

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

**DÉVELOPPEMENT D'INGRÉDIENTS ANTIFONGIQUES À BASE
D'ANTIMICROBIENS DE SOURCES NATURELLES ET D'UN PROCÉDÉ
D'ENCAPSULATION POUR LE MAINTIEN DE LA QUALITÉ DE FROMAGE
RÂPÉ**

Par **Ghada Sassi**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître *ès sciences* (M.Sc.)
en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Etienne Yergeau
INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Valérie Orsat
Université McGill

Directeur de recherche

Monique Lacroix
INRS-Institut Armand-Frappier

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à ma directrice de recherche, Pr. **Monique Lacroix**, de m'avoir accueilli et donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire. Je la remercie pour son encadrement, ses conseils et ses critiques ainsi que ses directives qui étaient fructueuses pour l'accomplissement de ce travail.

J'exprime également mes vifs remerciements à **Stéphane Salmieri** pour l'aide précieuse et très appréciée qu'il m'a offert, pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses encouragements.

Je remercie également toute l'équipe du laboratoire RESALA avec qui ce fut un grand plaisir de travailler, et particulièrement **Chaima, Tofa** et **Jumana** pour leur immense gentillesse et leur soutien.

A mes chers **parents**, mon **frère** et ma **sœur**, aucun mot n'est susceptible d'exprimer la profondeur de mon amour et ma grande considération pour tous les sacrifices consentis avec dévouement pour mon éducation et mon bien être. Je leurs dois tous ce que j'ai appris et réalisé.

Un grand merci à mes chères amies **Marwa, Wafe, Amal, Emel, Mayssa, Dorra, Sabrine, Emna, Kenza** et **Mariem** pour leur soutien apprécié pour compléter ce travail.

Je tiens à remercier avec tout amour mon **compagnon** pour son soutien, sa motivation et son support tout le long de ma maîtrise, tu es le meilleur.

Finalement, à tous ceux qui m'ont aidé, et à tous ceux que j'aime, merci.

RÉSUMÉ

La préoccupation des consommateurs s'oriente de plus en plus vers les aliments verts, naturels dépourvus d'agents conservateurs artificiels. Ce comportement incite souvent les industriels à améliorer leurs produits afin de satisfaire les besoins de leurs consommateurs. C'est dans cette optique que les fromagers s'orientent et désirent introduire de nouvelles technologies et alternatives à la natamycine, fongicide utilisé pour la conservation du fromage rapé, afin de respecter la démarche « étiquette épurée » et de mieux se positionner dans le marché des produits naturels. Bien que la natamycine présente un effet antifongique apprécié sur les moisissures d'altération du fromage, son utilisation devient dépréciée avec l'apparition d'un sérieux problème lié au développement de la résistance aux antibiotiques qui se développe du jour en jour.

Dans cette étude, nous avons supposé que, premièrement, certains extraits naturels ont des propriétés antifongiques qui peuvent agir en synergie afin de réduire la croissance des moisissures d'altération du fromage râpé. Deuxièmement, l'encapsulation des formulations antifongiques est un procédé technologique efficace permettant le contrôle de l'activité biologique et de la biodisponibilité conduisant à une bonne protection de la matrice fromagère. À la lumière de cela, le présent travail vise à développer une formulation antifongique complexe et stable à base d'additifs naturels efficaces pour détruire une variété sélectionnée de moisissures d'altération de fromage rapé et un processus d'encapsulation correspondant tout en respectant la demande des consommateurs pour les produits "étiquette épurée" et ce, sans affecter la qualité organoleptique du produit fini.

Pour ce faire, tout d'abord, un criblage des meilleurs composés antifongiques naturels par analyses *in vitro* a été assuré. Onze composés (deux extraits d'agrumes et neuf huiles essentielles (HEs)) ont montré une moyenne à forte capacité inhibitrice par test de diffusion sur agar. La concentration minimale inhibitrice (CMI) de ces agents a été ensuite étudiée. Les résultats ont montré que deux extraits d'agrumes et six HEs ont fortement inhibé la croissance fongique à de très faibles concentrations. À partir de ces résultats, des combinaisons ont été formées pour évaluer les possibles effets synergiques par la méthode du Checkerboard. La formulation (Extrait d'agrumes A et L'HE de cannelle A) ayant présenté neuf (9) effets synergiques et un (1) effet additif avec les plus faibles concentrations d'inhibition a été considérée pour mettre au point une microémulsion antifongique stable par microfluidisation. La nanoémulsion contenant 0.75 (% p/p) d'émulsifiants (HLB 10) et 1 % (p/p) de formulation était la plus stable pendant 15 jours d'entreposage à 4°C. Celle-ci a été adaptée pour l'optimisation d'un procédé d'encapsulation en utilisant un isolat de protéines de lactosérum (WPI) et de la maltodextrine (MD). Le résultat a révélé que la formulation stabilisée, encapsulée avec le mélange WPI : MD (1 :3) dans des faibles conditions de microfluidisation

(2 cycles/11.500 psi) avait une meilleure stabilité (-40,5 mV), une taille de particules réduite (115 nm) et une bonne activité antifongique à faible concentration (315 ppm). Cette formulation a conduit à une meilleure efficacité d'encapsulation (91%) et a maintenu une concentration de composés bioactifs efficace contre *Paecilomyces.spp* pendant 28 jours de stockage (4°C) comparativement à la formulation non encapsulée (21 jours).

Par la suite, un procédé de séchage par atomisation (spray-drying) de la formulation antimicrobienne a été réalisé. La poudre obtenue a été caractérisée (dosage des phénols totaux, analyse structurale – FTIR, efficacité d'encapsulation et stabilité à l'oxydation). Le procédé de séchage par atomisation a permis de conserver 75% des composés phénoliques de la formulation antifongique développée induisant une bonne efficacité d'encapsulation de la formulation active totale (72.30%). La poudre développée a gardé une bonne stabilité à l'oxydation pendant 30 jours de stockage à 25°C et 60°C. L'analyse structurale de la formulation développée par FTIR a révélé que la présence d'agents bioactifs n'a pas affecté la structure des protéines et a induit une bonne stabilité du système d'encapsulation au niveau des interactions moléculaires.

Enfin, une analyse sensorielle des fromages traités par la formulation en poudre a eu lieu. Celle-ci a révélé que le traitement du fromage râpé par la formulation en poudre à des concentrations $\leq 2\text{g/kg}$ a été apprécié par rapport au contrôle. L'évaluation *in situ* de sa capacité antifongique sur de la mozzarella râpée par test de provocation a montré que, la formulation développée avait un effet inhibiteur similaire à la natamycine avec une réduction de Log 3.4 CFU/g au 56ème jour d'entreposage à 4°C. Le résultat du suivi de la durée de conservation de la mozzarella râpée, traitée avec la formulation bioactive (FP) et avec du Nataseen (FN), scellée sous azote (SL) et sous air (SA), a révélé que, le compte de la flore mésophile totale et des bactéries lactiques s'est maintenu relativement stable par rapport au témoin (F). Pour les groupes FP et FN, un début de croissance fongique a été noté au jour 35 pour l'emballage SA et au jour 56 dans l'emballage SL. Comparativement à F, la croissance fongique a commencé aux jours 21 et 49 dans les emballages SA et SL respectivement. Cette analyse a révélé que l'application de la formulation antifongique inhibait efficacement la croissance des levures et moisissures pendant 70 et 77 jours pour du fromage râpé stocké à 4 ° C pour les emballages SA et SL respectivement.

Les résultats obtenus pendant ce projet ont mis en évidence la possibilité de développer une formulation antifongique complexe, de sources naturelles qui peut être appliquée comme conservateur dans le fromage rapé afin de prévenir l'apparition des moisissures d'altération et le développement des mycotoxines. Celle-ci peut être une nouvelle alternative prometteuse à la natamycine. Ceci pourrait répondre aux désirs des consommateurs pour un produit naturel, sain et salubre.

ABSTRACT

Consumer concern is increasingly shifting towards green and natural foods devoid of artificial preservatives. This behavior encourages manufacturers to improve their products in order to meet their consumer's needs. Therefore, cheese makers want to introduce new technologies and alternatives to natamycin, a fungicide used for grated cheese, in order to respect the "clean label" approach and to lead in cheese markets. Although, Natamycin exhibits a good antifungal effect on cheese spoilage molds, its use is becoming less popular with the emergence of a serious problem related to the development of antibiotic resistance, which is growing day by day. In this study, we hypothesized to explore first, some natural extracts that have antifungal properties that may act synergistically to reduce the growth of grated cheese spoilage fungi. Secondly, the encapsulation of antifungal formulations is an effective technological process allowing the control of the biological activity and the bioavailability leading to a good protection of the cheese matrix. In light of this, the present work aims to develop, a complex and stable antifungal formulation based on effective natural compounds in order to destroy a selected variety of grated cheese spoilage molds, and a corresponding encapsulation process without affecting the organoleptic quality of the finished product. To do this, first of all, a screening of the best natural antifungal compounds via *in vitro* assays was carried out. Eleven compounds (two citrus extracts and nine essential oils (EOs)) showed moderate to strong inhibitory capacity by agar diffusion test. Then, the minimum inhibitory concentration (MIC) of these agents was studied. Results showed that two citrus extracts and six EOs strongly inhibited fungal growth at low concentrations. Based on this finding, combinations were formed to evaluate possible synergistic effects by the Checkerboard method. The formulation (Citrus extract A and Cinnamon EO A), having shown 9 synergistic and 1 additive effect with the lowest inhibition concentration, was considered to develop a stable antifungal microemulsion by microfluidization. The nanoemulsion containing 0.75 (% w/w) of emulsifiers (HLB 10) and 1% (w/w) of formulation was the most stable during 15 days of storage at 4° C. This was adapted for the optimization of the encapsulation process using whey protein isolate (WPI) and maltodextrin (MD). The result revealed that the stabilized formulation, encapsulated with the WPI: MD mixture (1:3) under low microfluidization conditions (2 cycles/11,500 psi) had a better stability (-40.5 mV), a reduced particle size (115 nm) and a good antifungal activity at low concentration (315 ppm). This formulation led to better encapsulation efficiency (91%) and maintained a concentration of bioactive compounds effective against *Paecilomyces.spp* for 28 days of storage (4°C) compared to the non-encapsulated formulation (21 days). Subsequently, a spray-drying process of the antimicrobial formulation was carried out. The obtained powder was then characterized (dosage of total phenol content, structural analysis – FTIR, encapsulation efficiency and oxidation stability). The spray-drying process made it

possible to retain 75% of the phenolic compounds of the antifungal formulation, leading to good encapsulation efficiency of the total active formulation (72.30%). The developed powder kept a good oxidation stability for 30 days of storage at 25°C and 60°C. The structural analysis of the formulation developed by FTIR revealed that the presence of bioactive agents did not affect the protein structure and induced good stability of the encapsulation system. Finally, a sensory analysis of grated mozzarella treated with the powder formulation was done. This revealed that, the cheese treated by the powder formulation at concentrations $\leq 2\text{g/kg}$ was appreciated compared to the control. *In situ* evaluation of its antifungal capacity by challenge test showed that the developed formulation had an inhibitory effect similar to natamycin, with a reduction of 3.4 log CFU/g on the 56th day of storage (4°C). Result of the shelf-life monitoring of grated mozzarella, treated with the bioactive formulation (FP) and with Nataseen (FN), sealed under nitrogen (SL) and under air (SA), showed that, the count of total mesophilic flora and lactic acid bacteria is maintained relatively stable compared to control (F). For the FP and FN groups, an onset of fungal growth started on day 35 in the SA packaging and on day 56 in the SL packaging. Comparatively, for the control group, growth started at days 21 and 49, respectively in SA and SL packaging. *In situ* evaluation revealed that the application of antifungal formulation was effective at inhibiting the growth of yeasts and molds during 70 and 77 days of grated cheese stored at 4°C for SA and SL packaging respectively.

The findings of this project highlighted the possibility of developing a complex antifungal formulation, based on natural sources, which can be applied as a preservative in grated cheese in order to prevent the appearance of spoilage molds and the development of mycotoxins. This may be a promising new alternative to natamycin and could meet consumer desires for a natural, wholesome and safe product.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTE DES FIGURES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xvii
CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Profil de l'industrie du fromage au Canada	2
1.2 Le fromage rapé.....	2
1.2.1 Définition et réglementation.....	2
1.2.3 Source et type d'altération.....	3
1.2.4 Solutions appliquées	4
1.3 Problématique du projet	5
1.4 Sélection des composés antifongiques de sources naturelles	5
1.4.1 Huiles essentielles	6
1.4.2 Réuterine	8
1.4.3 Acides organiques	8
1.4.4 Bactériocines	9
1.4.4.1 Bactériocines produites à partir de souches de <i>Lactobacillus</i>	10
1.4.4.2 Bacteriocines produites par les espèces <i>Bacillus spp</i>	10
1.5 Limites de l'application directe des composés antifongiques	10
1.6 Encapsulation d'ingrédients alimentaires par nanoémulsions simples	11
1.6.1 Nanoémulsions.....	12
1.6.1.1 Choix de type de nanoemulsion	12
1.6.1.2 Méthodes de préparation des nanoémulsions	12
- Méthodes à haute énergie : Exemple de microfluidisation	13
- Méthodes basse énergie : Exemple de méthodes d'inversion de phase.....	13
1.6.1.3 Propriétés des nanoémulsions	13
1.6.1.4 Selection d'émulsifiants de qualité alimentaire.....	14

1.6.1.5	Caractérisation des nanoémulsions	15
1.6.2	Choix de matrice d'encapsulation.....	16
1.6.2.1	Principe de séchage par atomisation	16
1.6.2.2	Principaux paramètres de séchage par atomisation	18
1.6.2.3	Principaux biopolymères adaptés pour le séchage par atomisation	19
1.7	Hypothèses, objectifs et moyens	20
1.7.1	Problématique.....	20
1.7.2	Hypothèses.....	21
1.7.3	Objectifs.....	21
1.7.4	Moyens pour atteindre les objectifs	22
	CHAPITRE 2: Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend.....	25
	Résumé.....	26
	Abstarct.....	28
2.1	Introduction.....	29
2.2	Materials and Methods	30
2.2.1	Materials	30
2.2.2	Preparation of fungal cultures	32
2.2.3	Preparation of antifungal emulsions	32
2.2.4	Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)	33
2.2.5	Antifungal effect of combined compounds using checkerboard method	33
2.2.6	Development of a stable antifungal emulsion	33
2.2.7	Physicochemical characterization of emulsions.....	34
2.2.8	Development of an encapsulation method	34
2.2.8.1.	Preparation of encapsulation matrix and optimization of microfluidization conditions.....	34
2.2.8.2.	Encapsulation efficiency	35
2.2.9.	Effect of encapsulation on the availability of active compounds during storage: <i>In vitro</i> assay	35
2.2.9.1.	BHI-agar deep-well model for active compounds depletion test.....	35

2.2.9.2 Active compounds bioassay against <i>Paecilomyces</i>	35
2.2.10 Statistical analysis.....	35
2.3. Results and Discussion	36
2.3.1 Minimal inhibitory concentration (MIC)	36
2.3.2 Fractional inhibitory concentration (FIC).....	38
2.3.3 Effect of HLB on physicochemical characterization of emulsions	40
2.3.4 Emulsion characterization at different ratios of emulsifier to formulation (E: F).....	42
2.3.5 Optimization of encapsulation process	44
2.3.6 Antifungal activity of nanoemulsions	51
2.3.7 BHI-agar deep well model.....	54
2.4 Conclusion.....	57
Acknowledgments	57
Conflicts of Interest.....	57
CHAPITRE 3: Antifungal properties of spray dried natural formulation to preserve grated cheese quality using whey protein isolate and maltodextrin blend	59
Résumé.....	60
Abstract.....	62
3.1 Introduction	63
3.2 Materials and methods	64
3.2.1 Emulsion preparation and drying conditions.....	64
3.2.2 Characterization of microencapsulated powder	64
3.2.2.1 Encapsulation efficiency	64
3.2.2.2 Total phenols content determination	64
3.2.2.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis.....	64
3.2.2.4 Peroxide values of microcapsules.....	65
3.2.3 Sensory evaluation	65
3.2.4 <i>In situ</i> antifungal efficiency of powder formulation in grated mozzarella	66
3.2.4.1 Effect on the shelf-life of grated mozzarella cheese	66
3.2.4.2 Challenge test.....	66
3.2.5 Evaluation of the physico-chemical stability of grated mozzarella cheese.....	66

3.2.5.1	Color stability	66
3.2.5.2	Water activity (a_w)	67
3.2.6	Statistical analysis	67
3.3	Results and Discussion	67
3.3.1	Powder Characterization: Encapsulation efficiency (EE %), Total phenols content and Peroxide values of microcapsules	67
3.3.2	ATR-FTIR Analysis	70
3.3.3	Sensory analysis.....	71
3.3.4	<i>In Situ</i> Test	72
3.3.4.1	Shelf-life	72
3.3.4.2	Challenge test.....	77
3.3.5	Physico-chemical stability	78
3.3.5.1	Color measurements	78
3.3.5.2	Water activity	81
3.4	Conclusions.....	83
	Acknowledgments	84
	Declaration of interest.....	84
	Author contributions	84
	CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE	85
4.1	Sélection des meilleurs antifongiques d'origine naturelle.....	85
4.2	Sélection de la meilleure formulation synergique antifongique.....	85
4.3	Mise au point d'une nanoémulsion antifongique	86
4.4	Mise au point d'une méthode d'encapsulation de la formulation antifongique optimisée.....	87
4.5	Mise au point d'un procédé de séchage par atomisation (spray drying ; SD) et caractérisation de la poudre développée	88
4.6	Évaluations : sensorielle – microbiologique et physicochimique	89
4.6.1	Analyse sensorielle	89
4.6.2	Analyse microbiologique	89
4.6.3	Analyse physicochimique	90
	CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE	92
	6. BIBLIOGRAPHIE	94
	7. ANNEXE I	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Répartition du fromage canadien en fonction du taux d'humidité selon la norme élaborée par l'Office des Normes Générales Du CANADA (ONGC) relative au « Fromage et produits de fromage ».....	2
Figure 1.2 Système de fonctionnement général d'un sécheur par atomisation, contenant le réchauffeur d'air, le système d'alimentation, l'atomiseur, les chambres de séchage et le cyclone.....	17
Figure 2.1 Zeta-potential of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.....	41
Figure 2.2 Average diameter of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.....	41
Figure 2.3 PDI of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.	42
Figure 2.4 Zeta potential of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E:F) during 15 days of storage at 4°C.....	43
Figure 2.5 Average diameter of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E: F) during 15 days of storage at 4°C.....	43
Figure 2.6 PDI of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E: F) during 15 days of storage at 4°C.....	44
Figure 2.7a Combined effects of pressure and the number of cycles on the zeta-potential of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).....	47
Figure 2.7b Combined effects of pressure and the number of cycles on the zeta-potential of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).....	47
Figure 2.8a Combined effect of pressure and number of cycles on the particle size of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).....	48
Figure 2.8b Combined effects of pressure and number of cycles on the particle size of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).....	48
Figure 2.9a Combined effects of pressure and number of cycles on PDI of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).	49
Figure 2.9b Combined effects of pressure and number of cycles on PDI of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).	49

Figure 2.10a Combined effects of pressure and number of cycles on the encapsulation efficiency of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).	50
Figure 2.10b Combined effects of pressure and number of cycles on the encapsulation efficiency of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).	50
Figure 2.11 Standard curves for free and microencapsulated active compounds against Paecilomyces in vitro bioassay.	55
Figure 2.12 Available active compounds concentration from free and microencapsulated formulation against Paecilomyces during storage at 4°C in vitro BHI-agar deep-well mode.	56
Figure 3.1 Total phenol content (μg EAG/mL) of the developed formulation before and after spray drying. Different letters above the bars indicate significant differences among the mean values of the samples ($P \leq 0.05$). Data shown is the mean \pm SD (n=3).	68
Figure 3.2 Peroxide value (PV) of the developed formulation during 30 days storage at 25°C and 60°C. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean PV values at each temperature over time. Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the 2 temperatures on each day. Data shown is the mean \pm SD (n=3).	69
Figure 3.3 FTIR spectra of the encapsulation matrix, the active formulation and the encapsulated formulation after spray-drying process.	71
Figure 3.4 Appreciation scale of taste, smell, texture and global appreciation of grated mozzarella cheese treated with different concentrations of the powder formulation.	72
Figure 3.5A Total mesophilic flora (TMF) in grated mozzarella sealed under N ₂ (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation.	73
Figure 3.5B Total mesophilic flora (TMF) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA: Control; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation.	73
Figure 3.6A Lactic Acid Bacteria (LAB) in grated mozzarella sealed under N ₂ (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation.	74
Figure 3.6B Lactic Acid Bacteria (LAB) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA: Control; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation.	75
Figure 3.7A Yeasts and molds (YM) in grated mozzarella sealed under N ₂ (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation.	76
Figure 3.7B Yeasts and molds (YM) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA: Control; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation.	76

Figure 3.8 Effect of the active formulation (FP) and Natamycin (FN) applied to grated Mozzarella to control the growth of the fungal consortium (*A. niger*, *P. commune*, *Paecilomyces* spp, *P. citrinum* and *P. crustosum*). The control cheese (F) does not contain antimicrobials. Average logarithmic value (n = 3).77

Figure 3.9A Water activity (aw) of grated mozzarella sealed under N₂ at 4°C. F: Control; FN: Cheese + Nataseen; FP: Cheese + Active Powder Formulation. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean aw value of every group on each day. Data shown is the mean \pm SD (n=3).82

Figure 3.9B Water activity (aw) of grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F: Control; FN: Cheese + Nataseen; FP: Cheese + Active Powder Formulation. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean aw values of every group on each day. Data shown is the mean \pm SD (n=3).83

Figure 7.13a Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *A. niger*. 112

Figure 7.13b Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *A. versicolor*. 112

Figure 7.13c Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Aureo pullulants*. 113

Figure 7.13d Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Eurotium rubrum*. 113

Figure 7.13e Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Paecilomyces* spp. 114

Figure 7.13f Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. chrysogenum*. 114

Figure 7.13g Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. citrinum*. 115

Figure 7.13h Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. commune*. 115

Figure 7.13i Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. crustosum*. 116

Figure 7.13j Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. roqueforti*. 116

Figure 7.14a Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>A. niger</i>	117
Figure 7.14b Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>A. versicolor</i>	117
Figure 7.14c Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>Aureo pullulants</i>	118
Figure 7.14d Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>Eurotium rubrum</i>	118
Figure 7.14e Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>Paecilomyces</i> spp.....	119
Figure 7.14f Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>P. chrysogenum</i>	119
Figure 7.14g Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>P. citrinum</i>	120
Figure 7.14h Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>P. commune</i>	120
Figure 7.14i Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>P. crustosum</i>	121
Figure 7.14j Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against <i>P. roqueforti</i>	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Répertoire des moisissures dans divers types de fromage	4
Tableau 1.2 Types des conservateurs utilisés pour les fromages affinés.....	5
Tableau 1.3 Exemples de biopolymères utilisés dans la microencapsulation par séchage par atomisation d'huiles et d'arômes alimentaires.....	17
Tableau 2.1 Natural selected compounds.....	31
Tableau 2.2 Fungal strains used in the study.	32
Tableau 2.3 Level of independent factors in the experimental design.....	34
Tableau 2.4 Minimum inhibitory concentration (MIC) of selected antifungal agents against target fungal strains.....	37
Tableau 2.5 Fractional inhibitory concentration (FIC) of selected combined antifungal agents against target fungal strains.....	39
Tableau 2.6 Polynomial equation predicting physicochemical responses using quadratic model.	46
Tableau 2.7 ANOVA results for antifungal properties using quadratic model.	53
Tableau 3.1 Concentrations of powders formulation used for grated mozzarella treatment. .	65
Tableau 3.2 Color measurement of grated mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under N ₂ , during storage at 4°C. F is the untreated control cheese. (Mean value ± standard deviation, n = 3). ≤ 0.05). L*: lightness, a*: (green to red), b* (blue to yellow).	79
Tableau 3.3 Color measurement of grated mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under air, during storage at 4°C. F is the untreated control cheese. (Mean value ± standard deviation, n = 3).	80
Tableau 3.4 ΔE measurement of grated mozzarella du Mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under N ₂ (SL) and under air (SA), during storage at 4°C. (Mean value ± standard deviation, n = 3).....	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC: Active Compounds
a_w: Water activity
ATP: Adenosine Triphosphate
CCD: Central Composite Design
CE A: Citrus Extract A
CEO: Cinnamon Essential Oil
CMI: Concentrations Minimales Inhibitrices
DLS: Dynamic Light Scattering
EE: Encapsulation Efficiency
FAC: Free Available Content
FAO: Food and Agriculture Organization
FIC : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire
FMT : Flore Mésophile Totale
FN : Nataseen
FP : Formulation Bioactive
FTIR : Fourier transform infrared
HE : Huiles Essentielles
HLB : Hydrophilic–lipophilic balance
LAB : Les bactéries lactiques
MD : Maltodextrine
NE : Non Encapsulated
PDI : Indice de Polydispersité
PIT : Phase Inversion Temperature
PIC : Phase inversion composition
PV : Peroxide Value
SA : Sous Air
SD : Spray-Drying
SMP : Sucrose Monopalmitate
SL : Sous Azote
WPI : Isolat de Protéines de Lactosérum
Y/M : Levures et Moisissures
Z-average : Average Particle Diameter

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1. INTRODUCTION

Les produits laitiers fermentés comme le fromage sont des aliments de grande consommation dans le monde. Au Canada, d'après l'Institut de la statistique du Québec (ISQ), la consommation par habitant des fromages a connu une croissance de 14% entre 2012 et 2019 (Stéphanie Keable. 2021). Le Québec dominait au pays avec 50.5% des parts de la fabrication du fromage. En effet, le choix du type de fromage par le consommateur dépend fortement de sa texture et de sa composition. Toutefois, la forte teneur en gras avec le faible pH de plusieurs types de fromages favorisent l'apparition de quelques espèces de moisissures induisant la formation des mycotoxines responsables de la détérioration du produit : c'est la contamination fongique qui provoque des pertes économiques énormes pour les fromagers en plus des risques sévères qui menacent la santé humaine. Comme solution, l'industrie se trouve obligé d'utiliser la natamycine en tant qu'agent de conservation, appliqué sur le fromage par trempage ou pulvérisation, pour assurer la stabilité et la salubrité des produits finis. Dans le fromage râpé, un mélange sec est utilisé, généralement avec de la cellulose pour éviter les agglomérations. D'après Santé Canada, la natamycine est définie comme une substance produite par *Streptomyces natalensis*, une bactérie du sol, qui inactive la germination des spores fongiques (Santé Canada. 2014). De nombreux consommateurs sont toutefois préoccupés par son usage du fait de ses effets secondaires potentiels et à cause du phénomène de résistance aux antibiotiques. Actuellement le consommateur est à la recherche de plus de clareté, de transparence et de naturalité. Il réclame des produits alimentaires ayant une origine définie, des étiquetages simples et compréhensibles avec la présence de moins en moins d'ingrédients artificiels. C'est dans ce contexte que s'impose la démarche « étiquette épurée », une notion qui s'applique sur un produit positionné comme étant naturel, biologique dépourvu de tous additifs artificiels (The Clean Label Guide to Europe from Ingredion. 2014). Au sein de cette dynamique actuelle et avec le développement des tendances alimentaires, les industriels soucieux de la satisfaction de leurs clients se trouvent obligés à améliorer constamment leurs produits et à se pencher sur le l'utilisation d'étiquette épurée qui devient une nécessité dans l'accès aux marchés. Pour cela, ces derniers désirent retirer la natamycine de la liste des additifs alimentaires et souhaitent utiliser des additifs de source naturelle aussi efficaces sans altérer les qualités organoleptiques de leurs produits finis.

