F. de Valdez. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control* 20:144–148.
12. Gourama, H. 1997. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 30: 279–283.
13. Hassan, Y. I., and L. B. Bullerman. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* against *Fusarium proliferatum* and *Fusarium graminearum* in a liquid culture setting. *J. Food Prot.* 71:2213–2216.
14. Hyronimus, B., C. le Marrec, and M. C. Urdaci. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans*. *J. Appl. Microbiol.* 85:42–50.
15. Jones, R. J., H. M. Hussein, M. Zagorec, G. Brightwell, and J. R. Tagg. 2008. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.* 25:228–234.

16. Kerry, B. R. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:423–441.
17. Knoll, C., B. Divol, and M. du Toit. 2008. Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes. *Food Microbiol.* 25:983–991.
18. Laitila, A., H. L. Alakomi, L. Raaska, T. Mattila-Sandhom, and A. Haikara. 2002. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *J. Appl. Microbiol.* 93:566–576.
19. Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, and M. Gobetti. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21 B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4084–4090.
20. Lavermicocca, P., F. Valerio, and A. Visconti. 2003. Antifungal activity of phenyl-lactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 634–640.
21. Lejeune, R., K. Callewaert, K. Crabbé, and L. De Vuyst. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *J. Appl. Microbiol.* 84:159–168.
22. Magnusson, J., and J. Schnürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1–5.
23. Magnusson, J., K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, and J. Schnürer. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:129–135.
24. Mandal, V., S. K. Sen, and N. C. Mandal. 2007. Detection, isolation and partial characterization of antifungal compound(s) produced by *Pediococcus acidilactici* LAB 5. *Nat. Prod. Commun.* 2:671–674.
25. Meroth, B., J. Walter, C. Hertel, and M. Brandt. 2003. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:475–482.
26. Munkvold, G. P., and A. E. Desjardins. 1997. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81:556–565.
27. Okigbo, R. N. 2005. Biological control of postharvest fungal rot of yam, (*Dioscorea spp.*) with *Bacillus subtilis*. *Mycopathology* 159: 307–314.
28. Palumbo, D. J., L. T. O’Keeffe, and K. H. Abbas. 2007. Isolation of maize soil and rhizosphere bacteria with antagonistic activity against *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *J. Food Prot.* 70: 1615–1621.
29. Pinto, A. L., M. Fernandes, C. Pinto, H. Albano, F. Castilho, P. Teixeira, and P. A. Gibbs. 2009. Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 129:50–58.
30. Rheeder, P. J., O. F. W. Marasas, and F. H. Vismer. 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2101–2105.
31. Rouse, S., C. Canchaya, and D. van Sinderen. 2008. *Lactobacillus hordei* sp nov., a bacteriocinogenic strain isolated from malted barley. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2013–2017.
32. Rouse, S., D. Harnett, A. Vaughan, and D. van Sinderen. 2008. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J. Appl. Microbiol.* 104:915–923.
33. Rouse, S., and D. van Sinderen. 2008. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *J. Food Prot.* 71:1724–1733.
34. Roy, U., V. K. Batish, S. Grover, and S. Neelakantan. 1996. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *Int. J. Food Microbiol.* 32:27–34.
35. Sathe, S. J., N. N. Nawani, P. K. Dhakephalkar, and B. P. Kapadnis. 2007. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 103:2622–2628.
36. Schnürer, J., and J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16:70–78.
37. Sjögren, J., J. Magnusson, A. Broberg, J. Schnürer, and L. Kenne. 2003. Antifungal 3-hydroxyl fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7554–7557.
38. Ström, K., J. Sjögren, A. Broberg, and J. Schnürer. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4322–4327.
39. Tamminen, M., T. Joustsjoki, M. Sjöblom, M. Joutsen, A. Palva, E.-L. Ryhänen, and V. Joustsjoki. 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Let. Appl. Microbiol.* 39:439–444.
40. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697–703.
41. Yates, I. E., F. Meredith, W. Smart, C. W. Bacon, and A. F. Jaworski. 1999. *Trichoderma viride* suppresses fumonisin B₁ production by *Fusarium moniliforme*. *J. Food Prot.* 62:1326–1332.

<p style="text-align: center;">Membres de jury</p> <p>Présidente : Dr. Alioua S. Examinatrice : Dr. Aitmeddour A. Promotrice : Mme. Benhamada N.</p>	<p style="text-align: center;">Production de substances antifongiques par les bactéries lactiques</p> <p style="text-align: center;">Année universitaire : 2019/2020</p>	<p style="text-align: center;">Présenté par</p> <p style="text-align: center;">Adouani Soumia Bouzout Latifa</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Résumé

La bio-conservation des aliments est fondée sur l'utilisation de micro-organismes et/ou leurs métabolites pour faire retarder ou inhiber la croissance des microorganismes contaminants. L'activité antifongique des bactéries lactiques est l'une des propriétés biologiques recherchée. L'hypothèse d'une prévention de la croissance des organismes producteurs de mycotoxines par des bactéries lactiques moins agressives pourrait être une solution efficace et saine. En effet, ces souches peuvent produire un vaste spectre de métabolites antifongiques pour inhiber la croissance des moisissures, elles ont la capacité d'adsorber, de dégrader ou de détoxifier les mycotoxines fongiques, cela en fait de bonnes alternatives aux produits chimiques utilisés pour la conservation des aliments.

Abstract

The bio-preservation of food is based on the use of microorganisms and/or their metabolites to delay or inhibit the growth of contaminating microorganisms. The antifungal activity of lactic acid bacteria is one of the desired biological properties. The hypothesis of prevention of the growth of mycotoxin-producing organisms by less aggressive lactic acid bacteria could be an effective and healthy solution. Indeed, these strains can produce a wide spectrum of antifungal metabolites to inhibit the growth of molds, they have the ability to adsorb, degrade or detoxify fungal mycotoxins, this make them good alternatives to chemicals used for the preservation of food.

ملخص

يعتمد الحفظ البيولوجي للأغذية على استخدام الكائنات الحية الدقيقة و/أو مستقلباتها لتأخير أو منع نمو الكائنات الدقيقة الملوثة. يعد النشاط المضاد للفطريات للبكتيريا اللبنية أحد الخصائص البيولوجية المرغوبة. يمكن أن تكون فرضية منع نمو الكائنات الحية المنتجة للسموم الفطرية بواسطة للبكتيريا اللبنية الأقل عدوانية حلاً فعالاً وصحياً. في الواقع، يمكن أن تنتج هذه السلالات مجموعة واسعة من المستقلبات المضادة للفطريات لمنع نمو الفطريات، ولديها القدرة على امتصاص السموم الفطرية أو تحللها أو إزالة السموم منها، مما يجعلها بدائل جيدة للمواد الكيميائية المستخدمة في الحفاظ على الطعام.