1.1 Profil de l'industrie du fromage au Canada

Le Canada s'impose parmi les principaux pays producteurs de fromage dans le monde entier qui se distingue par sa haute qualité et sa variété. En effet, le parmesan, le fromage à la crème et le fromage cottage se classent parmi les variétés des fromages de spécialité les plus produits au pays aussi bien que le fromage mozzarella et le cheddar. L'industrie canadienne du fromage comporte plus de 173 fabricants de fromages qui produisent plus de 667 types. Celle-ci est principalement concentrée au Québec et en Ontario. En effet, 76.5% de toutes les variétés de fromage canadien sont produites au Québec (Les Producteurs laitiers du Canada, 2019).

1.2 Le fromage rapé

1.2.1 Définition et réglementation

Au Canada, les fromages sont classés selon le taux d'humidité en six (6) catégories : fromage à pâte molle (67% - 80%), ferme (50% - 62%), demi-ferme (62% - 67%), fraîche (> 80%), persillée (62% - 80%) et dure (< 50%) (Figure 1.1) (Centre canadien d'information laitière, 2019). Le pourcentage en humidité est exprimé en HRED, calculé selon la formule suivante :

$$HRED = \frac{\% \text{ maximum du taux d'humidité selon l'étiquetage}}{100 - \% \text{ de matière grasse selon l'étiquetage}}$$

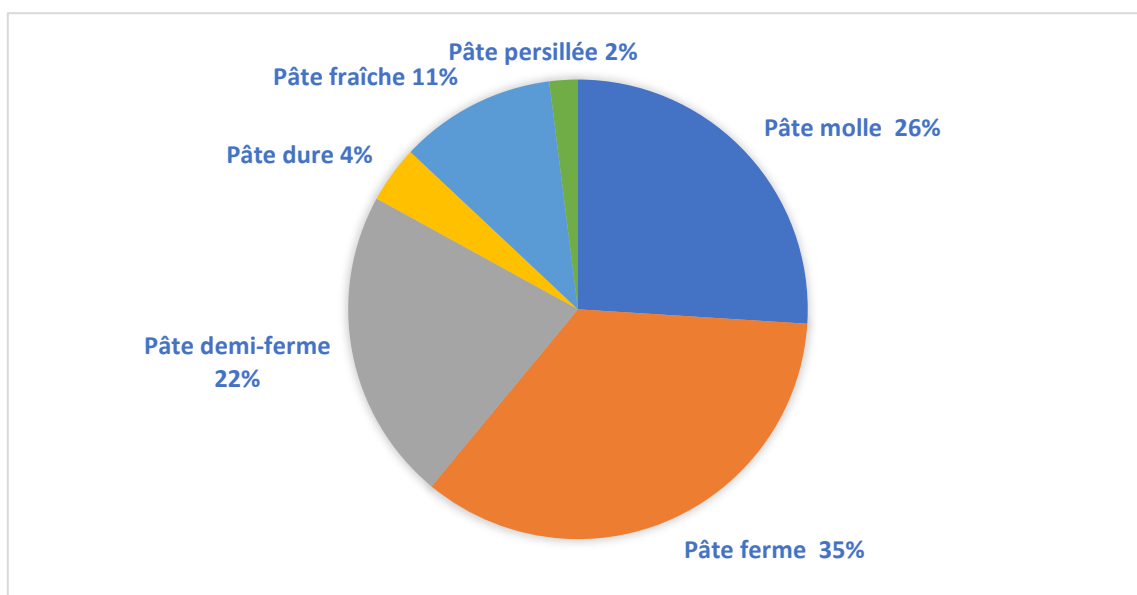


Figure 1.1 Répartition du fromage canadien en fonction du taux d'humidité selon la norme élaborée par l'Office des Normes Générales Du CANADA (ONGC) relative au « Fromage et produits de fromage »

Le fromage râpé fin ou râpé en filaments doit être préparé en râpant ou en réduisant en filaments la variété de fromage désignée y compris le fromage affiné dans la masse à pâte ferme (Services publics et Approvisionnement Canada. 2002). Ce type de fromage peut également contenir des additifs alimentaires autorisés comme ingrédients facultatifs sans danger tel que la cellulose (E460) et la cellulose en poudre (E460ii) (Santé Canada. 2019). Etant un produit transformé, le fromage rapé se démarque par l'ajout de deux composés additionnelles par rapport au fromage classique : la poudre de cellulose (agent antiagglomérant) et la natamycine (agent antifongique). Cependant, santé canada limite leur utilisation par l'établissement des limites de tolérances et des conditions d'application. En effet, la natamycine est définie comme un agent de conservation de catégorie 3 qui peut être appliquée sur la surface du fromage râpé fin ou en filaments à raison de 10 ppm (Santé Canada. 2021). La cellulose peut être appliquée seule ou en association avec du silicate de calcium ou de la cellulose microcristalline sur le fromage râpé fin ou en filaments à condition que la quantité totale n'excède pas 2 % (Santé Canada. 2006).

1.2.3 Source et type d'altération

Le microbiote du fromage est un écosystème complexe composé par des microorganismes et cultures responsables de la saveur, l'arôme, la texture et l'apparence des fromages et par des bactéries, levures et moisissures indésirables dont leur abondance varie selon le type de fromage (Banjara et al. 2015). En effet, la teneur en eau et en sel, le pH, le potentiel redox, les conditions aérobies/anaérobies, l'acidité, la température, l'humidité pendant la maturation et l'emprésurage aussi que l'absence de bonnes pratiques d'assainissement au cours du procédé de fabrication sont des facteurs majeurs responsables de la diversité de ses microorganismes (Boor and Fromm. 2006 ; Garnier et al. 2017). La sensibilité des fromages à la détérioration par les moisissures d'altération revient principalement à leur croissance à basse température et faible pH, dans des atmosphères limitées en oxygène et riches en gras (John I. and Ailsa D. 2009; Sørhaug. 2011). A titre d'exemple, *Penicillium roqueforti* est une moisissure qui peut se développer dans un faible taux d'oxygène (1%). La contamination fongique est induite par la production de mycotoxines à risque très élevé pour la santé. Les espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* peuvent produire de faibles concentrations de mycotoxines ou d'autres métabolites toxiques sur le fromage en raison de la croissance pendant la maturation. Une étude de cas industriel a rapporté que durant la maturation de fromage Cheddar, des moisissures apparentes sous forme de taches sombres peuvent apparaître à leur surface principalement du genre *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. herbarum*), *Penicillium* (*P. commune*, *P. glabrum*) et *Phoma* (*Sphaerioidaceae*) (Hocking and Faedo. 1992). Les souches fongiques peuvent aussi favoriser des saveurs indésirables et

provoquer la coloration ou la décoloration du fromage induisant une désintégration du produit de haute qualité. En effet, les espèces résistantes de *Penicillium*, décarboxylent l'acide sorbique conservateur en 1,3-pentadiène, induisant le mauvais goût du kérosène. D'autres espèces réduisent l'acide sorbique en acide 4-hexanoïque et en 4-hexanol (Sørhaug. 2011). Pour cela, ces pertes alimentaires sont fortement dépréciées par les industriels du fromage étant leur principale cause des pertes économiques substantielles. Le fromage râpé est particulièrement sensible à la détérioration par les levures et les moisissures (Sørhaug. 2011). Dans ce contexte, le **Tableau 1.1** résume les divers profils des moisissures d'altération réparties selon le type du fromage.

Tableau 1.1 Répertoire des moisissures dans divers types de fromage

Fromages très durs (Asiago, gruyère, parmesan)	Fromages durs (Cheddar, Jarlsberg, Romano, Suisse)	Fromages semi durs
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus phoenicis</i>	<i>P. camemberti</i>
<i>Penicillium camemberti</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. niger</i>
<i>Penicillium verrucosum</i>	<i>P. camemberti</i>	<i>P. roqueforti</i>
<i>Eurotium rubrum</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Cladospium</i>
	<i>C. herbarum,</i>	<i>sphaerospermum</i>
	<i>P. commune</i>	

La production de toxines et leur toxicité relative qui stimule la croissance des champignons dans le fromage sont liées à des facteurs biotiques et abiotiques. L'ochratoxine A et les aflatoxines AFs (AF M1) sont les mycotoxines les plus dangereuses, reconnues pour leurs propriétés cancérigènes, néphrotoxiques et tératogènes. Ceci, oblige l'industrie à contrôler régulièrement divers points au niveau de la chaîne de fabrication du fromage (Hymery et al. 2014).

1.2.4 Solutions appliquées

Afin d'éviter la détérioration d'origine fongique et d'augmenter la durée de vie des fromages, des méthodes combinées de prévention des pathogènes sont appliquées par les fabricants (Garnier et al. 2017), tels que :

- Les bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène (Good Manufacturing Practice ; GMP)
- Le système d'analyse des risques et maîtrise des points critiques (HACCP)
- L'utilisation d'équipements de filtration ou de décontamination de l'air (traitement thermique, l'emballage sous atmosphère modifiée, entreposage à froid...)
- L'utilisation des agents de conservations appropriés (**Tableau 1.2**) (Basilico et al. 2001 ; Morini. 2013).

Tableau 1.2 Types des conservateurs utilisés pour les fromages affinés

Type de conservateurs	Exemple de conservateurs
Conservateurs chimique	Sorbate d'hexaméthylènetétramine (ou méthénamine) - Les nitrates - Le propionate
Agents naturels	- La nisine - Le lysozyme (ou muramidase)
En cas d'éclosion de pathogènes, l'industrie utilise	
Agents antibiotiques	- La natamycine
Techniques de fumigation	- Le p-OH fenilsalicydamide

1.3 Problématique du projet

Bien que les solutions adaptées par les fromagers aient réussi à prévenir l'altération de leurs produits, plusieurs souches fongiques ont développé une résistance aux agents de conservation vu la complexité de l'environnement fongique des fromages. Garnier et al. (2017) ont montré que *Penicillium commune* possède une résistance particulièrement élevée aux acides organiques et une faible résistance pour la natamycine. En effet, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de cette souche par le propionate de calcium, le benzoate de sodium, le sorbate de potassium et la natamycine étaient de >3 ; 2 ; 0.3 et 0.06 g/L. De ce fait, contrôler les moisissures causant la détérioration par la mise au point de nouvelles méthodes de conservation utilisant des additifs d'origine naturels, afin de limiter les pertes alimentaires et de satisfaire l'exigence des consommateurs pour des produits " étiquette épurée " devient une nécessité primordiale pour les industriels du fromage. Afin d'atteindre cet objectif, trois (3) étapes majoritaires s'imposent :

- 1- Développer une formulation complexe antifongique à base de composés naturels.
- 2- Assurer la stabilité de la formulation développée via un procédé d'encapsulation adéquat.
- 3- Prolonger la durée de vie du fromage rapé sans affecter ses propriétés organoleptiques.

1.4 Sélection des composés antifongiques de sources naturelles

Au cours des 30 dernières années, afin de répondre à une demande croissante des consommateurs pour remplacer les additifs synthétiques par des agents naturels, de nouvelles études ont permis d'élaborer plusieurs produits sains et nutritifs ayant une plus longue durée de vie et un meilleur contrôle de l'innocuité alimentaire sans additifs chimiques. Il existe donc

un intérêt à identifier des composés antimicrobiens naturels extraits des plantes, du règne animal ou produits par des micro-organismes, qui remplaceraient les additifs chimiques. Un agent de conservation naturel devrait présenter les critères suivants :

- 1) Large spectre d'action antimicrobienne contre les bactéries, les levures et les moisissures,
- 2) Activité microbicide plutôt que microbistatique,
- 3) Activité à faible concentration,
- 4) Stabilité à la chaleur,
- 5) Maintien de l'activité à des pH faibles ou élevés,
- 6) Aucune saveur ou odeur désagréable,
- 7) Non-toxique,
- 8) Facilement quantifiable,
- 9) Faible coût.

L'application de conservateurs antifongiques pour inhiber la croissance des moisissures et la production de mycotoxines au cours des processus alimentaires a été considérée comme l'une des stratégies efficaces pour améliorer la sécurité de la chaîne d'approvisionnement alimentaire (Wan et al. 2019).

1.4.1 Huiles essentielles

De nombreuses épices et herbes exercent une activité antimicrobienne en raison de leurs fractions d'huiles essentielles. Nychas (1995) a signalé l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'origan, de thym, de sauge, de romarin, de clou de girofle, de coriandre, d'ail et d'oignon contre les bactéries et les moisissures (Moreira et al., 2005). Les agents antifongiques naturels, tels que les huiles essentielles (HEs), ont fait l'objet d'une attention croissante comme étant des alternatives potentielles pour lutter contre les champignons (Hyldgaard, Mygind, & Meyer. 2012 ; Prakash, Singh, Kedia, & Dubey, 2012). Les HEs sont des ingrédients naturels qui sont concentrés à partir de plantes, y compris les fleurs, les bourgeons, les feuilles et l'écorce. Typiquement, ce sont des mélanges complexes de substances volatiles, y compris des terpènes, des terpénoïdes et des phénols (Wan et al., 2019). De plus, il a été rapporté que les HEs, telles que l'huile de clou de girofle, l'huile de thym, l'huile de cannelle, l'huile de citronnelle et l'huile de menthe poivrée, possèdent un large spectre de propriétés antifongiques ainsi que des activités inhibitrices des mycotoxines (Bluma & Etcheverry, 2008 ; Xing et al., 2014). Les HEs sont classées comme « Generally Recognised as Safe » (GRAS) par la Food and Drugs Administration (FDA), elles ne sont donc pas nocives et, en raison de leur origine naturelle, sont plus largement acceptées par les consommateurs que les agents « synthétiques » (Nazzaro et al., 2017). L'activité antimicrobienne ou

antifongique de l'HE pourrait être causée par les propriétés des terpènes/terpénoïdes, qui, en raison de leur nature hautement lipophile et de leur faible poids moléculaire, sont capables de perturber la membrane cellulaire, de provoquer la mort cellulaire ou d'inhiber la sporulation et la germination de champignons d'altération des aliments (Nazzaro et al., 2017). Selon Jager (2014), les agents antifongiques peuvent désactiver les champignons selon des mécanismes d'actions spécifiques. A titre d'exemple se trouvent :

1) Perturbation de la membrane cellulaire, altération et inhibition de la formation de la paroi cellulaire

La paroi cellulaire fongique est principalement composée du mannan, le glucane et de la chitine. L'inhibition de la polymérisation de la chitine affecte la maturation de la paroi cellulaire et la formation d'anneaux de bourgeons, en endommageant la division ainsi que la croissance cellulaire (Nazzaro et al. 2017 ; Wu et al. 2008). Selon Sharma and Tripathi (2008), l'HE de *Citrus sinensis* est capable d'inhiber la croissance d'*Aspergillus niger* à des concentrations de 2.5 et 3.0 mg/mL en causant des altérations morphologiques irréversibles (perte de cytoplasme et du bourgeonnement de la pointe dans les hyphes fongiques). Hammer (2004) a mis en évidence le mécanisme d'action de l'HE d'arbre à thé pour l'inhibition de *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Cette étude a montré qu'à une concentration de 0.25 à 1.0% (v/v), l'HE d'arbre à thé était capable de modifier la fluidité et la perméabilité membranaire de la souche fongique ciblée. En effet, l'action d'une telle HE induit une distorsion et un amincissement de la paroi des hyphes ainsi qu'une rupture de la paroi cellulaire.

2) Dysfonctionnement des mitochondries fongiques

Certaines HEs peuvent affecter l'efficacité mitochondriale en inhibant l'action des déshydrogénases mitochondriales, impliquées dans la biosynthèse de l'ATP, telles que la malate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase et la lactate déshydrogénase (Nazzaro et al. 2017). Bakkali et al. (2006) ont montré que les HEs *Origanum compactum*, d'*Artemisia herba alba* et de *Cinnamomum camphora* étaient capables de provoquer des dommages mitochondriaux par la création des mutations cytoplasmiques chez *Saccharomyces cerevisiae*.

3) Inhibition des pompes à efflux

Les pompes à efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes pour éliminer les substances toxiques de la cellule (Jager, 2014). La membrane plasmique fongique H⁺-ATPase joue un rôle important dans la physiologie de la cellule fongique en soutenant le gradient de protons électrochimique transmembranaire à travers la membrane cellulaire nécessaire à l'absorption des nutriments. Elle régule aussi la croissance des cellules fongiques et le pH

intracellulaire. Son inhibition entraîne une acidification intracellulaire et la mort cellulaire (Nazzaro et al., 2017). Le thymol et l'eugénol sont deux fongicides qui agissent en synergie avec le fluconazole antimycotique azolé afin d'inhiber l'activité de H^+ -ATPase chez *Candida albicans* (Ahmad et al., 2013).

1.4.2 Réuterine

La reuterine ou hydroxypropionaldéhyde (β -HPA) est un aldéhyde simple produit naturellement par une sorte de souches de *Lactobacillus* au cours du processus intermédiaire de fermentation anaérobie du glycérol en 1,3 propanediol (Q. Lüthi-Peng et al., 2002). Chung et al. (1989) ont démontré une inhibition efficace de la reuterine synthétisée par *Lactobacillus reuteri* 1063 et isolée des intestins de porc, contre les levures eucaryotes inférieures et les champignons tels que *Aspergillus flavus*, *Fusarium samfucienum*, *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. De même, Gómez-Torres et al. (2014) ont également révélé l'activité anticlostridiale de la reuterine, présente dans un surnageant acellulaire de *Lactobacillus reuteri* INIA P572, contre toutes les souches de *Clostridium* testées, comme *C. tyrobutyricum* tout en inhibant la croissance de ses spores et de ses cellules végétatives. Récemment, Schmidt et al. (2018) ont montré que 4 mM et 8 mM de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de reuterine produite par *Lactobacillus reuteri* R29 pourraient empêcher la croissance visible de *F. colmorum*, *A. Niger* et *P. expansum*. Dans l'ensemble, le grand potentiel montré par la reuterine en tant que composé antimicrobien puissant contre un large éventail d'agents pathogènes et d'organismes de détérioration des aliments la rend plus intéressante pour une utilisation comme conservateur alimentaire naturel.

1.4.3 Acides organiques

Certains acides faibles ou organiques tels que l'acide sorbique, l'acide benzoïque et l'acide propionique résultants d'un métabolisme normal chez les animaux ou les bactéries sont utilisés comme additifs alimentaires (Yun and Lee, 2016). En tant qu'exemple, se trouvent :

- Acide sorbique

L'acide sorbique est un composé organique naturel, un acide gras insaturé décrit par la FAO comme une poudre blanche à écoulement libre avec une odeur minimale et à 99%, soluble dans l'éthanol et partiellement soluble dans l'eau. Il aide au métabolisme des graisses dans le corps humain sans s'accumuler. L'activité antifongique de l'acide sorbique dépend principalement de l' a_w , la composition des aliments, la concentration de sorbate et du pH (6.5-7.0). L'acide sorbique est un bon conservateur pour les aliments à haute teneur en matières grasses et à pH élevé comme les pâtes à tartiner faibles en matières grasses et les fromages

fondus. Il est utilisé en faibles concentrations pour contrôler la croissance des moisissures et des levures dans les produits fromagers, les aliments cuits au four, les boissons aux fruits, les fruits et légumes frais, certains produits de poisson et de viande et les vins (Shibamoto et Bjeldanes, 1993). La concentration maximale autorisée de sorbates pour la plupart des aliments est comprise entre 0.1 % et 0.3 % (Mani-López et al., 2016). Quattrini et al. (2019) ont montré que la combinaison d'acide sorbique et d'acide acétique était active à 0,2+3,1 mM contre *A. niger* et 0,2+6,2 mM contre *P. roqueforti*. Ils ont testé l'effet du sorbate sur différentes souches de *Penicillium roqueforti* et ont conclu que les souches sensibles étaient inhibées à des concentrations de 500 à 1 000 ppm et que les souches résistantes se développaient à des concentrations d'acide sorbique allant jusqu'à 6 000 à 9 000 ppm.

- Acide propionique

Il s'agit d'un acide carboxylique faible produit principalement par le métabolisme des bactéries propioniques et naturellement présent dans les produits alimentaires (lait, yaourt, fromage). De nombreuses études ont montré que le traitement à l'acide propionique inhibe la croissance fongique dans les aliments. En effet, il induit la mort des cellules fongiques par apoptose médiée par les mitochondries. Par conséquent, l'acide propionique est utilisé comme conservateur dans une large gamme de produits, y compris les produits de boulangerie et de fromage (Yun et Lee, 2016). Hassan et al. (2015) ont étudié l'effet de huit acides organiques (acides propionique, acétique, formique, lactique, tartrique, citrique, oxalique et malique) comme agents antifongiques sur la croissance de quatre champignons (*Aspergillus flavus*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhizopus nigricans* et *Fusarium oxysporum*). Ils ont trouvé que l'acide propionique (10 %) avait un effet important sur l'inhibition de la croissance de *R. nigricans* de 26,57 %.

1.4.4 Bactériocines

Les bactériocines sont des protéines et peptides antimicrobiens synthétisés selon la voie ribosomique qui peuvent être isolées chez plusieurs bactéries. Ils sont le plus souvent cationiques, modifiés ou non post-traductionnellement, ayant une masse moléculaire comprise entre 2 et 6 kDa (Makhloufi, 2011). Elles sont considérées en tant que substances protéiques à activité antimicrobienne. Les bactériocines produites à partir de souches de *Lactobacillus* par les espèces *Bacillus spp* sont les plus connues dans les aliments et qui peuvent avoir un effet fongicide.

1.4.4.1 Bactériocines produites à partir de souches de *Lactobacillus*

Les bactéries lactiques (LAB) deviennent de plus en plus reconnues en tant que bioconservateurs appliqués dans les aliments. Plusieurs chercheurs ont pu isoler et identifier des LABs à activité antimicrobienne (Çakır, 2010; Cheong et al., 2014; De Vuyst et Leroy, 2007). Comme exemple, se trouvent :

- La bactériocine produite par *Lb. Paracasei* : KC 39

Shehata et al. (2018) ont isolé et identifié la puissance antifongique de *Lactobacillus paracasei* KC39 à partir d'un fromage égyptien traditionnel (Kareish). La bactériocine KC39 était le premier composé excrété de *Lb. Paracasei* qui a signalé une inhibition de la croissance des champignons toxigènes. Cet extrait de bactériocine a montré une activité antifongique élevée contre *A. parasiticus* ITEM 11. Les résultats obtenus ont ouvert la possibilité de futures applications biotechnologiques potentielles de la bactériocine KC39 et de sa souche productrice en tant que bioconservateur par rapport à l'infection fongique sensible en réduisant la contamination par les aflatoxines et l'ochratoxine. Cependant, les recherches sur les lactobacilles antifongiques restent limitées.

- Plantaricine SLG1 produite par *Lb. Plantaire*

Pei et al. (2018) ont montré que *Lactobacillus plantarum* SLG1 isolée du fromage de yak produit une nouvelle bactériocine, la plantaricine SLG1. Cet extrait de bactériocine a révélé une large gamme d'activité antimicrobienne contre de nombreuses bactéries pathogènes et d'altération d'origine alimentaire, ainsi que certains champignons (*Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*) en endommageant l'intégrité de la membrane cellulaire, causant finalement la létalité des agents pathogènes.

1.4.4.2 Bactériocines produites par les espèces *Bacillus spp*

Adetunji, et Olaoye. (2013) ont étudié la capacité des bactériocines isolées de *Bacillus spp.* pour inhiber quatre isolats de levure obtenus à partir de produits alimentaires courants (yaourt et fromage) couramment consommés par les Nigériens. Les effets fongicides de ces bactériocines ont été testés contre les souches de levure en utilisant la méthode de diffusion sur agar. Les bactériocines ont produit de larges zones d'inhibition allant de 5.9 à 24.0 mm contre les 4 souches fongiques ciblées.

1.5 Limites de l'application directe des composés antifongiques

L'incorporation directe des de la majorité des composés de sources naturelles dans les aliments est souvent limitée par plusieurs facteurs. En effet, leur efficacité inhibitrice dépend

principalement des champignons ciblés, la concentration en composé actif, la solubilité dans l'eau et la volatilité élevée (cas des HEs). Ainsi, plusieurs études sur l'incorporation des HEs dans des systèmes de distribution appropriés pour améliorer leur solubilité dans l'eau et leur efficacité antifongique dans les aliments ont été réalisées. Parmi les systèmes d'administration, il existe un intérêt croissant pour le développement de nanoémulsion d'HE dans l'eau (H/E) en tant que procédé d'encapsulation en raison de sa plus grande stabilité physique que l'émulsion conventionnelle, ainsi que de sa capacité à augmenter l'activité antifongique des HEs plutôt que d'appliquer directement des HEs en vrac sur les aliments (Wan et al., 2019). L'approche à haute énergie comme la microfluidisation représente une méthode principale pour le développement des nanoémulsions en raison de sa capacité de générer des forces perturbatrices intenses qui décomposent la phase huileuse en petites gouttelettes d'huile pendant le processus d'homogénéisation. Ces notions sont mieux détaillées et expliquées dans la section (4).

1.6 Encapsulation d'ingrédients alimentaires par nanoémulsions simples

La nanotechnologie se base sur la manipulation et le contrôle de matériaux, de dispositifs, de structures et de systèmes (Cardoso-Ugarte et al., 2016). Dans l'industrie alimentaire, l'application de la nanotechnologie a marqué un changement important dans le stockage, le processus, la production et le développement de nouveaux produits ainsi que de matériaux innovants. En effet, l'application de la nanotechnologie dans les aliments a rendu possible de développer de nouveaux produits ayant de nouvelles caractéristiques au niveau de la saveur, la texture et la stabilité pendant la durée de conservation (Ezhilarasi et al., 2013). Au cours de la dernière décennie, la nanotechnologie a été appliquée au développement d'aliments nutraceutiques et fonctionnels et à la détection de micro-organismes pathogènes tout en utilisant des biopolymères complexes et des micelles et des nanoémulsions (Cardoso-Ugarte et al., 2016). Aujourd'hui, l'industrie alimentaire utilise de plus en plus des nanoémulsions au lieu des émulsions conventionnelles en raison de la bonne stabilité des gouttelettes qu'elles confèrent contre l'agrégation ainsi que la libération du composé encapsulé dans des sites spécifiques. De plus, les nanoémulsions présentent un aspect clair et une stabilité et solubilité élevées, offrant ainsi une bonne biodisponibilité et efficacité biologique des composés bioactifs dispersés (Abbas et al., 2013). Aussi, l'application des nanoémulsions dans le domaine de l'industrie alimentaires a été principalement basée sur les systèmes porteurs de composés bioactifs lipophiles grâce à sa biodisponibilité élevée ainsi que de son impact minimal sur les caractéristiques sensorielles des aliments.

1.6.1 Nanoémulsions

Les nanoémulsions sont définies comme un système colloïdale, cinétiquement stables (Gupta et al., 2016). Elles sont composées par de fines gouttelettes formants une phase liquide dispersées et stabilisées dans une autre phase continue non miscible par l'utilisation d'agent émulsifiant (Kumar et Kumar., 2018). Deux types de nanoémulsions sont présents : nanoémulsions huile-dans-eau H/E (dispersion de gouttelettes d'huile dans une phase aqueuse continue) et nanoémulsions eau-dans-huile E/H (dispersion de gouttelettes d'eau dans une phase huileuse continue). Le choix du type d'émulsion à adapter dépend de de la formulation requise et de l'application envisagée (Solans et Solé, 2012).

1.6.1.1 Choix de type de nanoemulsion

Le choix entre une nanoémulsion H/E ou E/H dépend des propriétés de l'ingrédient de charge utile, et en particulier s'il est à prédominance hydrophile ou lipophile, et aussi des caractéristiques de la matrice alimentaire (McClements et Rao, 2011; Sessa et Donsi, 2015). La plupart des aliments sont constitués d'une phase aqueuse et nécessitent donc des nanoémulsions H/E. Inversement, les nanoémulsions E/H peuvent être utilisées dans l'encapsulation de substances hydrophiles bioactives ou en tant qu'unité structurelle d'émulsions doubles E/H/E, à ajouter dans des produits à base aqueuse (Tabibiazar et Hamishehkar, 2015).

1.6.1.2 Méthodes de préparation des nanoémulsions

Etant des systèmes cinétiquement stables et thermodynamiquement instables, la formation des nanoémulsions est un processus intrinsèquement non spontané, qui nécessite de l'énergie pour étendre la surface interfaciale (Kumar et Kumar, 2018). Les principales méthodes disponibles pour préparer des nanoémulsions, sont classées en méthodes à haute énergie (homogénéisation à haute pression, ultrasonication...) et méthodes à basse énergie (température ou la concentration d'inversion de phase et l'émulsification spontanée) (Gupta et al., 2016; Jafari et al., 2008). En effet, les méthodes à haute énergie nécessitent un apport énergétique important (10^8 à 10^{10} W/kg) pour produire des nanoémulsions alors que les méthodes à basse énergie exploitent des propriétés spécifiques des composants du système pour produire des gouttelettes nanométriques, avec un apport d'énergie minimum (103 W/kg), principalement associé à l'agitation (Gupta et al., 2016; Kumar et Kumar., 2018).

- **Méthodes à haute énergie : Exemple de microfluidisation**

La microfluidisation est une technique basée sur un assemblage à jet entrant en collision (Jafari et al., 2007; Villalobos-Castillejos, 2018). En effet, Le fluide de traitement sous pression est divisé en deux microcanaux, qui entrent en collision dans une chambre de réaction, dissipant l'énergie de pression entrante presque instantanément au point d'impact en chaleur et en contraintes mécaniques fluides (Donsi et al., 2013).

- **Méthodes basse énergie : Exemple de méthodes d'inversion de phase**

Les nanoémulsions PIT (Phase Inversion Temperature) sont fabriquées en mélangeant les ingrédients requis au PIT, ce qui correspond également à la température de HLB. Dans ces conditions, les propriétés hydrophiles et lipophiles du système sont équilibrées, la courbure spontanée moyenne du tensioactif est proche de zéro et des tensions interfaciales H/E extrêmement faibles sont obtenues favorisant ainsi la formation de très petites gouttelettes. Par conséquent, des nanoémulsions stables ne peuvent être obtenues que si, après émulsification, la température est rapidement modifiée par rapport au PIT par refroidissement ou chauffage rapide (Solans and Solé, 2012).

Les nanoémulsions PIC (Phase inversion composition) peuvent être obtenues en ajoutant de l'eau ou de l'huile dans un mélange des deux autres composants mélangés dans une microémulsion. L'absence de chauffage/refroidissement rapide rend la méthode PIC plus adaptée aux productions à grande échelle que le PIT, ainsi qu'aux composés thermosensibles. De plus, la méthode PIC convient aux nanoémulsions H/E et E/H (Silva et al., 2012).

1.6.1.3 Propriétés des nanoémulsions

La distribution granulométrique des gouttelettes de nanoémulsion, ainsi que leur composition et leur concentration, est directement responsable de plusieurs propriétés pertinentes, telles que la stabilité cinétique contre la séparation gravitationnelle, la transparence optique et le transport à travers des membranes biologiques ou des matrices poreuses (Donsi et al., 2014; Sessa et al., 2014). De plus, la distribution de la taille des gouttelettes, à travers la surface spécifique de la nanoémulsion, contrôle la vitesse de réaction avec d'autres ingrédients alimentaires ou interfaces, ainsi qu'avec les cellules biologiques. Par conséquent, la digestibilité et la bioaccessibilité des composés de charge utile sont améliorées par des gouttelettes plus fines et des surfaces spécifiques plus élevées, qui facilitent l'action enzymatique (Salvia-Trujillo et al., 2017). La composition de la surface et la charge affectent de manière significative l'interaction des gouttelettes de nanoémulsion avec la matrice environnante.

La sélection d'un émulsifiant approprié, ou d'une combinaison d'émulsifiants et de stabilisants peut conférer une stabilité stérique et/ou électrostatique importante, ce qui contribue à prévenir les phénomènes de floculation ou à favoriser l'adsorption et l'interaction avec les interfaces. Ce dernier aspect est particulièrement intéressant dans certaines applications, telles que la fourniture d'HEs comme antimicrobiens naturels, car l'interaction avec les micro-organismes cibles pourrait être améliorée. Enfin, la composition de la phase dispersée, où sont incorporés les composés de charge utile, est cruciale pour protéger leur stabilité chimique, prévenir les phénomènes d'instabilité physique dus à la maturation d'Ostwald, ainsi que contrôler leur libération en phase continue (Donsi et al., 2012; Donsi et Ferrari, 2016).

1.6.1.4 Selection d'émulsifiants de qualité alimentaire

Les émulsifiants sont des substances tensioactives, capables de former des films monomoléculaires, multimoléculaires ou particuliers autour des gouttelettes dispersées, contribuant à la formation et la stabilisation de l'émulsion. La combinaison de différents surfactants offre certains avantages fonctionnels en raison de la combinaison d'un surfactant hydrophile dans la phase aqueuse et un tensioactif hydrophobe dans la phase huileuse pour former un film complexe à l'interface des nanoémulsions visées (McClements et Jafari, 2018; Porras et al., 2004). Les agents tensioactifs sont caractérisés par l'équilibre hydrophile-lipophile (HLB). C'est une grandeur indicative sur leur activité de surface qui permet de déterminer la prévalence des groupes de tête hydrophiles ou des queues hydrophobes (Maali et Mosavian, 2013). Les tensioactifs avec des nombres HLB compris entre 8 et 18 sont capables de former des monocouches à l'interface Huile-Eau induisant à la réduction de la tension interfaciale (Donsi et Ferrari, 2016). Les tensioactifs avec des nombres HLB compris entre 3 et 6 favorisent la formation d'émulsions E-H. Cependant, le nombre HLB ne donne aucune prédiction sur la quantité d'émulsifiant à utiliser pour former une émulsion stable (Macedo et al., 2006). Il existe une demande croissante dans l'industrie alimentaire pour des émulsifiants naturels. Les industriels cherchent souvent des surfactants de qualité alimentaire qui possèdent une d'adsorption rapide sur l'interface Eau-Huile, une activité de surface élevée et une répulsion stérique ou électrostatique qui empêche la recalescence des gouttelettes et garantir ainsi la stabilité des nanoémulsions (Donsi et al., 2012b; Ozturk et McClements, 2016). Différents types de surfactants sont utilisés dans l'industrie alimentaire, comme exemple se trouvent :

- Les protéines : des macromolécules tensioactives adaptées pour s'adsorber sur les interfaces Eau-Huile formant d'épaisses couches interfaciales et générant des répulsions électrostatiques grâce à leurs acides aminés hydrophiles et hydrophobes ainsi que leurs

chaînes polypeptidiques tels que les caséines et les protéines de lactosérum (Ozturk et McClements, 2016).

- Les phospholipides : des molécules amphiphiles naturelles à une activité de surface élevée tels que les graines de tournesol et la lécithine de soja (Ozturk et McClements, 2016; Sessa et al., 2014).

- Les polysaccharides : des molécules généralement grosses adaptés pour la stabilisation des émulsions H/E en formant des couches épaisses hydrophiles sur les gouttelettes d'huile nécessitant ainsi une plus grande charge de surface que les protéines. Le mécanisme de stabilisation des films de polysaccharides est la répulsion stérique et la gomme arabique est le polysaccharide naturel le plus utilisé dans les émulsions pour l'industrie alimentaire (Mahfoudhi et al., 2014; Ozturk et McClements, 2016).

1.6.1.5 Caractérisation des nanoémulsions

L'analyse de la taille des gouttelettes des nanoémulsions est généralement effectuée par des techniques de comptage, telles que la diffusion statique de la lumière, qui repose sur la surface projetée des particules et leurs propriétés optiques, ou par la diffusion dynamique de la lumière, également connue sous le nom de spectroscopie de corrélation, qui est plutôt basée sur la fluctuation de la diffusion de la lumière due au mouvement brownien des gouttelettes (Donsì et al., 2012b). Ces mesures peuvent être exprimées directement sous forme de distribution de taille, ou sous forme de taille moyenne de gouttelettes (ou diamètre hydraulique) et d'un indice de polydispersité (PDI) (Donsì et al., 2012b; Faridi Esfanjani et al., 2017). La stabilité physique des nanoémulsions est généralement évaluée dans le temps, dans termes de variation de la taille moyenne des gouttelettes, de la polydispersité, du potentiel zêta ou de la transmission de la lumière (Sessa et al. 2011). Selon Almasi et al. (2020), les valeurs PDI < 0,3 établissent un modèle étroit de taille de particules, de distribution de taille, résultant en une uniformité de gouttelettes d'émulsion adaptée à de nombreuses applications telles que les formulations de films alimentaires. La mesure du potentiel zêta, qui est liée à la charge de surface des gouttelettes de nanoémulsion, peut être effectuée par la quantification de leur mobilité électrophorétique, avec différents instruments, tels que Brookhaven Zeta PALS ou Malvern Panalytical Zetasizer Nano Series (Jaiswal et al., 2015; Tastan et al., 2016). Pour les dispersions stabilisées électrostatiquement, il a été démontré que plus la valeur du potentiel zêta est élevé, plus la dispersion est stable. On considère que les nanoémulsions à potentiel zêta très faible (- 30 mV) ou très élevé (+ 30 mV) sont les nanoémulsions les plus stables (Asmawati et al., 2014).

1.6.2 Choix de matrice d'encapsulation

Le choix de la matrice d'encapsulation pour un système à base d'HEs est souvent caractérisé par l'utilisation des polymères ayant des propriétés hydrophiles et hydrophobes (les gommes, les protéines...). Cependant, l'utilisation des polymères combinés est préférée en raison de l'amélioration des propriétés barrières. De ce fait, le choix du polymère adéquat se base sur certaines propriétés tels que la faible viscosité, le faible coût, la libération contrôlée du composé actif, les propriétés émulsifiantes, inodore et fade au goût (Botrel et al., 2015; Jafari et al., 2008). Il détermine l'efficacité du processus d'encapsulation, la stabilité des particules ainsi que le degré de protection du noyau (Bakry et al., 2016). Cependant, vu que la majorité d'HEs présentent une sensibilité considérable à la lumière, l'air, la température élevée et de plus de la sensibilité de certaines matrices alimentaires comme le fromage à la température et l'humidité (Leclercq-Perlat et al., 2012; Zehren, 1984), la conversion des émulsions liquides en poudre sèche est une application importante pour les industries alimentaires (Jafari et al., 2008). Pour ce faire, plusieurs techniques physiques (séchage par atomisation, refroidissement par pulvérisation, extrusion, lyophilisation...), chimiques (inclusion moléculaire, polymérisation interfaciale...) ou physicochimiques (séparation des phases organiques, piégeage des liposomes...) peuvent être adaptées. Toutefois, le séchage par atomisation est la technique d'encapsulation la plus utilisée et favorisée dans les industries alimentaires. Il s'agit d'un procédé économique qui induit la formation des particules de poudre solide de bonne qualité avec une volatilité réduite et moins d'oxydation (Geranpour et al., 2020; Jafari et al., 2008). En diminuant la teneur en eau et l'activité de l'eau, le séchage par atomisation permet d'assurer une stabilité microbiologique des produits et éviter les risques de dégradations chimiques et/ou biologiques. L'équipement est facilement disponible et les coûts de production sont inférieurs à la plupart des autres méthodes. Comparé à la lyophilisation, le coût de la méthode de séchage par pulvérisation est 30 à 50 fois moins cher. Le séchage par pulvérisation a été considéré comme une solution aux problèmes de séchage conventionnel car le procédé s'est généralement révélé non seulement efficace mais aussi économique (Gharsallaoui et al., 2007; Murugesan and Orsat, 2012).

1.6.2.1 Principe de séchage par atomisation

La **Figure 1.2** illustre un schéma opérationnel du processus de séchage par atomisation (Botrel et al., 2015). La structure du sécheur par pulvérisation se compose de plusieurs éléments principaux, notamment la pompe d'alimentation, l'atomiseur, la chambre de séchage, le cyclone et le conteneur de produit.

Brièvement, le processus est conçu de manière à ce que l'air chaud et les aliments pénètrent simultanément dans la chambre de séchage. Le gaz entrant peut être à co-courant ou à contre-courant. La surface des particules résultantes est le matériau porteur, tandis que l'eau s'évapore. La pulvérisation est réalisée au moyen de buses ou de disques tournant à grande vitesse (Kostov et al., 2016). Ainsi, les gouttelettes atomisées sèchent en quelques secondes au contact de l'air chaud et sont recueillies dans le réservoir à poudre (Geranpour et al., 2020). La poudre est récupérée au fond du sécheur. Habituellement, les temps de séchage sont de l'ordre de 5 à 100 s. En règle générale, la forme des particules est sphérique et la taille moyenne est comprise entre 10 et 100 μm (Fang & Bhandari, 2010).

Pour obtenir une microencapsulation réussie par séchage par pulvérisation, les conditions préalables importantes sont la solubilité élevée des matériaux de la matrice dans le solvant et la faible viscosité de la solution (Jia et al., 2016).

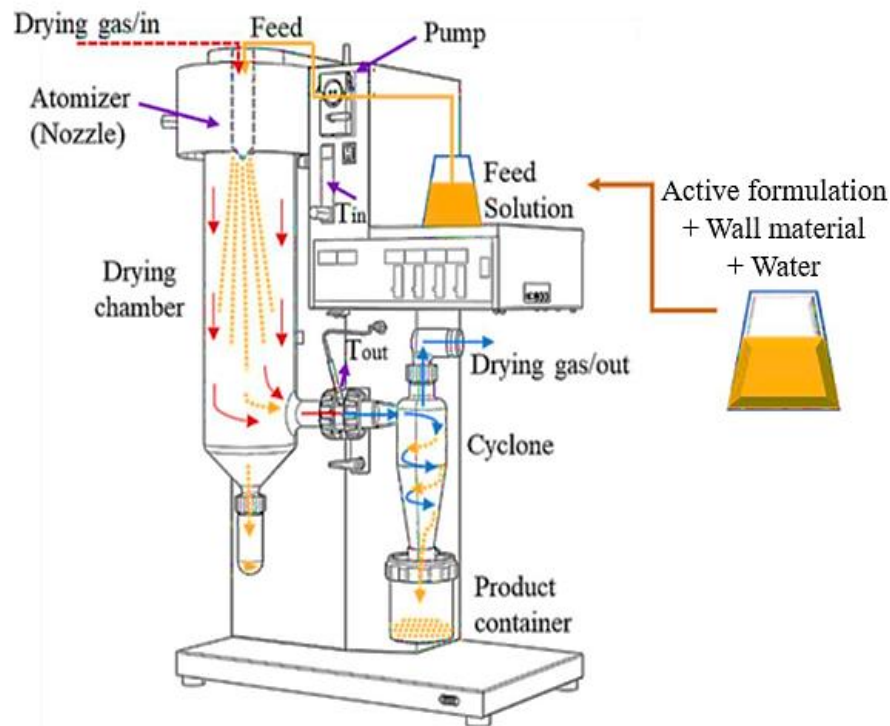


Figure 1.2 Système de fonctionnement général d'un sécheur par atomisation, contenant le réchauffeur d'air, le système d'alimentation, l'atomiseur, les chambres de séchage et le cyclone.

1.6.2.2 Principaux paramètres de séchage par atomisation

Le procédé de séchage par atomisation dépend fortement des propriétés du matériau de paroi, de la conception de l'équipement ainsi que la corrélation des différents paramètres adaptés. Ces facteurs affectent directement la qualité du produit fini en termes de morphologie, d'humidité résiduelle et de granulométrie. De ce fait, le bon choix de ces paramètres demeure une étape primordiale afin de générer le résultat visé. Les principaux paramètres physiques du séchage par atomisation sont listés ci-dessous :

- Débit d'alimentation : le débit de la pompe affecte la différence de température entre l'entrée et la sortie et la taille finale des particules. En effet, une augmentation du débit de la pompe d'alimentation abaisse la température de sortie et augmente la différence de température entre l'entrée et la sortie. Cependant, la réduction du débit de la pompe, tout en maintenant la température d'entrée et le débit d'aspiration constants, conduit à un produit final plus sec

- Débit de gaz de pulvérisation : c'est la quantité de gaz comprimé nécessaire pour disperser la solution liquide dans le cône de pulvérisation. Ce débit est réglé manuellement par une vanne à pointeau entre 300 et 800 NI/h. Un débit de pulvérisation de gaz plus élevé conduit à des gouttelettes plus petites et, par conséquent, à des particules séchées plus petites.

- Concentration en solides : Elle dépend fortement de l'application. En effet, une augmentation de la concentration en solides dans la charge conduit à des particules séchées plus grosses et plus poreuses. Principaux polymères utilisés pour le séchage par atomisation.

- Tension de surface d'alimentation : une tension superficielle élevée est difficile à atomiser car elle doit être surmontée par l'atomiseur pour réaliser la pulvérisation. Afin de s'affranchir de la tension superficielle de la charge, il est conseillé de préparer une émulsion avec émulsifiant et passer par une étape d'homogénéisation avant de procéder au séchage par atomisation.

- Température d'entrée : c'est la température du gaz de séchage chauffé. Elle est directement liée à la température de bulbe humide de l'air chaud environnant et est souvent associée à la capacité d'évaporation du séchoir et à l'efficacité thermique. La température d'entrée est réglée à une valeur où un gradient de température entre la surface des gouttelettes humides et le gaz saturé chaud conduit à une évaporation du solvant.

- Température de sortie : Elle est déterminée par le bilan thermique et massique dans le cylindre de séchage et ne peut pas être réglée. En règle générale, la température maximale subie par le produit est considérée comme la température de sortie mesurée. La considération la plus importante est le choix de la différence de température optimale entre la température d'entrée et la température de sortie. En effet, pour obtenir un produit avec une très faible

quantité d'humidité résiduelle, la température d'entrée doit être réglée aussi haut que possible et la différence de température doit être aussi petite que possible.

- Débit/vitesse de l'aspirateur : L'aspirateur est associé à l'alimentation en gaz de séchage dans la chambre de séchage. La modification du débit ou de la vitesse de l'aspirateur permet de réguler la quantité de gaz de séchage entrant dans la chambre de séchage, ce qui a un effet significatif sur les performances de séchage.

- Temps de séjour des particules : Le temps de séjour typique pour un séchoir par pulvérisation à l'échelle du laboratoire est de 0,2 à 0,35 s. En effet, les particules fines contenant à une teneur en humidité élevée subiront une évaporation facile et nécessiteront un temps de séjour court. Toutefois, les pulvérisations fines à semi-grosses qui doivent être séchées à une faible teneur en humidité nécessitent un temps de séjour moyen tandis que les pulvérisations plus grossières qui doivent atteindre une teneur en humidité résiduelle inférieure nécessitent un temps de séjour long.

1.6.2.3 Principaux biopolymères adaptés pour le séchage par atomisation

De plus du bon choix des paramètres d'atomisation, la sélection du biopolymère adéquat pour la formation de bonnes microcapsules demeure un critère essentiel (Villalobos-Castillejos, 2018). Des exemples de biopolymères les plus utilisés dans le séchage par atomisation (principalement la classe des glucides et des protéines) sont présentés dans le **Tableau 1.3** ci-dessous.

Tableau 1.3 Exemples de biopolymères utilisés dans la microencapsulation par séchage par atomisation d'huiles et d'arômes alimentaires

Biopolymères	Propriétés	Exemples	Huiles encapsulées	Références
Les glucides				
Amidons hydrolysés	Bonne barrière à l'oxygène Faible cout Faible viscosité Haute teneur en solides Stabilisation	Extrait sec de sirop de maïs, Maltodextrines...	Arôme de fromage, Huile d'écorce d'orange, Huile de citron, Acide linoléique...	Jafari et al., 2008 Bhandari et al., 1992 Anandaraman et Reineccius, 1986; Kenyon et Anderson, 1988; Minemoto et al., 2002
Amidons modifiés	Très bonne émulsion Stabilisation Peu coûteux	Amidon de maïs, N-lok, Hi-Cap...	Huile d'orange, D-limonène, Poivre noir, Huile de beurre, Huile de poisson, Vitamine E...	(Chen and Wagner, 2004 ; Jafari et al., 2008 ; Jeon et al., 2003 ; King et al., 1976 ; Soottitawat et al., 2005)
Gommes	Bonnes émulsions Bonne rétention des volatils Bonne solubilité	Gomme arabique, gomme mesquite...	HEs, Huiles végétales, Monoterpènes, Acide linoléique, Lipides...	Geranpour et al., 2020, Jafari et al., 2008, Fuchs et al., 2006; McNamee et al., 1998
Les protéines				
Protéines de lait	Biocompatibilité, Biodisponibilité, Biodégradabilité, Très bonnes émulsions, Propriétés filmogènes, Flexibilité de la chaîne moléculaire...	Protéines de lactosérum Caséinates Poudres de lait écrémé	Matière grasse du lait, l'acide linoléique ; l'huile de soja ; huile d'avocat ; l'huile de poisson L'huile de poisson, L'huile de soja ; HE de cumin, Saveurs d'origan et de marjolaine...	Bae et Lee, 2008; Geranpour et al., 2020; Jafari et al., 2008; Lavanya et al., 2020.
Autres biopolymères				
Autres protéines ; polysaccharides, chitosane, alginate, celluloses modifiées, gélatine...				

1.7 Hypothèses, objectifs et moyens

1.7.1 Problématique

Le fromage est un produit à risque du point de vue de la contamination par des moisissures indésirables. Afin de remédier à ce problème, la natamycine (E235) est un conservateur alimentaire couramment utilisée comme antifongique à la surface des fromages entiers et râpés. Toutefois, plusieurs consommateurs sont soucieux des ingrédients ajoutés dans les produits du fait de ses effets secondaires potentiels mais aussi à cause du phénomène de résistance aux antibiotiques. Ils visent de plus en plus des produits alimentaires naturels

dépourvus des conservateurs artificiels. Dans le cadre d'une démarche « étiquette épurée », les fabricants désirent ainsi retirer ce composé de la liste des additifs alimentaires et sont à la recherche de différentes alternatives à partir d'extraits naturels antimicrobiens.

Dans le cadre de ce projet, il est proposé de développer une technologie alternative utilisant des composés naturels aussi efficaces que la natamycine contre les moisissures d'altération du fromage râpé, qui sera stable au cours du procédé de fabrication et de l'entreposage et ce, sans affecter le goût du produit fini. La mise en place de la technologie proposée dans les industries de transformation permettrait de réduire les pertes en lien avec l'innocuité alimentaire en allongeant de la durée de conservation du fromage. De plus, le suivi du concept « étiquette épurée » génère un impact positif sur les écosystèmes et améliore la qualité de vie et la santé des consommateurs en utilisant des aliments sains, sans additifs nuisibles à la santé. Ce projet s'intègre aussi comme solution pour lutter contre les micro-organismes pathogènes de détérioration qui deviennent plus résistants aux antibiotiques.

1.7.2 Hypothèses

- Certains extraits naturels renferment des composés antifongiques qui peuvent agir en synergie et remplacer la natamycine afin de:
 - Réduire la croissance de moisissures de détérioration dans le fromage râpé.
 - Améliorer la qualité du produit et d'augmenter ainsi, sa durée de vie.
- L'encapsulation des composés bioactifs sous forme de microémulsion dans des matrices à base de biopolymères est une approche technologique innovante qui permet de:
 - Assurer la stabilité des antimicrobiens au cours des procédés de fabrication et de l'entreposage.
 - Contrôler l'activité biologique, la biodisponibilité et une meilleure protection de la matrice fromagère.

1.7.3 Objectifs

L'objectif général est de développer une formulation antifongique complexe à base d'additifs d'origines naturelles aussi efficace que la natamycine et de mettre au point un procédé d'encapsulation afin que les propriétés organoleptiques du fromage râpé restent intactes, et l'exigence des consommateurs pour des produits « étiquette épurée » sera respectée. Plus précisément, les principaux objectifs sont :

- 1) Sélectionner et caractériser *in vitro* les meilleurs composés antifongiques naturels par **i)** détermination de leur capacité inhibitrice (test de diffusion sur agar), **ii)** détermination de

leur concentration minimale inhibitrice (CMI), **iii**) évaluation de la synergie entre les meilleurs composés combinés (checkerboard) afin d'aboutir à la formulation désirée.

- 2) Développer une méthode d'encapsulation de la formulation antimicrobienne développée :
 - i) Optimiser des paramètres de microdispersion (microémulsions) et de microencapsulation de la formulation dans des matrices à base de biopolymères
 - ii) caractérisation des microémulsions encapsulées (structure, morphologie, taille des gouttelettes, propriétés antimicrobiennes *in vitro*).
- 3) Évaluer les propriétés organoleptiques des fromages traités avec la formulation développée.
- 4) Évaluer *in situ* la capacité antifongique des microémulsions encapsulées sur la qualité microbienne du fromage râpé (test de provocation), sur sa durée de vie et sur ses propriétés physico-chimiques (couleur, activité d'eau).

1.7.4 Moyens pour atteindre les objectifs

Pour atteindre ces objectifs :

- 1) Le "screening" *in vitro* des meilleurs composés antifongiques de sources naturelles a été assuré via deux analyses:

- Une analyse semi-quantitative : consiste à mesurer la capacité d'inhibition d'une sélection d'extraits antifongiques sur les souches de moisissures sélectionnées par la méthode de **diffusion sur gélose** et **de puits** (Hossain et al., 2014; Millette et al., 2007).
- Une analyse quantitative : consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (**CMI**) de la sélection d'extraits précédents sur les moisissures étudiées par le **test de micro-dilution** afin de définir la plus faible concentration d'antimicrobien indiquant une inhibition totale de la croissance microbienne. Cette analyse a été réalisée sur microplaques à fond plat de 96 puits tel que décrit par Ben-Fadhel et al. (2019). Brièvement, chaque puits a été inoculé avec 100 µL de moisissure à une concentration de 10⁵ conidies/mL mélangé avec 100 µL de solution-mères d'extraits antimicrobiens initialement préparés. Pour chaque composé testé, une ligne de puits sert de témoin négatif et la dernière colonne sert de témoin positif. Les microplaques, recouvertes d'une pellicule d'acétate adhésive, ont été incubées pendant 48 h à 28°C, sous agitation à 800 rpm en utilisant un agitateur MS1 S7 Microtiter Plate Shaker (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). L'absorbance a ensuite été mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques BioTek ELx800® (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

- 2) Les composés ayant prouvés une meilleure CMI ont été adaptés pour évaluer leur effet combiné par la méthode du **Checkerboard** en déterminant l'indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (**FIC**) contre chaque moisissure testée et ainsi les formulations antifongiques ont été établies (Hossain et al. 2016).
- 3) La mise au point des **microémulsions antifongiques** à base de la formulation développée a été établie en utilisant un procédé de microfluidisation. La taille particulaire ainsi que la stabilité de microémulsion au cours de l'entreposage ont été également suivis et contrôlés en utilisant la technique de diffusion de la lumière via Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Germany) en se basant sur la méthode de Maherani et al. (2019).
- 4) Le **procédé d'encapsulation** des microémulsions initialement préparées a été développé et optimisé en choisissant les biopolymères adéquats comme matrice d'encapsulation et en assurant un bon rendement du procédé. Le **séchage par atomisation** de la formulation développée encapsulée dans du WPI et de la maltodextrine a été réalisé en utilisant l'atomiseur Buchi-B290 (Fernandes et al., 2018; Shah et al., 2012; Zouari et al., 2021). La poudre obtenue a été caractérisée (FTIR, Efficacité d'encapsulation, Rétention d'huile...).
- 5) Une **évaluation sensorielle** de la mozzarella râpée traitée par cinq (5) concentrations de la formulation en poudre a été établie et comparée au fromage du contrôle (non traité par la formulation en poudre). L'analyse a été réalisée sur deux (2) jours par quinze (15) panélistes à l'aide d'une échelle hédonique à 9 points (1 = me déplaît énormément ; 5 = m'est indifférent ; 9 = me plaît énormément). Pour chaque panéliste, trois (3) et quatre (4) échantillons de fromage râpé ont été servis aux jours 1 et jour 2 respectivement pour évaluer l'odeur, la texture, le goût et l'appréciation globale.
- 6) La concentration appréciée par les panélistes a été retenue, appliquée sur de la Mozzarella rapée afin d'évaluer son activité antifongique via des tests **in situ** par **l'estimation de la durée de conservation** de la mozzarella râpée d'une part et le **test de provocation** d'autre part. Pour se faire, Les dénombrements de la flore mésophile totale (FMT), des bactéries lactiques (LAB) et des levures et moisissures (Y/M) ont été analysés et suivis au cours de l'entreposage à 4°C. Les comptages ont été assurés par dénombrement sur Plate Count Agar (PCA ; BD Difco Inc.), MRS Agar (Alpha Biosciences Inc.) et Potato Dextrose Agar avec chloramphénicol (PDA; Alpha Biosciences Inc.). Les plaques ont été incubées pendant 24 h à 37°C pour le FMT, 48 h à 30°C pour les LAB et 72 h à 28°C pour la détermination Y/M. Les résultats ont été exprimés en comptages (Log CFU/g). L'analyse par test de provocation a été établie dans une deuxième partie dans le but d'évaluer les propriétés antifongiques de la formulation en poudre, appliquée sur de la mozzarella rapée, contre un consortium

composé des cinq (5) plus résistantes souches fongiques (*A. niger*, *P. commune*, *Paecilomyces spp*, *P. citrinum* et *P. crustosum*). Cette activité a été comparée en parallèle à celle de la mozzarella râpée traitée avec la natamycine d'une part et la mozzarella râpée non traitée d'autre part. Les groupes de fromage en été conservés à 4°C. Les analyses microbiologiques ont été effectuées aux 0,1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42,49 et 56 jours de stockage par dénombrement sur PDA suite à une incubation de 48 à 72 h à 28°C.

- 7) Parallèlement aux tests *in situ* évoqués ci-dessus, une évaluation de la stabilité **physico-chimique** des fromages de la mozzarella râpée au cours de l'entreposage (4°C) a été assurée. **La stabilité des couleurs** a été suivie en se basant sur la méthode de Ben-Fadhel et al. (2021), à l'aide d'un colorimètre Minolta Color reader CR10 (Konica Minolta Sensing Inc., Mahwah, NJ, USA). Des mesures de réflectance ont été réalisées sur la surface des fromages scellés sous air (SA) et sous azote (SL). Les paramètres de couleur L* (clarté, noir = 0, blanc = 100), a* (rougeur > 0, verdeur = 0, bleu < 0), b* (bleu-jaune de - 300 à +299) et le total la différence de couleur (ΔE^*) ont été déterminés. Aussi, des mesures de **l'activité d'eau (a_w)** ont été effectuées à intervalles réguliers durant la période de conservation des mozzarellas à l'aide d'un système Rotronic AwQuick A2101 équipé d'une sonde AWC (G'eneq Inc., Montréal, QC, Canada).

CHAPITRE 2: Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend

Développement d'une formulation antifongique naturelle pour le fromage râpé et d'une approche de microencapsulation utilisant un mélange d'isolat de protéines de lactosérum et de maltodextrine

Ghada Sassi, Stephane Salmieri, Zahra Allahdad, Salwa Karboune, Monique Lacroix

L'article a été publié dans le journal scientifique « Journal of Food Science » le 19 août 2022; Soumis le 14 juin 2022; Accepté le 13 juillet 2022 ; Facteur d'impact: 3.693

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16273>

Le nombre de figures et de tableaux et le style des références ont été présentés selon le guide des auteurs du journal

Contribution des auteurs

Ce travail de recherche a été réalisé sous la supervision du Pr. Monique Lacroix. Toutes les expériences ont été réalisées en laboratoire par Ghada Sassi et les discussions sur les résultats et tests statistiques ont été assistés par Stéphane Salmieri. L'article a été écrit par Ghada Sassi, tandis que les corrections et révisions ont été effectuées par Stéphane Salmieri, Zahra Allahdad, Dr. Salwa Karboune et Pr. Monique Lacroix.

Résumé

L'activité antifongique des composés naturels tels que les huiles essentielles (HE), les extraits d'agrumes et d'autres dérivés naturels a été évaluée contre dix souches fongiques en se basant sur une analyse de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les composés ayant l'activité inhibitrice la plus élevée aux plus faibles concentrations ont ensuite été sélectionnés pour évaluer leurs possibles combinaisons synergiques par la méthode du damier (FIC). Les résultats ont montré que l'extrait d'agrumes A (CEA) et les HEs riches en cinnamaldéhyde avaient la capacité inhibitrice la plus élevée contre les souches évaluées (*Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Eurotium rubrum*, *Paecilomyces spp*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*, *Penicillium crustosum* et *Penicillium roqueforti*). La stabilité de la suspension antifongique a ensuite été optimisée en utilisant de la lécithine et du sucrose monopalmitate (SMP) comme tensioactifs. Le test de stabilité a montré que la lécithine : SMP à HLB 10 maintient une meilleure stabilité de l'émulsion antifongique pendant 15 jours de stockage à 4°C. Le processus d'encapsulation de l'émulsion chargée a été optimisé en utilisant un mélange d'isolat de protéines de lactosérum (WPI) et de la maltodextrine (MD) avec des rapports WPI :MD (1 :2) et WPI :MD (1 :3). Les résultats ont montré que WPI :MD (1 :3) entraînait une meilleure stabilité physicochimique (-40,5 mV), une très bonne efficacité d'encapsulation (91 %) ainsi qu'une activité antifongique plus élevées à des faibles concentrations (315 ppm). Le procédé d'encapsulation adapté a permis de maintenir la teneur en composés actifs disponibles plus longtemps avec un intervalle moyen de 7 jours par rapport aux formulations non encapsulées pendant le stockage à 4°C.

Mots clés : Antifongique ; extraits naturels ; nanoémulsion ; stabilité ; encapsulation

Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend

G. Sassi^a, S. Salmieri^a, Z. Allahdad^a, S. Karboune^b, M. Lacroix^{a*}

^a INRS – Armand-Frappier Health Biotechnology Research Centre, Research Laboratories in Sciences, Applied to Food (RESALA), MAPAQ Research Chair in food safety and quality, Canadian Irradiation Centre (CIC), Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), 531 des Prairies Blvd, Laval, QC H7V 1B7, Canada

^b Department of Food Science and Agricultural Chemistry, Macdonald Campus, McGill University, 21111 Lakeshore Road, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3V9, Canada

* Corresponding author. Prof. Monique Lacroix, Email: monique.lacroix@inrs.ca

MAPAQ chair on antimicrobial effects of stabilised natural antimicrobials in order to assure food safety and quality

Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501.

Abstarct

The antifungal activity of natural antimicrobials such as essential oils (EOs), citrus extracts and other natural derivatives was evaluated against ten fungal strains using minimum inhibitory concentration (MIC) analysis. Compounds having the highest inhibitory activity at the lowest concentrations were subsequently selected to evaluate possible synergistic interactions by checkerboard method (FIC). Results showed that citrus extract A (CEA) and EOs rich in cinnamaldehyde had the highest inhibitory capacity against evaluated strains (*Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Eurotium rubrum*, *Paecilomyces spp*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium commune*, *Penicillium crustosum* and *Penicillium roqueforti*). The stability of the antifungal mixture was then optimized using lecithin and sucrose monopalmitate (SMP) as surfactants. Stability test showed that lecithin: SMP at HLB 10 maintain emulsion stability for 15 days of storage at 4°C. Encapsulation process for the loaded emulsion was optimized using whey protein isolate (WPI) and maltodextrin (MD) blend with ratios WPI: MD (1:2) and WPI: MD (1:3). Results showed that WPI: MD (1:3) led to a higher physicochemical stability (-40.5 mV), encapsulation efficiency (91%) and antifungal activity (315 ppm). Microencapsulation maintained the available active compounds content more prolonged with an average interval of 7 days compared to the non-encapsulated formulations during storage at 4°C.

Keywords: Antifungal; Natural extracts; Nanoemulsion; Stability; Encapsulation

2.1 Introduction

Cheese microbiota present a complex ecosystem that contains various types of undesirable yeasts and molds (Y/M). They can pass into cheeses from various sources such as equipment and technical personnel (Garnier et al., 2017). These spoilage fungi can produce mycotoxins that pose a high risk to human health (Basilico et al., 2001). For these reasons, cheese makers employ suitable preservatives such as natamycin to ensure final product safety and stability. However, the use of such fungicide becomes less appreciated due to its potential side effects and more importantly with the appearance of a serious problems concerning the development of antibiotic resistance. Nowadays, customers are becoming more rigorous and attentive in their needs and choices of cheese products. Their interest in wholesome foods has grown greatly in order to consume a product without artificial preservatives. This behavior has prompted cheese makers to introduce new alternatives and technologies respecting a clean label approach in view of satisfying their consumer's needs. In this direction, using plant-based extracts as essential oils (EOs) can be a good alternative to meet this need. The antimicrobial activity of many EOs has been already studied and verified. Davidson and Naidu (2000) mentioned that cinnamon bark has a high concentration of cinnamaldehyde, and thyme plant contains polyphenols such as thymol which are responsible for their strong antimicrobial activity (Juneja et al., 2012). Sun et al. (2020) showed that cinnamon EO was effective against *Fusarium spp.* *Aspergillus spp.* and mycotoxin production. Despite their high volatility, several factors such as heating, humidity and oxygen induce EOs decomposition as the result of isomerization, cyclization, dehydrogenation reactions or oxidation (Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021). High concentrations of EOs may create undesirable flavors adversely affecting sensorial properties and food quality (Tiwari et al., 2009). In order to minimize such effects and improve the antimicrobial activity, encapsulation is widely used as a solution to protect the core materials bioactivity and increase their chemical stability (Wang et al., 2017). Carrier matrices play an important role in the development of an effective encapsulation method. Indeed, choosing the appropriate biopolymer depends on many factors such as food matrices, emulsifying properties, viscosity, stability and cost. Milk proteins such as whey proteins have very good emulsifying properties and were used for encapsulation of soy oil, linoleic acid and cumin EO (Jafari et al., 2008). However, it has been claimed that globular proteins stabilizing whey protein isolate (WPI)-based emulsions are flocculated during storage leading to increased particle size and consequently less emulsion stability (Hou et al., 2019). Also, the exposure of hydrophobic residues as a result temperature increment promotes hydrophobic interactions of protein-protein and system instability. Hence, the stability of WPI-based nanoemulsions tends to decrease during storage. In order to improve this stability, it is proposed to combine WPI with polysaccharides such as maltodextrin

(MD). Indeed, in an emulsion system containing both proteins and polysaccharides, proteins form a coherent viscoelastic layer adsorbed onto the oil-water interface whereas polysaccharides confer stability through their thickening and gelling properties in the aqueous phase (Sonu et al., 2018). In this study, we first explore that, some natural extracts have antifungal properties that can act in synergy in order to reduce the growth of grated cheese spoilage fungi. Secondly, the encapsulation of antifungal formulations is an effective technological process allowing the control of the biological activity and the bioavailability providing a good protection to the cheese matrix. In light of this, the present paper aims to develop a complex, stable antifungal formulation based on natural additives effective to destroy a selected variety of cheese molds and a corresponding encapsulation process while respecting consumer's demand for "Clean Label" products. Indeed, an approach was developed to optimize the efficient minimum concentration of antifungal extracts through the development of an encapsulated oil-in-water (o/w) natural formulation using WPI and MD mixture. The antimicrobial activity, encapsulation efficiency as well as the stability of the antifungal-loaded emulsion were also tested.

2.2 Materials and Methods

2.2.1 Materials

Compounds provided by different suppliers are presented in **Table 2.1** Sucrose monopalmitate (SMP; Habo Monoester P90) and HHSL lecithin were kindly provided by COMPASS Foods Pte Ltd. (Singapore). WPI (90% proteins) was supplied by Agropur (Saint-Hubert, QC, Canada). MD (DE 16.5-19.5) was from Sigma-Aldrich, (Oakville, ON, Canada). Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Broth (PDB) and sterile peptone water were provided by Alpha Biosciences (Baltimore, MD, USA). Vitamin E oil was from NineLife (Lewes, DE, USA).

Table 2.1 Natural selected compounds.

	Common name	Botanic name	Origin	Plant part	Major chemical compounds (%)
1	Garlic EO ^a	<i>Allium sativum</i>	Chine	Bulb	Diallyl sulfide (10.03), diallyl disulfide (34.61), allyl trisulfide (29.82)
2	White thyme EO ^a	<i>thymus zygis</i>	France	Aerial part	p-Cymene (19.56), γ -terpinene (9.94), linalool (6.00), thymol (44.84)
3	Clove EO ^a	<i>Clove bud oil</i>	Indonésie	Bud	Eugenol (75.10), β -caryophyllene (11.52), eugenyl acetate (9.20)
4	Clove EO ^b	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Sri Lanka	Bud	Eugenol (78.00), eugenyl acetate (13.77)
5	Cinnamon EO ^b	<i>Cinnamomum cassia</i>	China	Bark	Cinnamaldehyde (55.09%), cinnamyl acetate (9.57%)
6	Cinnamon EO ^b	<i>Cinnamomum verum</i>	Madagascar	Leaves	Cinnamaldehyde (66.2), cinnamyl acetate (15.6)
7	Cinnamon Ceylon EO ^b	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Sri Lanka	Bark	Cinnamaldehyde (55.09%), cinnamyl acetate (9.57%)
8	Oregano EO ^b	<i>Origanum heracleoticum</i>	Greece	Flowers	Carvacrol (82.90)
9	Oregano compact EO ^b	<i>Origanum compactum</i>	Morocco	Flowers	p-Cymene (21.05), γ -terpinene (11.2), thymol (14.55), carvacrol (39.45),
10	Sweet orange EO ^b	<i>Citrus sinensis</i>	Mexico	Zest	(R)-(+)-limonene (95.60),
11	Holy basil EO ^b	<i>Ocimum sanctum</i>	India	Leaves	Eugenol (49.90), β -caryophyllene (30.63), α -humulene (6.18)
12	Bay EO ^b	<i>Pimenta dioica</i>	Guatemala	Seeds	Eugenol (47.78), myrcene (26.76), geraniol (10.40)
13	Rosemary camphor EO ^b	<i>Rosmarinus camphoriferum</i>	Spain	Flowers	α -pinene (18-26), eucalyptol (17-25), camphor (12.5-22), canfene (8.5-13)
14	Lemongrass EO ^c	<i>Cymbopogon citratus</i>	India	Herb	Neral (29.45), geraniol (37.13), geraniol (10.65)
15	Citrus extract A (CEA) ^d	----	Canada	----	Polyphenols (3.36), flavonoids (0.62)
16	Citrus extract B (CEB) ^d	----	Canada	----	Citrus extract A, lauric arginate, fructo-oligosaccharide
17	Propolis extract ^b	----	Canada	----	Raw propolis (15)
18	Reuterin ^e	----	Canada	----	Supernatant of <i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 53608
19	Bacteriocin ^f	----	Canada	----	Supernatant of de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL1285
20	Lactic acid ^g	----	Canada	----	D, L-lactic acid (80)

^a EO supplied by Novotaste (Dollard-des-Ormeaux, QC, Canada); ^b EO supplied by Zayat Aroma (Bromont, QC, Canada); ^c EO supplied by Aliksir (Grondines, QC, Canada); ^d Citrus extracts supplied by Kerry; ^e produced in the laboratory of Prof. Lacroix INRS – Armand-Frappier Centre (Laval, QC, Canada); ^f supplied by Bio-K+ (Laval, QC, Canada); ^g Product supplied by Laboratoire Mat (Quebec, QC, Canada).

2.2.2 Preparation of fungal cultures

Ten (10) mold strains responsible for cheese products spoilage were identified (**Table 2.2**) and stored at -80°C. Fungal cultures were prepared according to the method of Ben-Fadhel et al. (2017). The solution was fixed to 10⁵ conidia/mL and used for future tests.

Table 2.2 Fungal strains used in the study.

Genus	Strain	Strain number	Origin
<i>Aspergillus</i> ¹	<i>niger</i> ¹	3071-13	Dairy industry
<i>Aspergillus</i> ²	<i>versicolor</i> ²	LMA-370	----
<i>Aureobasidium</i> ¹	<i>pullulans</i> ¹	27164	Dairy industry
<i>Eurotium</i> ¹	<i>rubrum</i> ¹	3071-14a	Dairy industry
<i>Paecilomyces</i> ¹	<i>spp</i> ¹	5332-9a	Dairy industry
<i>Penicillium</i> ²	<i>chrysogenum</i> ²	ATCC 10106	----
<i>Penicillium</i> ¹	<i>citrinum</i> ¹	27165	Dairy industry
<i>Penicillium</i> ¹	<i>commune</i> ¹	27163	Dairy industry
<i>Penicillium</i> ¹	<i>crustosum</i> ¹	27159	Dairy industry
<i>Penicillium</i> ¹	<i>roqueforti</i> ¹	27161	Dairy industry

¹ Strains provided by Laval University (Quebec, QC, Canada); ² Strains provided by INRS – Armand-Frappier Health Biotechnology Research Centre.

2.2.3 Preparation of antifungal emulsions

Twenty (20) compounds from different natural sources were selected in order to evaluate their antifungal properties against target strains responsible for cheese spoilage. EOs-based microemulsions were prepared as o/w emulsions according to the method of Ben-Fadhel et al. (2017) and kept at 4°C until use. Reuterin was produced based on the optimum parameters obtained by Vu et al. (2017) from *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608.

2.2.4 Determination of minimal inhibitory concentration (MIC)

Based on agar test evaluation results (data not shown), compounds that showed a medium to high antifungal activity were selected for a second screening analysis by micro-dilution test (MIC) in order to determine the lowest concentration of antimicrobial agent indicating complete inhibition of fungal growth. The analysis was performed according to the method described by Ben-Fadhel et al. (2017).

2.2.5 Antifungal effect of combined compounds using checkerboard method

The checkerboard method was used to assess the combined effect of the selected natural extracts against pathogenic strains responsible for cheese spoilage following the procedure described by Hossain et al. (2016). Results were expressed as Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC). Effects are synergistic when $FIC < 0.5$, additive when $0.5 \leq FIC \leq 1$, non-interactive when $1 < FIC \leq 4$ and antagonistic when $FIC > 4$. The combination showing a synergistic effect with the lowest inhibitory concentration was selected as an antifungal formulation to be applied in the upcoming steps.

2.2.6 Development of a stable antifungal emulsion

The aim of this part was to develop a stable nanoemulsion based on selected formula using suitable emulsifiers. HHSL (HLB 7) and SMP (HLB 18) were chosen to be used as a surfactant and co-surfactant in this study. Four nanoemulsions were prepared at different Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) ratios of lecithin and SMP (HLB7, HLB10, HLB12 and HLB15) according to Eq (1):

$$RHLB = \frac{100(x-HLB B)}{HLB A-HLB B} \quad \text{Eq (1)}$$

Where: x is the required HLB of the surfactant mixture; HLB A is the HLB value of the surfactant A; HLB B is the HLB value of the surfactant B.

Coarse emulsions were prepared by Ultra-Turrax IKA T25 (14,000 rpm/3 min) at room temperature, then passed through a Microfluidizer® M-110P (Microfluidics, Westwood, MA, USA) at a pressure of 15,000 psi for 1 cycle. The most stable nanoemulsion with sufficient HLB was considered as the effective formula (F) to optimize its appropriate concentration with emulsifier's mixture (E). Five (5) nanoemulsions with HLB 10 were prepared, in the same conditions, at different E: F ratios (0.5:1, 0.75:1, 1:1, 1.25:1 and 1.5:1). The stability of the emulsion was studied during 15 days of storage at 4°C.

2.2.7 Physicochemical characterization of emulsions

The average particle diameter (z-average), the polydispersity index (PDI) and the zeta-potential (stability criterion) of the nanoemulsions were determined by Dynamic Light Scattering (DLS) with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, St-Laurent, QC, Canada) according to the method of Bagheri et al. (2020).

2.2.8 Development of an encapsulation method

Encapsulation was performed according to the method of Hu et al. (2020) with some modifications, as described below.

2.2.8.1. Preparation of encapsulation matrix and optimization of microfluidization conditions

A solution of 1% WPI was mixed with 2% and 3% MD in deionized water and stirred slowly overnight at room temperature, until complete hydration. Then, the bioactive formulations with an appropriate ratio of lecithin: SMP were prepared and incorporated into the encapsulation matrix. A few drops of vitamin E were added to prevent oxidation. Emulsions were then homogenized at 14,000 rpm for 3 min at room temperature and processed by microfluidization. To determine the optimum conditions for the emulsification of EOs in water, factors including homogenization pressure and cycles number were investigated using a central composite design (CCD) with Design Expert software (version 11, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) to establish the optimal levels of the significant factors and the interactions of such variables in the process. A 2-factor, 3-level CCD including 5 replicates at the center point with 14 experimental runs was employed (**Table 2.3**).

Table 2.3 Level of independent factors in the experimental design.

Independent factors	Symbol	Coded levels		
		-1	0	+1
Homogenization pressure (psi)	G	8000	11500	15000
Homogenization cycles	T	1	2	3

2.2.8.2. Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE%) of the antifungal formulations entrapped in the polymeric carriers was determined according to a procedure of Hossain et al. (2019a). It was calculated, based on a standard curve, according to Eq 2:

$$EE\% = \frac{\text{Total oil} - \text{Free oil}}{\text{Total oil}} \times 100 \quad \text{Eq (2)}$$

2.2.9. Effect of encapsulation on the availability of active compounds during storage: *In vitro* assay

2.2.9.1. BHI-agar deep-well model for active compounds depletion test

BHI-agar deep-well model was followed according to Huq et al. (2015). After loading day 0 and after 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 and 56 days of storage (4°C), a 100-μL aliquot of each formulation (free and encapsulated) was transferred from the well to a bioassay plate to control the available active compounds content.

2.2.9.2 Active compounds bioassay against *Paecilomyces*

The activity of free and encapsulated antimicrobial agents was determined as described by Pongtharankul and Demirci (2004) with some modifications. PDB soft agar (PDB broth supplemented with 0.75 % agar instead of 1.5 % w/v) was prepared and autoclaved. Following cooling, the solution was inoculated with 1.0 % (v/v) PDB broth containing *Paecilomyces* (10⁵ conidia/mL). Inoculated broth (25 mL) was added to each square Petri dish plate and allowed to be solidified. Afterwards, holes of 7 mm in diameter were made, and 100 μL of each formulation (microencapsulated or non-microencapsulated) was added to each well. Plates were incubated for 48 h at 28°C, and the inhibition zone (mm) was measured to determine the activity against *Paecilomyces*. To evaluate the concentration of available active compounds, a standard curve was prepared by measuring the inhibitory rings of active compounds depletion models (Huq et al., 2014). Following the regression analysis of the standard curve, the concentration of available active compounds (μg/mL) was calculated.

2.2.10 Statistical analysis

For *in vitro* analysis, 3 emulsions were prepared separately for each replication. Analysis of variance (ANOVA) was performed using PASW Statistics 18.0 software (IBM Corp., Somers, NY, USA). Comparisons of means between treatments and target fungal species were considered significant based on Duncan's multiple range tests at 5% ($P \leq 0.05$). For CCD,

each experimental response was represented by the following quadratic model of response surface:

$$Y_i = \alpha_0 + \alpha_1 G + \alpha_2 T + \alpha_3 G^2 + \alpha_4 T^2 + \alpha_5 GT \quad \text{Eq (3)}$$

Where $Y_1 \dots Y_{13}$ are predicted response (zeta-potential; particle size; PDI; antifungal activity against mold strains or encapsulation efficiency EE %) and $\alpha_0 \dots \alpha_5$ are quadratic coefficients of each factor. The radius (α -value) of the star point was calculated using the formula $(2n)^{1/4}$. By considering 2 for independent factors (n), its value is 1.414. Analyses of variance were performed by ANOVA test. P-value was considered statistically significant when ≤ 0.05 . All experiments were done in triplicate (n = 3).

2.3. Results and Discussion

2.3.1 Minimal inhibitory concentration (MIC)

The results of the antifungal activity of compounds selected by MIC (**Table 2.4**) show that CEA was the most effective in inhibiting mycelial growth at low concentrations ($78.1 \leq \text{MIC} \leq 312.5$ ppm) against all tested Y/M. Similar results of antifungal activity were reported by Ben-Fadhel et al. (2019) against *Candida albicans*, *A. flavus*, and *P. chrysogenum*. *Cinnamomum cassia* EO was also efficient in inhibiting the growth of most strains ($156.25 \leq \text{MIC} \leq 625$ ppm) except *P. citrinum* and *P. roqueforti* (1,250 ppm). These findings demonstrated an interesting antifungal potential of tested compounds. Lemongrass EO inhibited the growth of *A. niger* at high concentrations (5,000 ppm). This compound showed a medium activity against all other microorganisms tested ($1,250 \leq \text{MIC} \leq 2,500$ ppm). Similar results were obtained with pepper EO against *P. commune*, *Paecilomyces spp*, *P. citrinum*, *A. versicolor* and *P. chrysogenum* (2,500 ppm). Holy basil EO was strongly active against *P. roqueforti* (625 ppm), weakly active against *Paecilomyces spp*. (5,000 ppm), and inactive against *A. niger* (MIC > 10,000 ppm). Clove EO was strongly active against *A. pullulans* and weakly active against *E. rubrum*, with MICs of 625 and 5,000 ppm, respectively. The high antifungal activity of some studied agents may be related to the presence of a high concentration of their active constituents reflecting their chemical and biological characteristics (Viuda-Martos et al., 2007). Antifungal ingredients with a phenolic structure such as eugenol in clove EO are very active against microorganisms like *A. flavus*, *A. niger* and *Penicillium sp* (Muñoz Castellanos et al., 2020). Phenolic compounds denature proteins and react with phospholipids of membrane cells which alter their permeability (Bhuiyan et al., 2012). Eugenol, one of the main constituents of clove and holy basil EOs causes severe damage to the cell membrane by altering the biosynthesis of ergosterol, the sterol component of the fungal cell membrane responsible for maintaining cell function and integrity (Pinto et al., 2009). Different studies have also reported the antifungal capacity of the clove EO against several species found in

foods such as *Paecilomyces*, *Penicillium sp*, as well as strains of *Aspergillus* like *A. niger* totally inhibited at 400 ppm (Muñoz Castellanos et al., 2020; Thomas et al., 2019). Also, phenols isolated from citronella leaves have also been shown to inhibit fungal growth in dairy products (Bagheri et al., 2020). Furthermore, it has been confirmed that trans-cinnamaldehyde has a strong power to inhibit mycelial growth against *Penicillium* species such as *P. italicum* (MIC = 0.313 µg / mL) (Huang et al., 2019). This study showed that trans-cinnamaldehyde exerts its antifungal capacity via a mechanism of membrane injury. Indeed, it is dissolved in the hydrophobic part of the cytoplasmic membrane among the acyl lipid chains, disintegrates the outer membrane of the fungal strain and thus induces cell death. Other studies have also demonstrated the antifungal effect of cinnamon EO on *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *P. digitatum* and *C. albicans* with MICs of around 0.40 mg/mL (Boniface et al., 2012). Also, citronella EO, due to its high citral content, ensured a good inhibition of fungal strains such as *A. flavus*, *P. corylophilum*, *A. niger* and *Eurotium spp* which have been inhibited with a MIC of 1,250 ppm in the present study.

Table 2.4 Minimum inhibitory concentration (MIC) of selected antifungal agents against target fungal strains.

Samples	Minimum Inhibitory Concentration MIC, ppm									
	<i>P. commune</i>	<i>A. niger</i>	<i>Paecilomyces spp</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>P. citrinum</i>	<i>P. roqueforti</i>	<i>Eurotium rubrum</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. crustosum</i>
Garlic EO	625	5000	10000	1250	1250	2500	625	1250	10000	5000
White thym EO	>10000	>10000	5000	5000	10000	2500	>10000	10000	10000	>10000
Clove EO ^a	2500	>10000	2500	625	2500	>10000	5000	2500	1250	2500
Clove EO ^b	2500	1250	2500	625	1250	5000	>10000	1250	2500	>10000
Cinnamon cassia EO	156.25	625	312.5	156.25	1250	1250	625	156.25	156.25	312.5
Cinnamon verum EO	1250	625	2500	625	2500	625	2500	1250	2500	2500
Cinnamon zeylanicum EO	625	312.5	312.5	5000	2500	1250	10000	156.25	625	10000
Oregano EO	1250	10000	1250	312.5	1250	312.5	625	1250	1250	1250
Oregano compactum EO	1250	>10000	1250	625	1250	1250	1250	1250	1250	2500
Holy basil EO	2500	>10000	5000	1250	2500	625	2500	2500	1250	2500
Pepper EO	2500	10000	2500	10000	2500	10000	10000	2500	2500	5000
Lemongrass EO	2500	5000	2500	1250	1250	1250	1250	1250	1250	2500
Citrus extract A	312.5	156.25	78.125	312.5	156.25	312.5	156.25	78.125	156.25	312.5
Citrus extract B	5000	10000	156.25	2500	10000	2500	2500	625	312.5	2500
Lactic acid	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000

2.3.2 Fractional inhibitory concentration (FIC)

Results of the combined action of compounds selected based on their MIC (**Table 2.5**) showed that the combination of CEA with *C. cassia* EO revealed synergistic effects against tested fungal strains expect an additive response against *P. crustosum* (FIC = 0.63). Similar finding was obtained for the combinations of CEA with *Cinnamomum zeylanicum* EO, *C. cassia* EO with lemongrass EO and CEA with lemongrass EO against *P. commune*, *E. rubrum* and *P. citrinum*, respectively. However, the association of citrus extract B (CEB) with *C. cassia* EO induced additive effects against *P. commune* (FIC = 0.59), *E. rubrum* (FIC = 0.5), *P. crustosum* (FIC = 0.58) and synergistic responses to all other tested microorganisms. Also, the blend of oregano EO and CEA revealed additive effects against *P. citrinum*, *P. roqueforti* and *E. rubrum* with FICs between 0.63 and 0.94. This demonstrated that the use of combined extracts is more effective than applying each extract separately to inhibit Y/M growth. Indeed, antifungal activity was better at reduced concentrations. Few studies on the evaluation of combined effect between citrus extracts and Cinnamon EO were done. OuYang et al. (2020) showed that the combined action of cinnamaldehyde with citronellal (0.1:0.3 v/v) compared to their individual activity (0.5:1.6 v/v) on the inhibition of green molds growth in citrus fruits (*Penicillium digitatum*) accelerated the damage of the fungal cell wall and membrane. Also, When *Cinnamomum verum* was mixed with oregano EO, synergistic effects were observed against *A. pullulans* and *P. chrysogenum* showing FIC values of 0.15 and 0.27 respectively. These observations are in accordance with results obtained by Tunc et al. (2007) who obtained a synergistic effect of carvacrol when combined with cinnamaldehyde for the inhibition of *Penicillium* species (*P. notatum*). Citrus extracts, when combined, showed synergistic responses against *Paecilomyces spp.* (FIC = 0.05) and *A. pullulans* (FIC = 0.46). However, non-interactive responses were also obtained against *A. niger* (FIC = 1.25) and *E. rubrum* (FIC = 1.13). Additive effects were noticed against all other studied strains. This result confirms that individual antifungal activity of CEA and CEB was more efficient compared to their combined action.

Table 2.5 Fractional inhibitory concentration (FIC) of selected combined antifungal agents against target fungal strains.

Combination of antimicrobials	Fractional inhibitory concentration, FIC (average value \pm SD, n = 3)															
	Cinnamon cassia EO		Citrus extract A Oregano EO		Citrus extract A Cinnamon verum EO		Citrus extract A Lemongrass EO		Cinnamon cassia EO		Citrus extract A Cinnamon cassia EO		Citrus extract B Cinnamon cassia EO		Citrus extract A Citrus extract B	
	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act	FIC value	Act
<i>Penicillium commune</i>	0.71 \pm 0.0	AD	0.38 \pm 0.0	S	1.00 \pm 0.1	AD	0.06 \pm 0.0	S	0.09 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.0	S	0.59 \pm 0.0	AD	0.71 \pm 0.0	AD
<i>Aspergillus niger</i>	1 \pm 0.1	AD	0.16 \pm 0.0	S	0.31 \pm 0.0	S	0.16 \pm 0.0	S	0.26 \pm 0.0	S	0.22 \pm 0.0	S	0.40 \pm 0.0	S	1.25 \pm 0.0	NI
<i>Paecilomyces spp</i>	7.08 \pm 0.7	AG	0.14 \pm 0.0	S	0.03 \pm 0.0	S	0.20 \pm 0.0	S	0.14 \pm 0.0	S	0.09 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.0	S	0.05 \pm 0.0	S
<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.15 \pm 0.0	S	0.28 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.0	S	0.27 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.05	S	0.08 \pm 0.0	S	0.17 \pm 0.0	S	0.46 \pm 0.1	S
<i>Penicillium citrinum</i>	8.33 \pm 0.1	AG	0.63 \pm 0.0	AD	0.38 \pm 0.0	S	0.55 \pm 0.0	AD	0.42 \pm 0.1	S	0.28 \pm 0.0	S	0.33 \pm 0.0	S	0.79 \pm 0.2	AD
<i>Penicillium roqueforti</i>	1.25 \pm 0.3	NI	0.94 \pm 0.3	AD	0.41 \pm 0.1	S	0.14 \pm 0.0	S	0.43 \pm 0.1	S	0.16 \pm 0.0	S	0.38 \pm 0.0	S	0.93 \pm 0.1	AD
<i>Eurotium rubrum</i>	4.33 \pm 0.9	AG	0.88 \pm 0.0	AD	0.27 \pm 0.0	S	0.31 \pm 0.1	S	0.63 \pm 0.1	AD	0.29 \pm 0.0	S	0.56 \pm 0.0	AD	1.13 \pm 0.2	NI
<i>Aspergillus versicolor</i>	1.00 \pm 0.2	AD	0.08 \pm 0.0	S	0.46 \pm 0.0	S	0.17 \pm 0.0	S	0.45 \pm 0.1	S	0.13 \pm 0.0	S	0.55 \pm 0.0	S	0.96 \pm 0.2	AD
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.27 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.0	S	0.40 \pm 0.1	S	0.38 \pm 0.1	S	0.38 \pm 0.0	S	0.19 \pm 0.0	S	0.38 \pm 0.0	S	0.54 \pm 0.1	AD
<i>Penicillium crustosum</i>	7.21 \pm 1.4	AG	0.25 \pm 0.0	S	0.23 \pm 0.0	S	0.13 \pm 0.0	S	0.28 \pm 0.0	S	0.63 \pm 0.0	AD	0.58 \pm 0.0	AD	1 \pm 0.1	AD

Act: Activity; FIC \leq 0.5: Synergistic effect (S); 0.5 < FIC \leq 1: Additive effect (AD); 1 < FIC \leq 4: Non-interactive effect (NI); FIC > 4: Antagonistic effect (AG).

2.3.3 Effect of HLB on physicochemical characterization of emulsions

Physicochemical characterization of generated emulsions was determined during 15 days of storage at 4°C. Physical stability of nanoemulsions was evaluated by measuring zeta-potential on particle surface. According to Maherani et al. (2019), solutions containing nanometric particles with high zeta-potential value (absolute value greater than 30) exhibits higher stability. Zeta-potential values for emulsion prepared with different HLBs during a 15-day storage at 4°C are presented in **Fig 2.1**.

Results showed that nanoemulsions with low HLB (7 and 10) generated a good stability with a zeta-potential of -37.5 and -37.2 mV respectively. However, these values increased for HLBs of 12 and 15 up to -28.4 mV and -27.2 mV respectively, inducing unstable emulsions. These results show that nanoemulsions containing 100% (HLB 7) and 73% (HLB 10) of lecithin were the most stable ones during storage, indicating that high concentrations of lecithin effectively surface tension and consequently decrease particles tendency to aggregate. In fact, surfactants reduce the interfacial tension, thereby lowering the amount of energy required to disrupt droplets and form smaller particles (Fathi Azarbayjani et al., 2009). This result is consistent with those of Kaci et al. (2016) who demonstrated the ability of lecithin to induce a stable nanoemulsion by reducing the surface tension in the dispersed phase. Indeed, they noted that emulsions containing lecithin showed a lower surface tension of 29 mN/m. Results of the average diameter of solutions at different HLBs during 15 days of storage at 4°C are presented in **Fig 2.2**. By definition, the particle size of a nanoemulsion is between 10 and 100 nm (Mason et al., 2006). As observed, only the nanoemulsion with HLB 10 revealed an average diameter < 100 nm (79.2 nm) throughout storage. However, tested formulations with HLB 7, 12 and 15 indicated larger particle sizes ranging from 106.4 to 329.4 nm. Based on Odriozola-Serrano et al. (2014), reducing the size of active compounds incorporated in a solution increases the mass per unit of nanoemulsion surface area and improves its bioaccessibility. Salvia-Trujillo et al. (2013) investigated the influence of particle size on β -carotene bioaccessibility using o/w maize emulsions. They found that the β -carotene bioaccessibility increased with a decrease of droplet diameter. PDI results of solutions at different HLB during storage are shown in **Fig 2.3**. This parameter determines the average uniformity and homogeneity of a solution. In this study, PDI values obtained for all nanoemulsions varied from 0.132 to 0.753. Throughout storage, nanoemulsions with HLB 7 and HLB 10 exhibited homogeneous systems with PDI values of 0.132 and 0.200 respectively. However, high PDI values were obtained for the nanoemulsions with HLB 12 and HLB 15 achieving 0.753—and inducing a polydispersed heterogeneous system. This is in agreement

with the results of Maherani et al. (2018) who obtained a stable monodisperse system with PDI values ranging from 0.17 to 0.27.

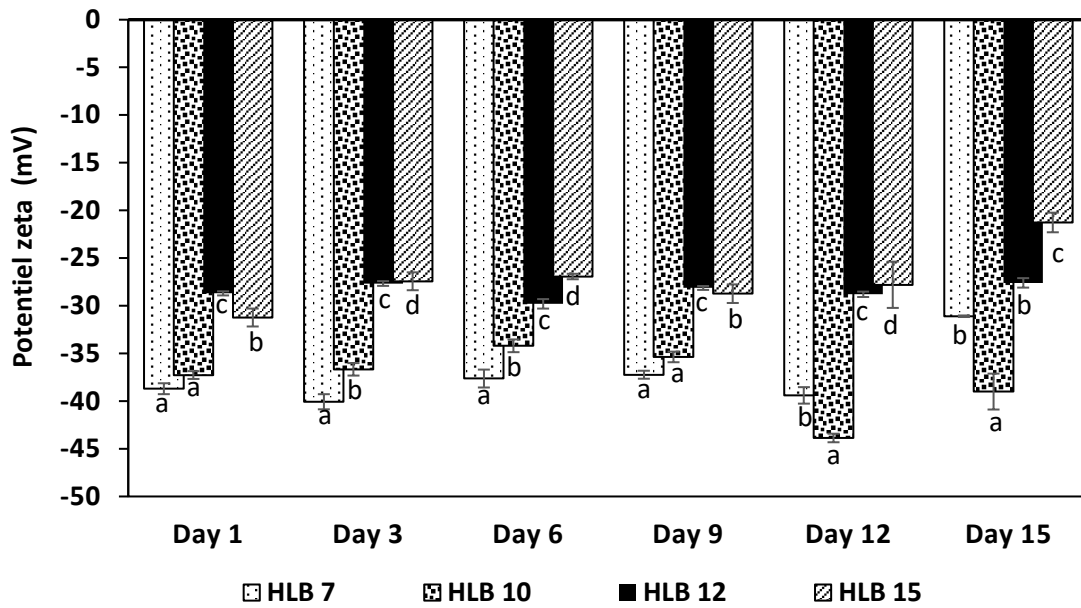


Figure 2.1 Zeta-potential of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.

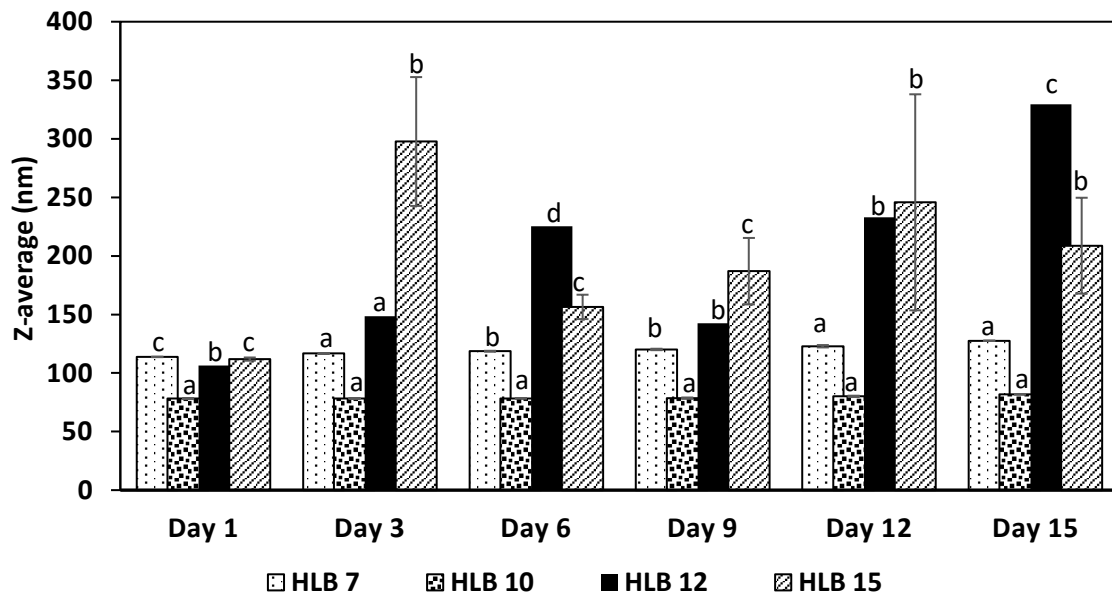


Figure 2.2 Average diameter of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.

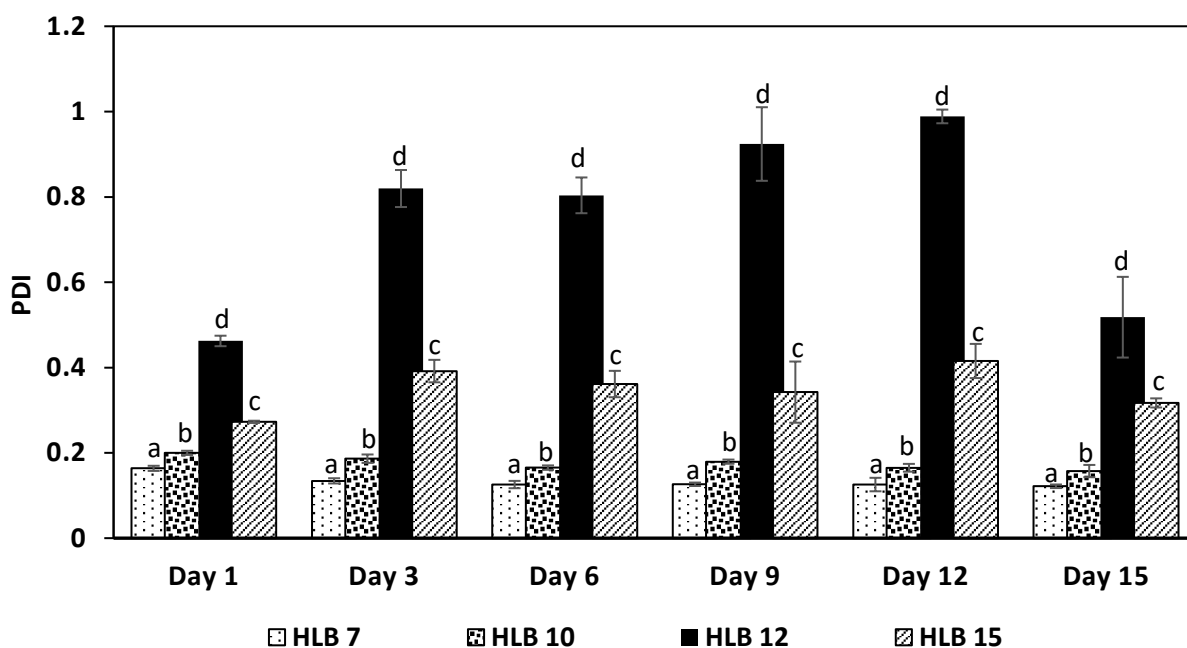


Figure 2.3 PDI of emulsions prepared at different HLB during 15 days of storage at 4°C.

2.3.4 Emulsion characterization at different ratios of emulsifier to formulation (E: F)

Zeta-potential results of the prepared nanoemulsions at 5 ratios of E: F are presented in **Fig 2.4**. Results showed that the emulsions prepared at 0.75% of surfactants and 1% of antifungal mixture exhibited a good stability with a zeta-potential of -38.8 mV during 15 days of storage and by increasing emulsifiers ratio, zeta-potential and stability increased more. These results were in agreement with Maherani et al. (2018b) who showed a better stability of the developed nanoemulsions by using an E:F ratio of 1.5:1 compared to 1:1. In fact, the higher the concentration of emulsifiers, the lower the interfacial tension. This decrease led to a reduction of particle size from 229.2 nm (nanoemulsion containing 0.5% emulsifiers) to 71.52 nm (ratio of 0.75:1) (**Fig 2.5**). Although a similar reduction was observed for other ratios, particle size values were not as good as that of 0.75:1 ratio. This can be explained by the fact that emulsifiers concentration was not high enough to reach a sufficient level of energy to disturb the droplets and decrease the particle size (Fathi Azarbayjani et al., 2009a). Results of PDI are presented in **Fig 2.6**. Throughout 15 days of storage, E: F ratio of 0.5:1 revealed a PDI value of 0.79 indicating an irregular polydispersed system. Nonetheless, the PDI values of E:F

ratio starting from 0.75:1 to 1.5:1 was constant (around 0.2) and formed a uniform monodisperse system.

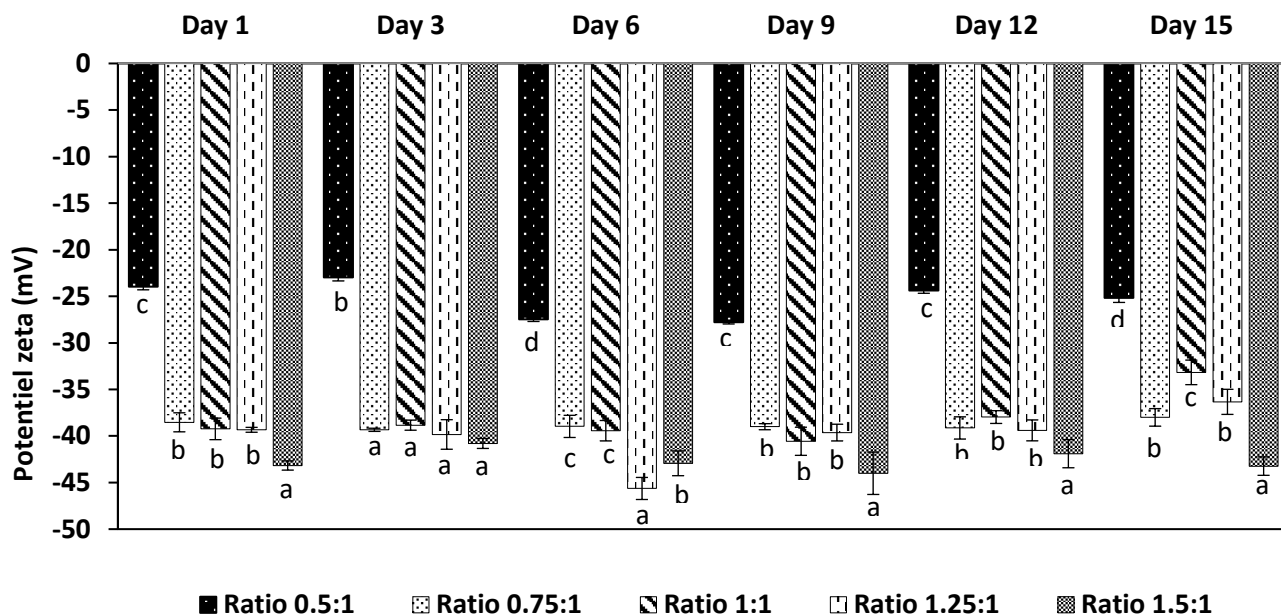


Figure 2.4 Zeta potential of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E: F) during 15 days of storage at 4°C.

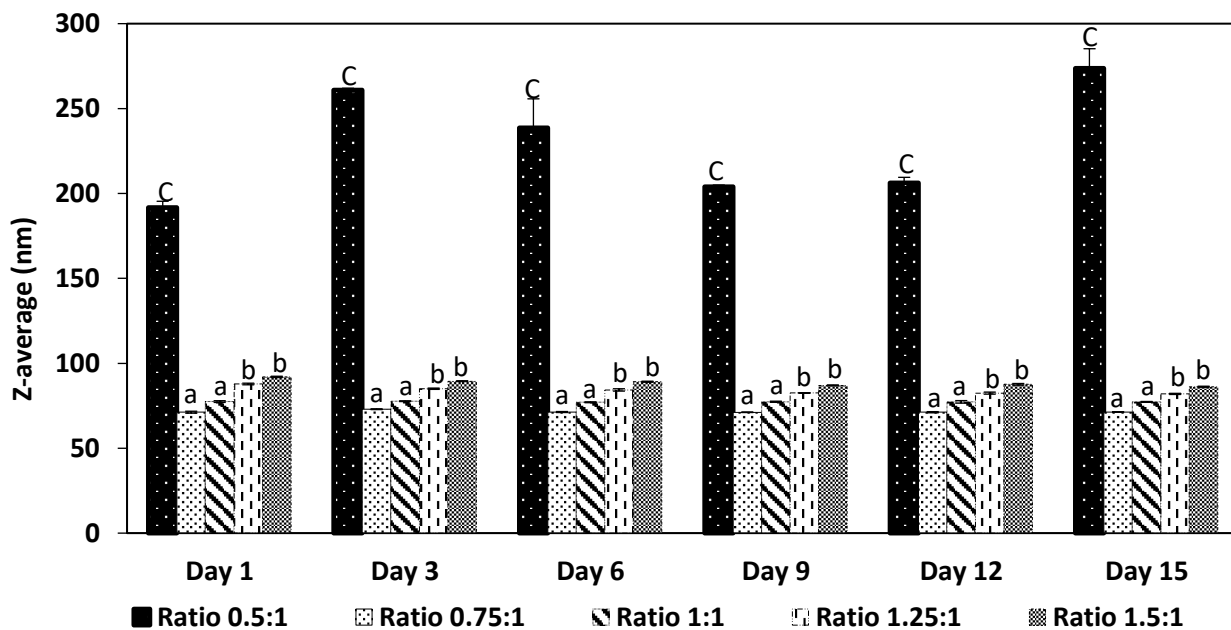


Figure 2.5 Average diameter of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E: F) during 15 days of storage at 4°C.

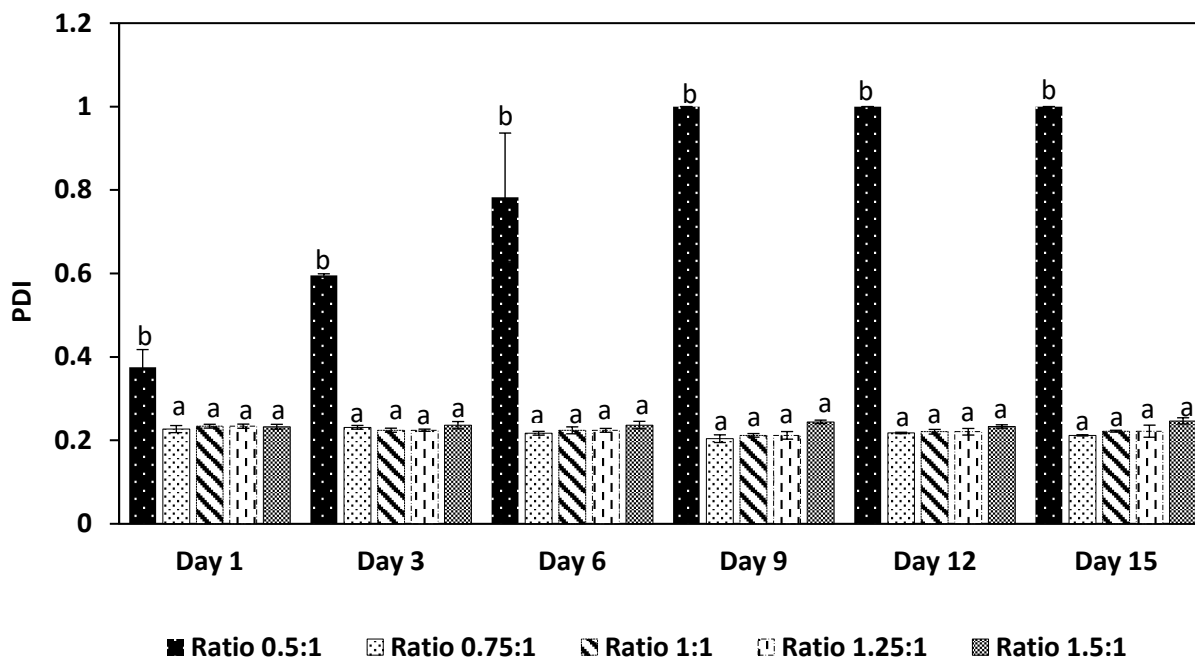


Figure 2.6 PDI of emulsions prepared (with HLB 10) at different ratios (E: F) during 15 days of storage at 4°C.

2.3.5 Optimization of encapsulation process

The response surfaces of combined effect of the microfluidization pressure (psi) and the number of cycles on the zeta-potential, the PDI, the PDI and the encapsulation efficiency (EE) of nanoemulsions encapsulated with WPI:MD ratios of 1:2 and 1:3 is shown in **Fig 2.7, 2.8, 2.9** and **2.10** respectively. The polynomial equation describing the response of zeta-potential, particle size, PDI and EE for the WPI: MD ratios of 1:2 and 1:3 of emulsions is presented in **Table 2.6**.

Zeta-potential. The prediction model of zeta-potential showed determination coefficients (R^2) of 0.99 and 0.95 for WPI: MD (1:2) and WPI: MD (1:3) respectively. This indicates that 99% and 95% of the variation of the zeta-potential can be described by the combination of the response related to the models. At a ratio of 1:2, the prediction model of zeta-potential showed that the quadratic effect of the pressure was not significant ($P > 0.1$) and only the cycle number was important ($P \leq 0.0001$). However, the model describing the ratio of 1:3 showed that both of pressure and cycle number were very important with $P = 0.008$ and $P \leq 0.0001$ respectively. These results imply that the change of pressure levels and the number of cycles will have a good impact on the zeta-potential of nanoemulsions. Regarding WPI: MD ratios, the interactive effects between independent factors had a significant impact ($P \leq 0.05$) on zeta-potential.

All generated nanoemulsions (**Fig 2.7a-b**) showed negative zeta-potentials. This may be associated with the incorporation of WPI with negative charges at neutral pH values (Almasi et al., 2020). At 2-fold concentration of MD to WPI, the zeta-potential value of the

microfluidized emulsion — at 11,500 psi/2 cycles— was significantly reduced (-32.2 mV) compared to its non-microfluidized counterpart (-28.8 mV). Concerning the 1:3 ratio, all obtained solutions before and after microfluidization were stable with a zeta-potential of < -35 mV. This result could be explained by the effect of MD at high concentrations on the conformation of whey proteins and to a greater exposure of negative residues on protein surface. According to Córdoba et al. (2018), negative zeta-potential values above the 30 mV threshold improve the stability of emulsions against creaming and flocculation phenomena due to electrostatic repulsion between droplets. Therefore, the decrease in zeta-potential reflects a better stability of the nanoemulsions.

Particle size and PDI. The prediction model of particle size shows a R^2 coefficient of 0.99 for both tested ratios of WPI: MD. Concerning the model of PDI, the R^2 was 0.98 and 0.96 for the ratios of 1:2 and 1:3, respectively. The prediction models of particle size as well as PDI showed that the quadratic effect of the pressure was not significant ($P > 0.1$) and only the number of cycles was very important ($P \leq 0.0001$) for both ratios. These results imply that a change of cycles will have a considerable effect on the particle diameter and the uniformity of nanoemulsions. However, for the tested WPI: MD ratios, the interactive effects between independent factors had a significant impact ($P \leq 0.05$) on both parameters. Results (**Fig 2.8a**) show that for a WPI: MD ratio of 1:2, the particles size of nanoemulsions treated by microfluidization at 11,500 psi/2 cycles was reduced 15 times compared to the control nanoemulsion. This reduction was also noted for WPI: MD 1:3 (**Fig 2.8b**) under the same microfluidization conditions, suggesting a reducing effect of microfluidization on the particle size of nanoemulsions. These findings are in agreement with Schultz et al. (2004) who noted a decrease in the mean droplet diameter with an increasing pressure for all tested emulsifiers. This can be attributed to an increase in the magnitude of the disturbing energy generated by high pressure homogenizers (Bai et al., 2016). However, by increasing the pressure to 15,000 psi and the number of cycles to 3 for WPI: MD 1:2, an increase in droplet size was noted. Same observations were reported by Fernandes et al. (2017), who proved that a high homogenization increases the droplet size of the emulsion.

Results also showed that the PDI was reduced from 1.0 and 0.5 in control nanoemulsions to 0.3 and 0.2 in microfluidized nanoemulsions for WPI:MD ratios of 1:2 and 1:3 respectively (**Fig 2.9a** and **2.9b**), therefore achieving a homogeneous monodisperse system by using only 1 cycle at a low pressure of 8,000 psi. According to Almasi et al. (2020), PDI values ≤ 0.3 establish a narrow pattern of particle size, size distribution, resulting in an emulsion droplet uniformity suitable for many applications such as food film formulations.

EE. The R^2 coefficients for the model predicting EE response were 0.98 and 0.99 for WPI:MD of 1:2 and 1:3, respectively, which are indicators of the good adequacy of used models.

According to these results, the quadratic effect of the pressure was important ($P = 0.0597$) but at a lower level than the number of cycles ($P \leq 0.0001$) at a WPI:MD ratio of 1:2 (**Fig 2.10a**). The same effect was obtained for the number of cycles with the response of EE at a ratio of 1:3 (**Fig 2.10b**). However, the quadratic effect of the pressure was not significant ($P > 0.1$). Thus, a change of cycle level as well as homogenization pressure for WPI: MD 1:2 will have a good impact on the EE of nanoemulsions. For both tested WPI: MD ratios, interactive effects between independent factors had a significant impact ($P \leq 0.05$) on EE. Compared to the control solution, results showed that for the ratio WPI: MD 1:2, the EE increased 18 times after microfluidization at 11,500 psi/2 cycles. However, under the same conditions, EE reached 88.5% with WPI:MD 1:3, hence demonstrating a significant effect of the microfluidization process —via the induction of WPI-MD interactions leading to the enhancement of the encapsulation capacity of bioactive compounds, as related to possible conformational changes of proteins. Similarly, Almasi et al. (2020) found that protein-polysaccharide complexes can provide a higher EE of the core material.

Table 2.6 Polynomial equation predicting physicochemical responses using quadratic model.

Strain	WPI:MD ratio	Predicted equation
Zeta-potential	1:2	$-33.15 - 0.0163 G - 1.48 T + 1.76 G^2 + 1.06 T^2 + 0.0054 GT$
	1:3	$-42.01 + 1.56 G + 5.64 T + 0.3923 G^2 - 2.96 T^2 + 1.05 GT$
Particle size	1:2	$214.34 + 0.9269 G - 1127.38 T - 17.26 G^2 + 1101.58 T^2 + 10.09 GT$
	1:3	$149.41 - 7.12 G - 150.75 T - 12.92 G^2 + 142.14 T^2 - 3.63 GT$
PDI	1:2	$0.3893 + 0.0182 G - 0.2944 T - 0.0319 G^2 + 0.3502 T^2 + 0.0316 GT$
	1:3	$0.2610 - 0.0074 G - 0.1289 T + 0.0168 G^2 + 0.0970 T^2 + 0.0025 GT$
EE %	1:2	$71.25 - 3.47 G + 23.83 T - 16.28 G^2 - 27.39 T^2 - 5.52 GT$
	1:3	$88.23 + 0.3135 G + 12.18 T + 0.8204 G^2 - 11.67 T^2 + 0.2955 GT$

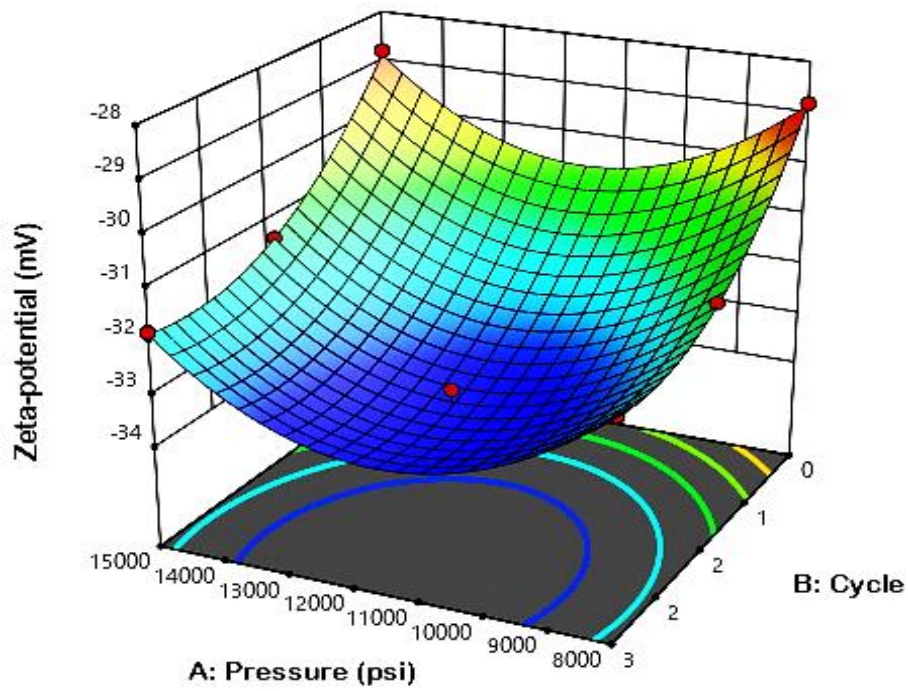


Figure 2.7a Combined effects of pressure and the number of cycles on the zeta-potential of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).

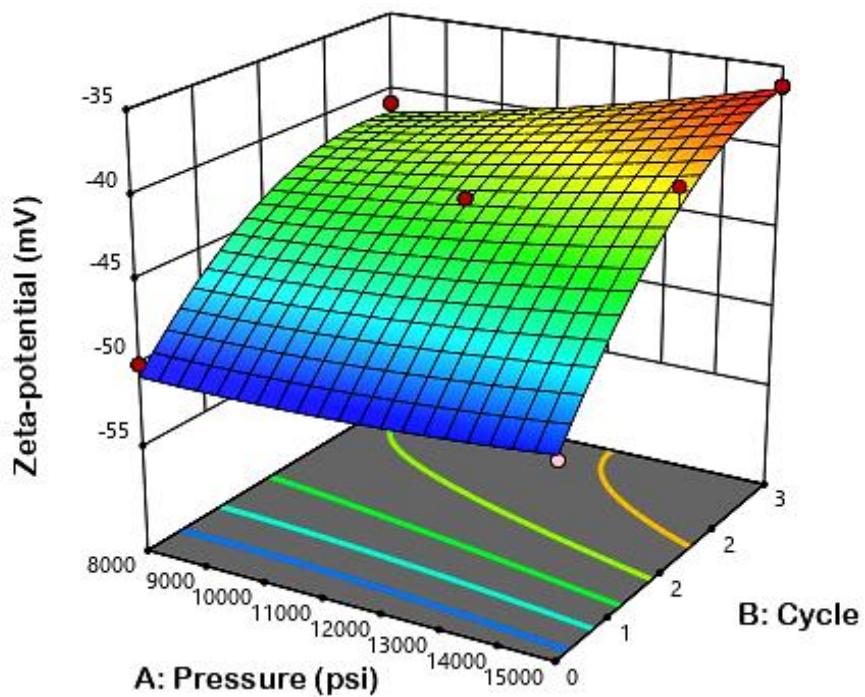


Figure 2.7b Combined effects of pressure and the number of cycles on the zeta-potential of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).

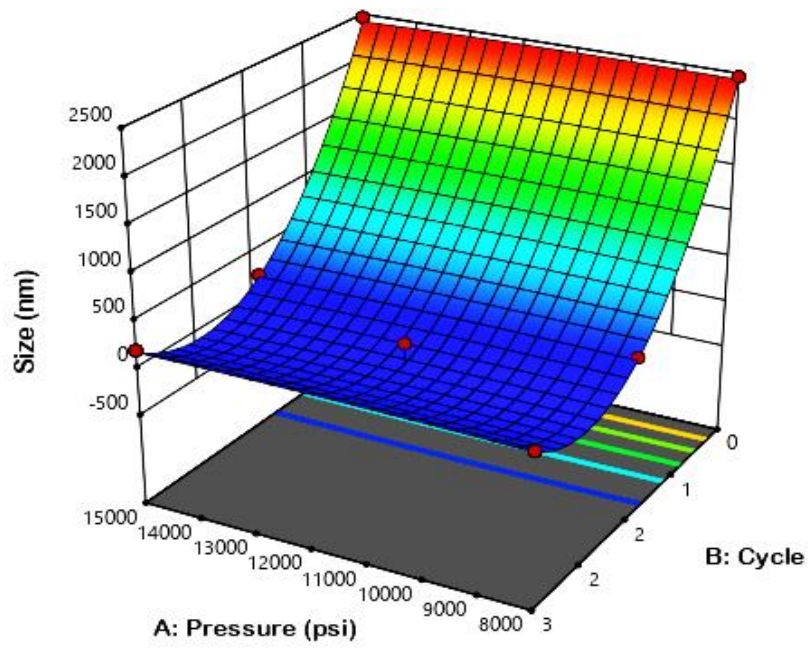


Figure 2.8a Combined effect of pressure and number of cycles on the particle size of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).

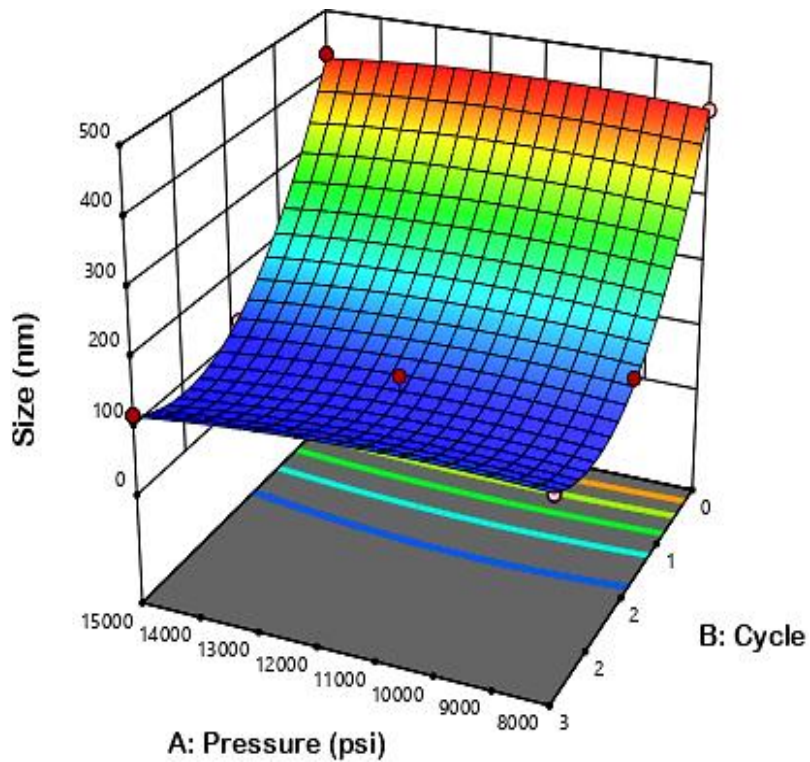


Figure 2.8b Combined effects of pressure and number of cycles on the particle size of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).

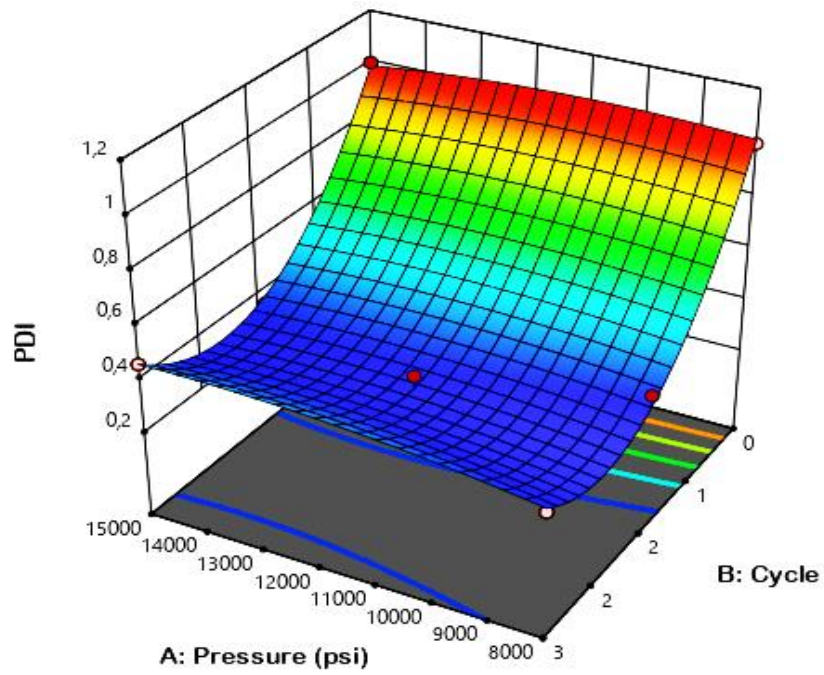


Figure 2.9a Combined effects of pressure and number of cycles on PDI of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).

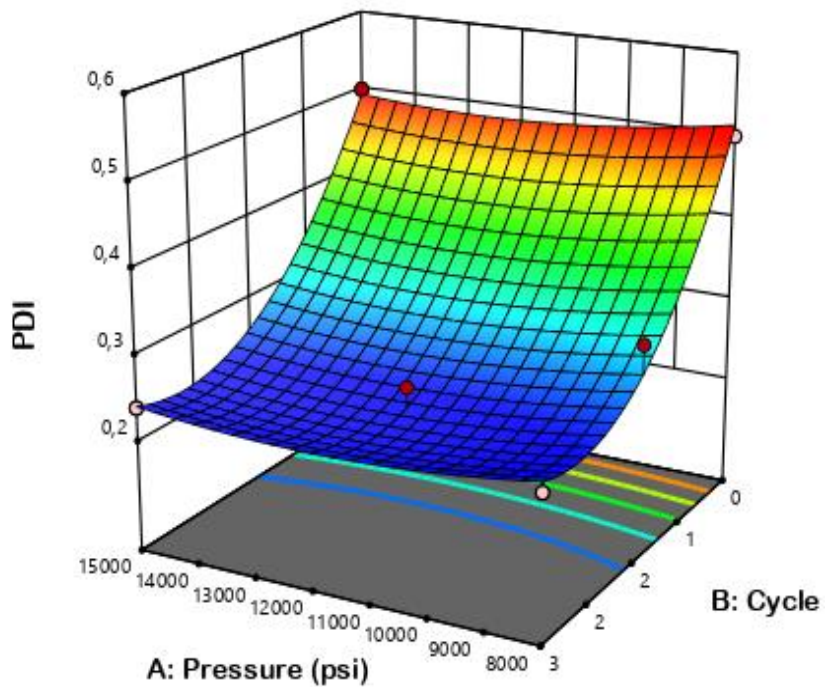


Figure 2.9b Combined effects of pressure and number of cycles on PDI of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).

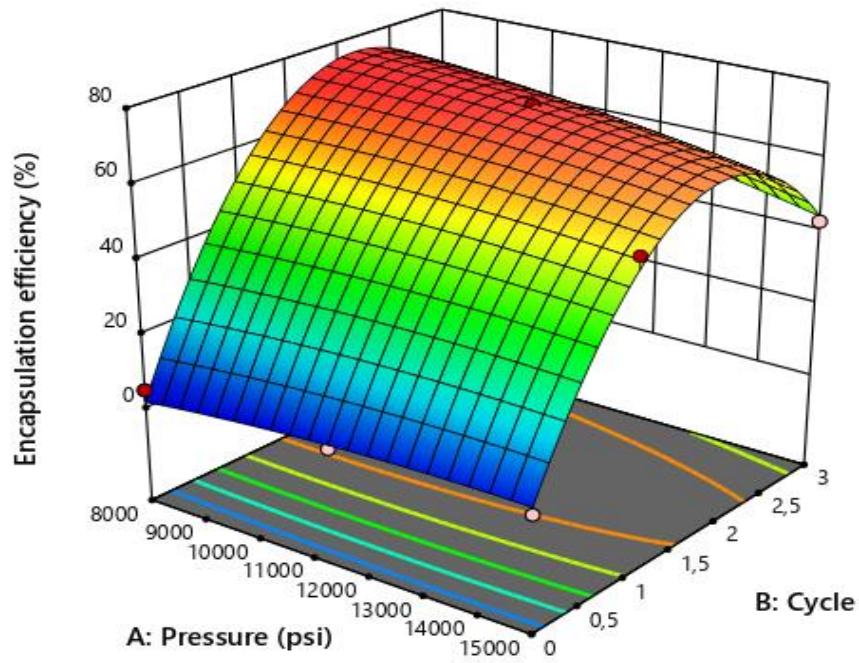


Figure 2.10a Combined effects of pressure and number of cycles on the encapsulation efficiency of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2).

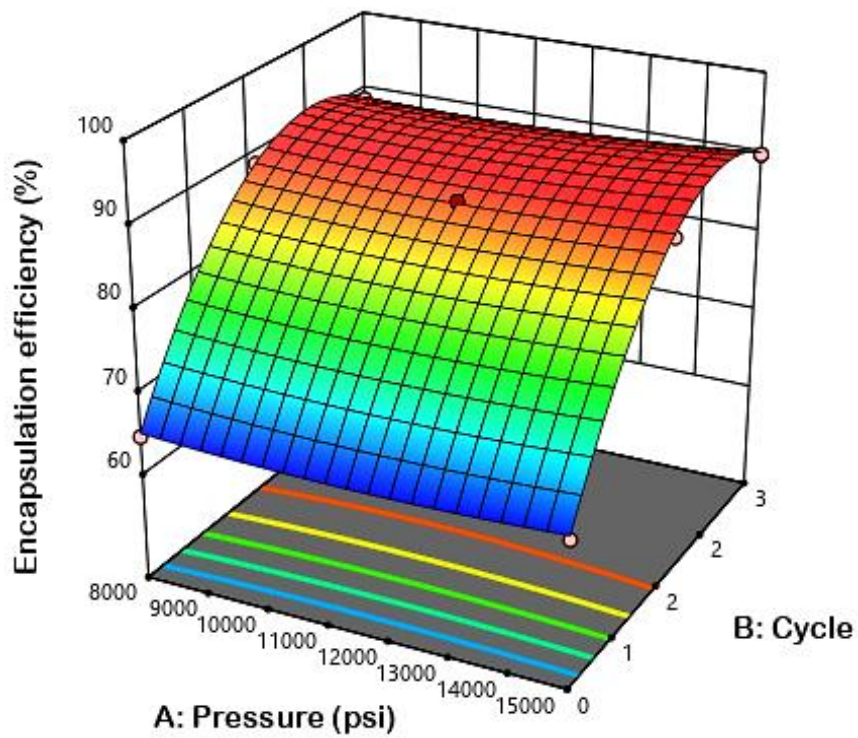


Figure 2.10b Combined effects of pressure and number of cycles on the encapsulation efficiency of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3).

2.3.6 Antifungal activity of nanoemulsions

The ANOVA analysis of the antifungal activity of nanoemulsions prepared with the WPI:MD ratios of 1:2 and 1:3 is presented in **Table 2.7** and the response surfaces against each fungi are presented in Annexe I, in **Fig 7.13a-13j** and **Fig 7.14a-14j** respectively for each ratio. According to the results, a quadratic model was used to describe the relationship between the antifungal effect and independent variables for all target strains. Indeed, all results indicate that established models could induce significant and satisfactory responses. For the nanoemulsion based on WPI:MD 1:2, the results show that a condition of 8,000 psi/2 cycles significantly reduced ($P \leq 0.05$) the MIC values compared to the control emulsion (not microfluidized) with greater or lesser variations depending on the strains. Indeed, MIC value decreased from 625 to 312 ppm for *P. commune*, *A. niger*, *P. citrinum* and to 156 ppm for *P. chrysogenum* and *P. crustosum*. The minimum concentration required to inhibit the growth of *A. pullulans*, *P. roqueforti* and *A. versicolor* was 78.12 ppm. However, only *E. rubrum* strain required 8,000 psi/3 cycles to reduce the MIC from 625 ppm to 156 ppm. Regarding the WPI: MD ratio of 1:3, *P. citrinum* was the most sensitive strain. Indeed, its MIC after treatment with nanoemulsions (8,000 psi/2 cycles) marked a significant decrease (312 ppm) compared to the control emulsion (1,250 ppm). MIC values of other mold strains similarly decreased using 8,000 psi/2 cycles. These results demonstrated the notable effect of microfluidization on the preparation of active nanoemulsions via a decrease of MIC. Therefore, the encapsulation process —induced by microfluidization— promoted an important improvement in the antifungal activity of the bioactive nanoemulsions. These results are in agreement with the findings of Wan et al. (2019) who studied the effect of high pressure homogenization conditions on the stability and antifungal activity of EOs-based nanoemulsions. This study showed that the inhibitory activity of mycotoxins by EOs was considerably increased when they were formed nanoemulsions against isolates of *Fusarium graminearum*. The results obtained showed that a high-pressure process approach such as microfluidization had the ability to generate intense disturbing forces that break down the oily phase into tiny oil droplets during the o/w homogenization process. In particular, the reduction of particles size brought about functional properties for nanoemulsions in addition to their greater stability. Tajkarimi et al. (2010) also reported that the small droplet size of active compounds incorporated in EOs-based nanoemulsions stimulated their interactions with fungal cells and caused the death of microorganisms due to greater water solubility of the nanoemulsion. In addition to the effect of physical treatment, antifungal activity was affected by the composition of the overall system (Sonu et al., 2018). These facts suggest that besides the antifungal effect of the bioactive compounds in our formulation, the WPI:MD ratio applied for encapsulation, as well as the microfluidization conditions, contribute to the antifungal activity of the nanoemulsion. Ribes et al. (2017) studied the effect of o/w

nanoemulsions based on different EOs and WPI on their antifungal activity against *A. niger*. From this study, it was determined that WPI-based nanoemulsions were effective in inhibiting the mycelial growth and germination of *A. niger* spores. The antifungal action was correlated with the morphological alterations observed in *A. niger*, such as the loss of cytoplasm in the fungal hyphae and the tip of the hyphae following the fusion of the emulsion droplets with the fungal cell membrane. This was explained by the fact that the complex surface composition of the cells could offer a large number of suitable sites of interaction with WPI hence the targeted release of the active compound inducing its deterioration.

Table 2.7 ANOVA results for antifungal properties using quadratic model.

Strain	WPI:MD ratio	F-value	P-value	R ²	Adj R ²	Predicted equation
<i>P. commune</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
	1:3					+323.45 – 1.90 G – 464.33 T + 0.6317 GT – 20.85 G ² + 466.22 T ²
<i>A niger</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
	1:3	25.60	0.0006	0.9552	0.9179	+350.26 + 32.96 G – 385.68 T + 93.18 GT + 94.66 G ² + 464.33 T ²
<i>Paecilomyces spp.</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+169.03 – 2.21 G – 541.72 T + 0.7370 GT – 24.32 G ² + 543.93 T ²
	1:3					+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
<i>A. pullulans</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+80.86 – 0.4738 G – 116.08 T + 0.1579 GT – 5.21 G ² + 116.56 T ²
	1:3	37.85	0.0002	0.9693	0.9437	+301.15 + 92.97 G + 76.97 T + 73.18 GT + 174.47 G ² – 102.97 T ²
<i>P. citrinum</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
	1:3					+323.45 – 1.90 G – 464.33 T + 0.6317 GT – 20.85 G ² + 466.22 T ²
<i>P. roqueforti</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+80.86 – 0.4738 G – 116.08 T + 0.1579 GT – 5.21 G ² + 116.56 T ²
	1:3					+323.45 – 1.90 G – 464.33 T + 0.6317 GT – 20.85 G ² + 466.22 T ²
<i>E. rubrum</i>	1:2	7.78	0.0134	0.8664	0.7551	+193.10 – 45.01 G – 229.79 T + 15.00 GT + 174.52 G ² + 73.91 T ²
	1:3	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
<i>A. versicolor</i>	1:2	206.95	< 0.0001	0.9942	0.9894	+158.08 – 0.3159 G – 77.39 T + 0.1053 GT – 3.47 G ² + 77.70 T ²
	1:3	44.34	0.0001	0.9736	0.9517	+344.37 – 31.27 G – 462.75 T + 10.42 GT + 102.45 G ² + 360.09 T ²
<i>P. chrysogenum</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+161.73 – 0.9476 G – 232.16 T + 0.3159 GT – 10.42 G ² + 233.11 T ²
	1:3					+316.15 – 0.6317 G – 154.78 T + 0.2106 GT – 6.95 G ² + 155.41 T ²
<i>P. crustosum</i>	1:2	206.95	≤ 0.0001	0.9942	0.9894	+161.73 – 0.9476 G – 232.16 T + 0.3159 GT – 10.42 G ² + 233.11 T ²
	1:3	151.05		0.9921	0.9855	+312.08 + 91.08 G – 387.36 T + 73.81 GT + 153.62 G ² + 363.25 T ²

2.3.7 BHI-agar deep well model

The free- (FAC) and microencapsulated available content (EAC) of active compounds were evaluated *in vitro* using the BHI-agar deep well model during storage (4°C). The diffusion test was performed by monitoring the inhibition zone against *Paecilomyces spp.* A second order polynomial standard curve for the free and microencapsulated formulations was used (**Fig 2.11**) to estimate the available amount of active compound from the area of the inhibition zone. Results (**Fig 2.12**) show that after 1 day of storage, the FAC values in the free formulations F1-NE – 316 µg/mL, F2-NE – 1580 µg/mL and F3-NE – 2528 µg/mL were 987.7, 1530.7 and 2083.4 µg/mL respectively. After 21 days of storage, the free formulation F1-NE – 316 µg/mL lost its antifungal activity considerably with a depletion of the available bioactive compounds. However, the formulations F2-NE – 1580 µg/mL and F3-NE – 2528 µg/mL showed respective FAC values of 867.7 and 1021.8 µg/mL after 21 days of storage and lost their antifungal activity after 42 days and 49 days of storage respectively. After 1 day of storage, the available bioactive compound concentration in encapsulated formulations F1-E – 316 µg/mL, F2-E – 1580 µg/mL and F3-E – 2528 µg/mL was 1013.8, 1486 and 2234,3 µg/ml respectively. After 21 days of storage, the EAC for the encapsulated formulation F1 E–316 µg/mL was 231.4 µg/mL implying that the microencapsulation process maintained a quantity of bioactive compounds efficient to act against *Paecilomyces* on the 21st day of storage, contrarily to the non-encapsulated formulation. Also, the formulations F2-E–1580 µg/mL and F3-NE–2528 µg/mL maintained a good level of bioactive agents at 499 and 712 µg/mL respectively, after 42 days of storage. The bioactive compounds contained in these formulations were depleted after 49 and 56 days of storage respectively. Therefore, all the encapsulated formulations were able to keep the active compounds longer with an average interval of 7 days compared to the non-encapsulated formulations and consequently prolonging of their antifungal activity. Similar results were found by Huq et al. (2014) who found that the microencapsulation of nisin (63 µg/mL) increased the lag phase of bacterial growth up to 28 days unlike free nisin which lost its antimicrobial activity after only 14 days of storage.

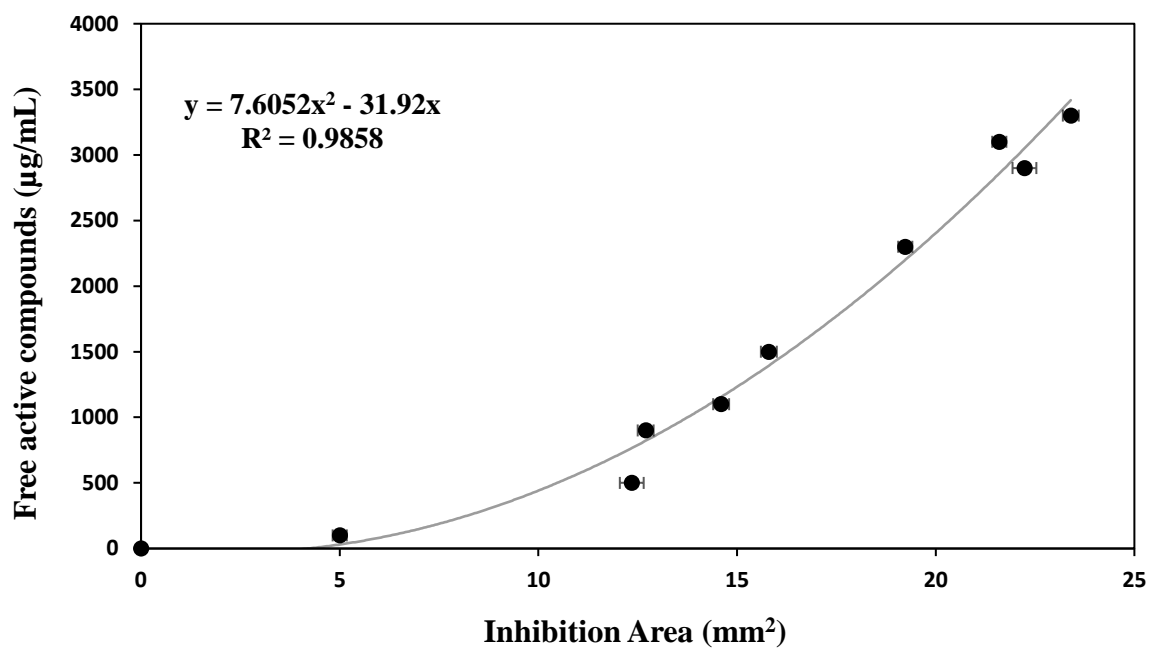
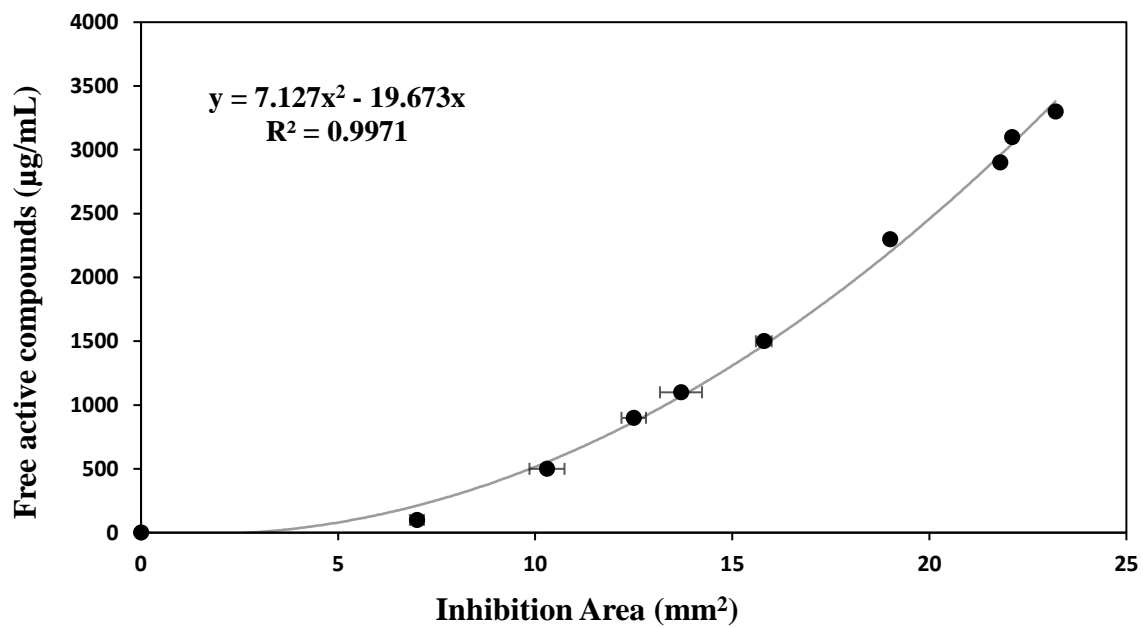


Figure 2.11 Standard curves for free and microencapsulated active compounds against *Paecilomyces* in vitro bioassay.

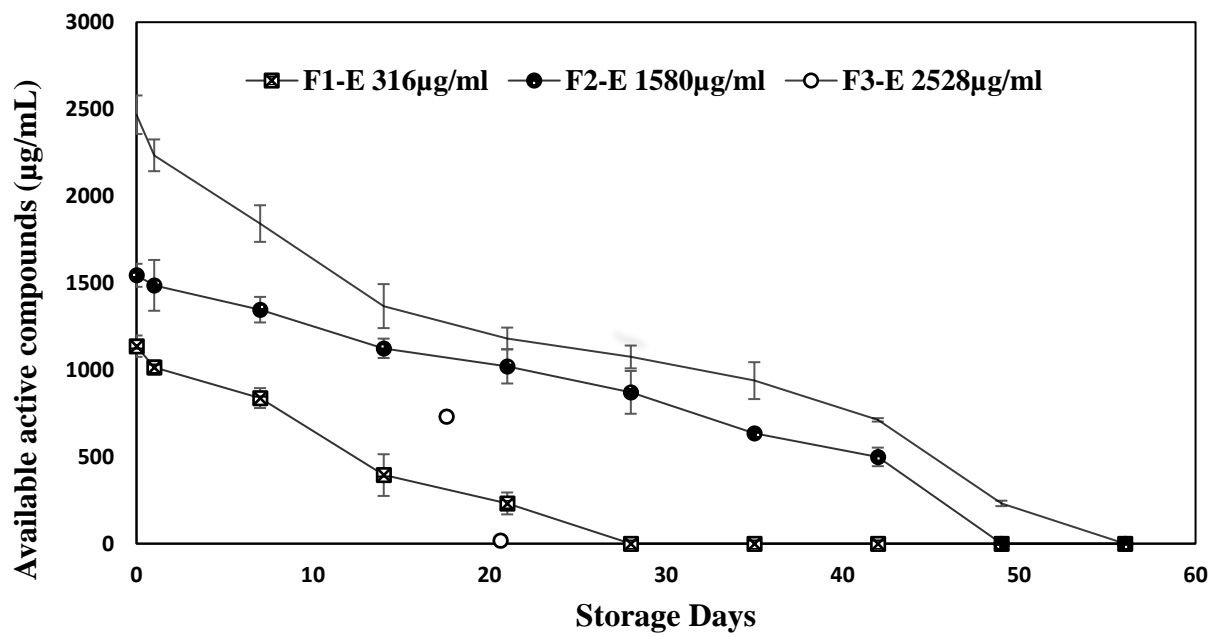
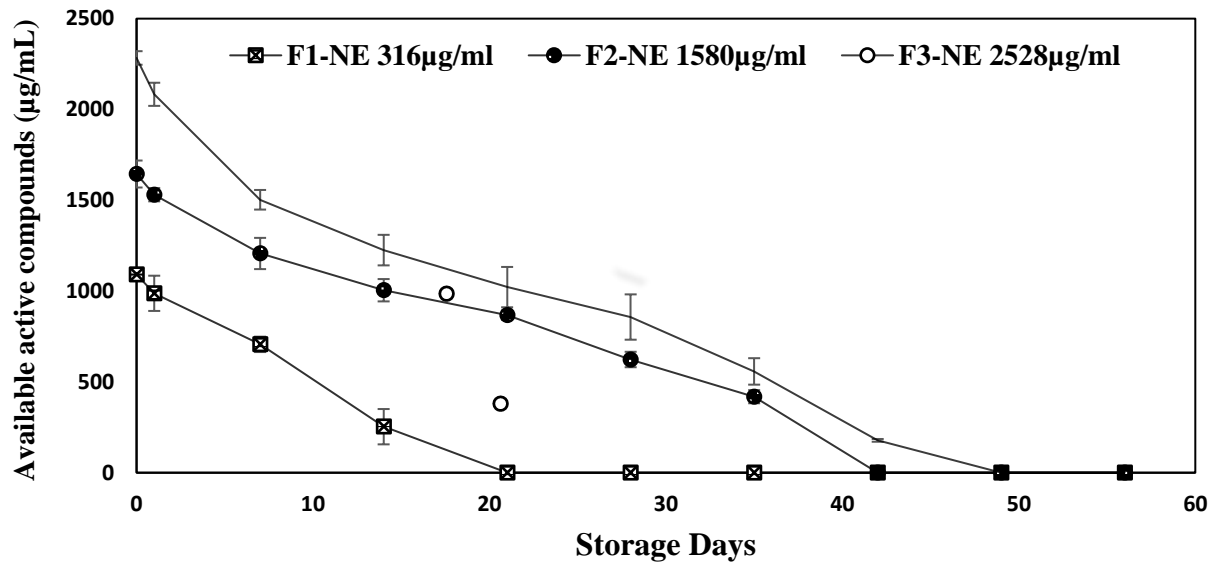


Figure 2.12 Available active compounds concentration from free and microencapsulated formulation against *Paecilomyces* during storage at 4°C in vitro BHI-agar deep-well model.

2.4 Conclusion

This study showed that many natural antimicrobial extracts have antifungal activity. CEA as well as cinnamon EOs were the most effective extracts against all evaluated fungal strains. This work examined also the impact of using WPI and MD as wall materials on the microencapsulation of developed formulation by microfluidization technique. The mixture of natural agents when combined with lecithin and SMP (HLB 10) and encapsulated with WPI: MD mixture at a ratio of 1:3 showed a better stability (-40.5 mV), a reduced particle size (115 nm) and a good antifungal activity at low concentration (315 ppm). This formulation led to a good EE (91%) and maintained an effective concentration of bioactive compounds against *Paecilomyces.spp* for 28 days of storage (4°C) compared to the non-encapsulated formulation (21 days). The optimized mixture could be used directly on food matrices as a user-friendly antifungal formulation by dipping or spraying. Finally, this formulation responds to a clean label approach which could be used in the food industry to meet customer requirements.

Acknowledgments

This research was supported by the Consortium for Research, Innovation and Transformation of Agrifood at McGill University (Consortium-RITA), the Agropur Dairy Cooperative Inc. (Quebec, Canada), Novalait Inc. (Quebec, Canada) and Bel Cheese Canada Inc. (Quebec, Canada). Agropur Dairy Cooperative is also acknowledged for supplying WPI. The authors thank Professor Ismail Fliss from Laval University (Quebec, QC, Canada) for providing the fungal strains used in this project no 251814.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Lien entre les chapitres 2 et 3

Le chapitre 2 « Développement d'une formulation antifongique naturelle pour le fromage râpé et d'une approche de microencapsulation utilisant un mélange d'isolat de protéines de lactosérum et de maltodextrine » a permis de développer une formulation antifongique complexe stable sous forme de nanoémulsion et à base d'additifs naturels efficaces pour détruire une variété sélectionnée de moisissures d'altération du fromage rapé.

Dans une deuxième partie de cette étude, une optimisation d'un procédé de séchage par atomisation a été mis en place et des essais *in vivo* de l'efficacité antifongique de la formulation développée sous forme de poudre ont été réalisés et comparés à ceux de la natamycine. Un suivi des paramètres physicochimiques tel que la couleur et l'activité de l'eau a été également établi et présenté dans le chapitre 3.

CHAPITRE 3: Antifungal properties of spray dried natural formulation to preserve grated cheese quality using whey protein isolate and maltodextrin blend

Propriétés antifongiques d'une formulation naturelle séchée par atomisation pour préserver la qualité du fromage râpé en utilisant un mélange d'isolat de protéines de lactosérum et de maltodextrine

Ghada Sassi, Stephane Salmieri, Salwa Karboune, Monique Lacroix

L'article est en phase de correction et prévu pour soumission pour publication dans le journal scientifique « International Dairy Journal » ; Facteur d'impact: 3.572

Le nombre de figures et de tableaux et le style des références ont été présentés selon le guide des auteurs du journal

Contribution des auteurs

Ce travail de recherche a été réalisé sous la supervision du Pr. Monique Lacroix. Toutes les expériences ont été réalisées en laboratoire par Ghada Sassi et les discussions sur les résultats et tests statistiques ont été assistés par Stéphane Salmieri. L'article a été écrit par Ghada Sassi, tandis que les corrections et révisions sont effectuées par Stephane Salmieri, Dr. Salwa Karboune et Pr. Monique Lacroix.

Résumé

Une formulation antifongique à base de nanoémulsion contenant des extraits naturels encapsulés dans un mélange d'isolat de protéine de lactosérum et de maltodextrine (1:3) a été séchée par séchage par atomisation et appliquée sur de la mozzarella râpée. L'efficacité de la formulation a été évaluée dans le but de prolonger la durée de conservation et d'inhiber la croissance des moisissures d'altération. Les résultats de la caractérisation de la formulation séchée par atomisation (PF) ont montré que le procédé permettait de retenir 62 % des composés phénoliques, conduisant à une bonne efficacité d'encapsulation de la formulation active totale (72,30 %). Le résultat de l'analyse sensorielle de la mozzarella râpée traitée avec du FP a révélé qu'une concentration de poudre $\leq 2\text{g/kg}$ était appréciée par rapport au témoin. L'évaluation *in situ* de sa capacité antifongique sur de la mozzarella râpée par test de provocation a révélé que la FP montrait un effet inhibiteur similaire à la natamycine (FN) avec une réduction de 3,4 log UFC/g après 56 jours de stockage (4°C). Le résultat du suivi de la durée de conservation de la mozzarella râpée traitée avec FP et FN a montré un début de croissance fongique qui a débuté au jour 35 et au jour 56 dans les emballages SA (sous air) et SL (sous azote) respectivement.

Mots clés : Antifongique ; Séchage par atomisation ; Fromage râpé ; test de provocation ; Durée de conservation

Antifungal properties of spray dried natural formulation to preserve grated cheese quality using whey protein isolate and maltodextrin blend

G. Sassi^a, S. Salmieri^a, S. Karboune^b, M. Lacroix^{a*}

^a INRS – Armand-Frappier Health Biotechnology Research Centre, Research Laboratories in Sciences, Applied to Food (RESALA), MAPAQ Research Chair in food safety and quality, Canadian Irradiation Centre (CIC), Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), 531 des Prairies Blvd, Laval, QC H7V 1B7, Canada

^b Department of Food Science and Agricultural Chemistry, Macdonald Campus, McGill University, 21111 Lakeshore Road, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, H9X 3V9, Canada

* Corresponding author. Prof. Monique Lacroix, Email: monique.lacroix@inrs.ca

MAPAQ chair on antimicrobial effects of stabilised natural antimicrobials in order to assure food safety and quality

Tel: 450-687-5010 # 4489, Fax: 450-686-5501.

Abstract

An antifungal nanoemulsion-based formulation containing natural extracts encapsulated into whey protein isolate and maltodextrin blend (1:3) was spray-dried and applied on grated mozzarella. Formulation efficiency was evaluated to extend the shelf-life and to inhibit the growth of spoilage fungi. The results of the characterization of spray dried formulation (FP) showed that the process allowed to retain 62 % of the phenolic compounds, leading to a good encapsulation efficiency of the total active formulation (72.30 %). Sensory analysis result of grated mozzarella treated with FP revealed that a powder concentration $\leq 2\text{g/kg}$ was appreciated compared to the control. *In situ* evaluation of its antifungal capacity on grated mozzarella by challenge test revealed that FP showed an inhibitory effect similar to natamycin (FN) with a reduction of 3.4 log CFU/g after 56 days of storage (4°C). Result of the shelf-life monitoring of grated mozzarella treated with FP and FN showed an onset of fungal growth started on day 35 and day 56 in the SA (under air) and SL (under nitrogen) packaging respectively.

Keywords: Antifungal; Spray drying; Grated cheese; Challenge test; Shelf life

3.1 Introduction

Among all dairy products, cheese present the most varied groups resulting of specific ripening and manufacture protocols, depending on its texture, format, flavor and aroma (Ramos et al., 2012). Mozzarella is a high-demanded type of cheese, and its consumption has greatly grown during the last decades. Indeed, in 2021, Canada produced approximately 154,475 metric tons mozzarella cheese (Emma Bedford, 2021). However, Cheese is a ready to eat food easily contaminated by undesirable pathogens on its surface (Kallinteri et al., 2013). For that, to maintain cheese quality during storage, it's required to protect it against the uncontrolled development of microorganisms such as yeast and molds, which affects sensory qualities of the products especially texture and appearance. This, reduces considerably cheese quality leading to health problems for the consumer as well as economical losses to the industry (Eliot et al., 2006; Ramos et al., 2012). Natamycin is a fungicide that belongs to polyethylene antibiotics, commonly employed on cheese surface to prevent yeasts and molds contamination (Kallinteri et al., 2013). As per Health Canada's list of permitted preservatives, natamycin is applied in an amount that does not exceed 10 parts per million for on shredded and grated cheeses (Branch, 2022). However, consumers are now demanding more naturel and less processed foods which are free of chemical preservatives (Han et al., 2014). This requirement created a big challenge for cheese industrials in order to guarantee the safety of their products shelf life. In addition, purchasers of Mozzarella cheese are concerned about physical properties deterioration that fastly occur from the two first weeks of storage (Oberg et al., 1991). Trobetas et al. (2008) showed that both colour and flavour are predominant quality factors in cheese, influenced by packaging atmosphere and light exposure. In order to reply to this issue, an antifungal, nanoemulsion-based formulation containing natural extracts was first developed and evaluated against various strains found in contaminated grated cheese (Sassi et al., 2022). The results showed a significant improvement of the bioactivity of the extracts in encapsulated formulation with an encapsulation efficiency (EE) of 91% and an antifungal activity at low concentrations of 315 ppm, comparatively to the non-encapsulated formulation (EE: 64 % and antifungal activity at 1250 ppm). The aim of this paper is to conduct *in situ* assays by applying the developed antifungal formulation on grated Mozzarella cheese in order to evaluate its effectiveness to control the mold growth and compare its efficiency with grated Mozzarella cheese treated with natamycin. In order to preserve the physic-chemical properties of grated cheese and allow a uniform distribution over its surface, the formulation was spray-dried before application on cheese surface. The obtained powder was then characterized for the content of total phenols, for the structural analysis by FTIR, for the encapsulation efficiency and oxidation stability. The study of the the shelf-life of grated mozzarella cheese as well as the evaluation of the formulation efficiency via a challenge test

against a consortium of the five (5) most resistant fungal strains (*A. niger*, *P. commune*, *Paecilomyces spp*, *P. citrinum* and *P. crustosum*) were carried out. The end of foods shelf-life has often been associated to the microbiological enumeration and/or physicochemical parameters values in diverse products categories (Calligaris et al., 2007). Therefore, the variation of the physicochemical parameters such as color and water activity were monitored simultaneously throughout the storage period (4°C) of the treated grated mozzarella.

3.2 Materials and methods

3.2.1 Emulsion preparation and drying conditions

The nanoemulsion based on antifungal formulation was produced as described by Sassi et al. (2022). The formed solution was then spray dried using a single stage Büchi mini spray dryer B-290 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) working in a co-current system and adopting an inlet air temperature of 150 ± 1 °C. The drying airflow and the feed rate were 35 m³/hr and 6.67 mL/min, respectively. The outlet temperature was maintained at 90 °C and the experiment was carried out using a medium-sized nozzle (1.4 µm). Obtained powder was collected in glass jars and stored in a desiccator for further analysis.

3.2.2 Characterization of microencapsulated powder

3.2.2.1 Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) of spray-dried formulation was determined based on the method described by Carneiro et al. (2013) and calculated using Eq 1.

$$EE = \frac{\text{Total oil} - \text{Free oil}}{\text{Total oil}} \times 100 \text{ (\%)} \quad \text{Eq (1)}$$

3.2.2.2 Total phenols content determination

The total content of phenolic compounds in the developed formulation before and after spray drying was determined spectrophotometrically according to the procedure of Folin Ciocalteu and as described by Caillet et al. (2006). Absorbances were read at 760 nm, and results were expressed in micrograms of gallic acid equivalents per 100 mL of extract (µg EAG/mL).

3.2.2.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy analysis

Chemical interactions between wall and core materials of the encapsulated powder were evaluated by FTIR spectrometer (PerkinElmer Spectrum ver. 10.4.2) equipped with an

attenuated total reflectance (ATR) device for solids analysis and a high-linearity lithium tantalate detector. This analysis aims to detect the possible molecular changes and to identify potential functional groups of spray dried formulation. The wavenumber range was maintained between 4000 to 650 cm⁻¹ using a spectral resolution of 4 cm⁻¹ and 64 scans per sample. Data were analyzed using Spectrum 6.3.5 software.

3.2.2.4 Peroxide values of microcapsules

In order to evaluate the oxidation rate of spray-dried-powder over time, the peroxide value (PV) of the powder formulation was evaluated during 30 days of storage at constant-temperature of 25°C and 60°C. Experiment was performed according to the method followed by Lavanya et al. (2020). Measurements were done at 500 nm using a UV–visible spectrophotometer (Scinco S-3100; Betatek Inc., Toronto, ON, Canada) and PV was calculated using Eq 2, as reported by Muresan et al. (2010).

$$PV = \frac{Abs}{55.84 \times W} \times \frac{1}{b} \text{ (mEq O}_2\text{/ Kg fat)} \quad \text{Eq (2)}$$

Where *Abs* is the absorbance, *w* is the weight (g), *b* is the slope of Fe (III) calibration curve and 55.84 correspond to the atomic weight of Fe (III).

3.2.3 Sensory evaluation

Sensory analysis of untreated grated mozzarella cheese (Control C) and treated with five (5) concentrations of the formulation (**Table 3.1**) was performed over two (2) days by fifteen (15) panelists using a 9-point hedonic scale (1 = dislikes a lot; 5 = neither like nor dislike; 9 = likes a lot). For each panelist, three (3) grated cheese samples, including the control, were served on day 1 and and four (4) samples, including the control, were served on day 2 respectively in order to evaluate the odor, the texture, the taste and the overall appreciation.

Table 3.1 Concentrations of powders formulation used for grated mozzarella treatment.

Formulation	F1	F2	F3	F4	F5
Concentration (g powder/ kg cheese)	3g /kg	1g/kg	0,3g/kg	2g/kg	0,6g/kg

3.2.4 *In situ* antifungal efficiency of powder formulation in grated mozzarella

3.2.4.1 Effect on the shelf-life of grated mozzarella cheese

Total mesophilic flora (TMF), lactic acid bacteria (LAB) and yeasts and molds (Y/M) counts for three (3) groups of grated mozzarellas (cheese + nataseen FN; cheese + active formulation FP; and untreated cheese F), were analyzed during storage at 4°C for packaging sealed under nitrogen (SL) and under air (SA). For each analysis, 25g of samples were homogenized (1 min /230 rpm) in 225 g of peptone water 0.1% (w/v) (Alpha Biosciences Inc., Baltimore, MD, USA) using a Seward™ Stomacher™ Model 400 Circulator Lab Blender (Fisher Scientific). Each homogenate was then serially diluted and plated (0.1 mL) on Plate Count Agar (PCA; BD Difco Inc.), MRS Agar (Alpha Biosciences Inc.) and Potato Dextrose Agar with chloramphenicol (PDA; Alpha Biosciences Inc.) for TMF, LAB and Y/M counts respectively. Plates were incubated for 24 h at 37°C for TMF, 48 h at 37°C for LAB and 72 h at 28°C for Y/M determination. Results are expressed in counts (Log CFU/g). In this study, yeast and moulds enumeration was chosen as the alteration factor determining the shelf life of the cheese samples. Indeed, Shelf-life limit present the limit of unacceptability when the total molds and yeasts reached the current authorities regulation level of 10² CFU/g (Barthe et al., 2006).

3.2.4.2 Challenge test

Challenge test was carried out on grated mozzarella cheese treated with natamycin (FN) and active formulation (FP), compared to the control (F; untreated grated mozzarella) in order to evaluate the antifungal properties against a consortium of the five (5) most resistant fungal strains (*A. niger*, *P. commune*, *Paecilomyces* spp, *P. citrinum* and *P. crustosum*). A volume of 2.5 mL was taken from the fungal consortium initially prepared at 10⁸ conidia/mL and inserted in a high oxygen barrier film bags (DELI*1; Winpak, Winnipeg, MB, Canada). Then, 25g of each group (F, FN and FP) of grated mozzarella (Pizza Mozzarella; Agropur QC, Canada) was added into each bag. The cheese samples were mixed well, then sealed under air and stored at 4°C. Microbiological analysis were carried out at 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42.49 and 56 days of storage. The count of the fungal level (Log CFU/g) was ensured using PDA plates, after incubation at 28°C for 72 h.

3.2.5 Evaluation of the physico-chemical stability of grated mozzarella cheese

3.2.5.1 Color stability

Color stability of grated mozzarella cheese was evaluated during storage using a Minolta Color reader CR10 colorimeter (Konica Minolta Sensing Inc., Mahwah, NJ, USA) according to Ben-

Fadhel et al. (2021). Reflectance measurements were carried out on the surface of the three (3) groups of grated mozzarella (cheese + nataseen FN; cheese + active formulation FP; and untreated cheese F), sealed under air (SA) and under N₂ (SL). Color parameters such as L* (lightness, black = 0, white = 100), a* (redness > 0, greenness = 0, blue < 0), b* (blue yellow from -300 to +299) and the total color difference (ΔE^*) between FN and FP was quantified, according to the following equation (3):

$$\Delta E^* = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]} \quad \text{Eq (3)}$$

3.2.5.2 Water activity (a_w)

A_w measurements of the 3 groups of grated mozzarella (F, FN and FP), sealed under N₂ and under air, were taken during the storage period for 84 days at 4°C using a Rotronic AwQuick A2101 system equipped with an AWC probe (G'eneq Inc., Montreal, QC, Canada). The Aw-meter has been calibrated using humidity standards of 0.5, 10, 35, 80 and 95%.

3.2.6 Statistical analysis

All experiments were done in triplicate (n=3). For each replicate, 3 data were analysed. Microbiological data were transformed into logarithms of CFU/g and were employed for analysis of variance using statistical software PASW Statistics 18.0 software (IBM Corp., Somers, NY, USA). One-way ANOVA applied at a confidence level of 95%. Differences between means were considered significant when the confidence interval was lower than 5% ($P \leq 0.05$).

3.3 Results and Discussion

3.3.1 Powder Characterization: Encapsulation efficiency (EE %), Total phenols content and Peroxide values of microcapsules

Microencapsulation efficiency was evaluated by calculating the EE (%) value of the powder resulting from spray drying process. Indeed, EE was indirectly determined by the extraction of the free essential oil present on the surface of the microcapsules. A mean value of 10 % was obtained while the total essential oil content obtained was 36.1 %, showing an EE of 72.30 %. The low free essential oil content may be due to several combined factors observed in this study such as the small particle size of the nanoemulsions prepared before spray drying, the adapted Whey Protein Isolate (WPI) and Maltodextrin (MD) ratio as well as the parameters used during spray drying process. Indeed, according to Bae & Lee (2008), a larger droplet size of the emulsion generally results in a higher milk free fat content, thus decreasing the EE% value. Also, as claimed by Hu et al. (2020), a high ratio of WPI:MD leads to a decrease in EE

% of microcapsules containing volatile materials. These authors obtained an EE of 87.28 % and 84.18 % using a ratio of WPI: MD = 1: 3 and 1: 1.5 respectively.

The result of the total phenols content of the developed formulation before and after spray drying is presented in **Fig 3.1**. The objective of this analysis was to evaluate the effect of the incorporation of the encapsulation matrix on the relative stability of total phenolic content of the studied formulation. Result showed that the total phenol content value of the spray dried formulation was 150 μg EAG/mL, compared to 200 μg EAG/mL contained in the liquid formulation. This confirms a retention of 62 % of phenolic compounds following the spray drying process. This result shows that, spray drying was a satisfactory technique and, the effect of the thermal stress on polyphenols was minor using an appropriate operating condition (Inlet temperature = 150°C; Outlet temperature = 90°C). The same observation was reported by Fang & Bhandari (2011) who studied the effect of spray drying and storage on the stability of berry polyphenols. These authors found that berry juice, when spray-dried, in presence of maltodextrin (DE 10) as a support, provided a high total phenolic content retention (96 %). The inlet and the outlet temperatures used were 150 °C and 80 °C respectively. Also, Ersus & Yurdagel (2007), noted a greater loss of anthocyanin at high spray-drying temperatures (Inlet temperature > 160 °C; Outlet temperature > 107 °C) following their study about the microencapsulation of black carrot anthocyanin by spray drying.

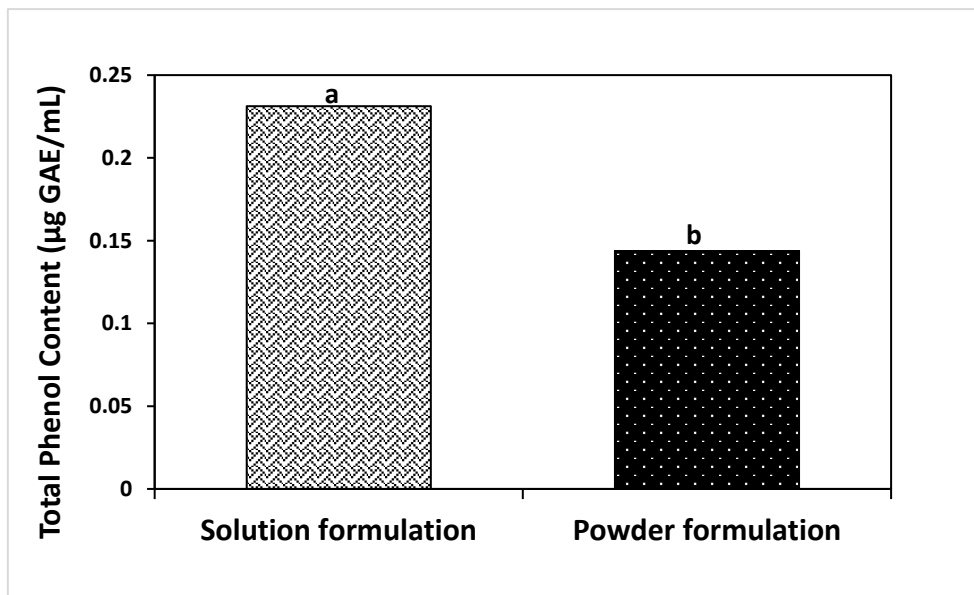


Figure 3.1 Total phenol content (μg EAG/mL) of the developed formulation before and after spray drying. Different letters above the bars indicate significant differences among the mean values of the samples ($P \leq 0.05$). Data shown is the mean \pm SD (n=3).

The results of the development of the peroxide value (PV) of the formulation during 30 days of storage at 25 °C and 60 °C are presented in **Fig 3.2**. Result showed that at day 7 of storage, the developed formulation had a PV value of 0.0007 and 0.001 meq O₂/kg at 25°C and 60°C respectively ($P > 0.05$). A slight increase in PV was noted for both temperatures from day 14 and reached a maximum value of 0.002 meq O₂/kg of oil on day 28 at 25°C and 60°C. These low VP values reflect the conservation of a good oxidation rate of the developed formulation under the studied conditions. These results clarified that applying the spray-drying process did not induce any adverse effect on the peroxidation of developed formulation's active compounds. Indeed, a low quantity of oil present on the surface of the particles was noted, therefore less contact with oxygen, inducing a less sensitivity to fat oxidation over time, as a result of the encapsulation. This correlates with the good encapsulation efficiency found in this study (72.30%). According to Tonon et al. (2011), the lower the encapsulation efficiency, the higher the amount of oil present on the surface of the particles and conversely. They found that the lowest lipid oxidation (0.017 meq peroxide/kg oil) corresponded to an encapsulation efficiency of 91.97 %. Also, it has been reported that, in a system based on proteins alone, the porosity of the wall matrix promotes its permeability to oxygen. Furthermore, the addition of carbohydrates to a proteins mixture such as a high-DE maltodextrin, affects less the porosity of the system wall matrix and thus improves the oxidative stability. This can be explained by the fact that oxygen is hydrophobic and the presence of a more hydrophilic compound (MD) could reduce the oxygen permeability of the wall matrix (Bae & Lee, 2008; Dzondo-Gadet et al., 2005).

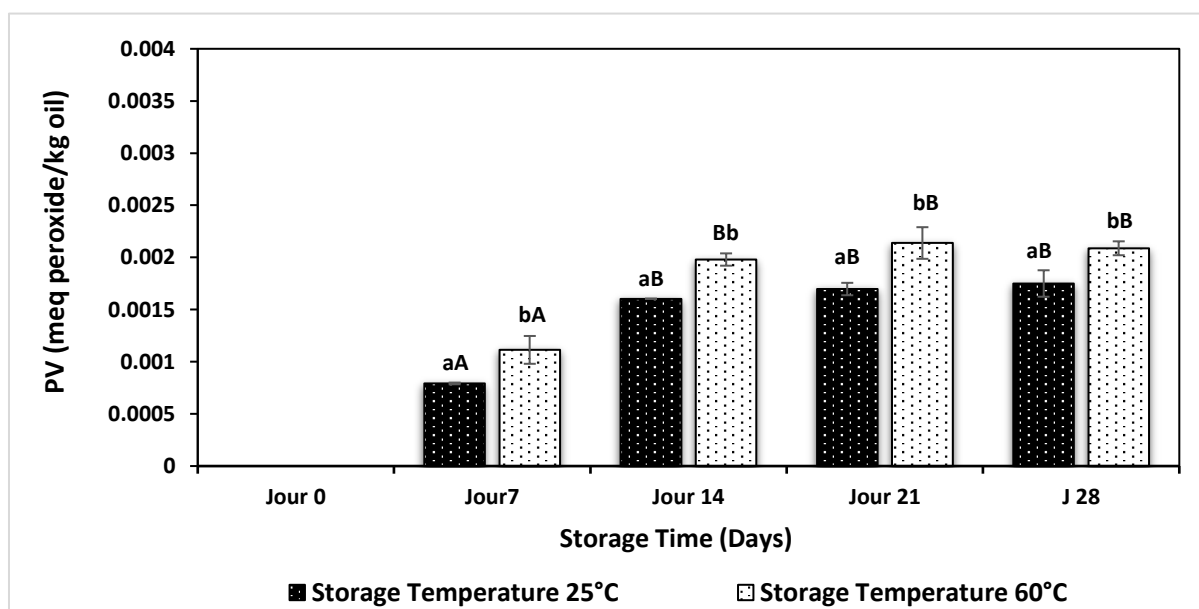


Figure 3.2 Peroxide value (PV) of the developed formulation during 30 days storage at 25°C and 60°C. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean PV values at each temperature over time. Different capital letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the 2 temperatures on each day. Data shown is the mean \pm SD ($n=3$).

3.3.2 ATR-FTIR Analysis

ATR-FTIR spectroscopy of powder formulation was performed in order to identify the functional groups of the microcapsules and to detect the possible molecular changes as well as the different chemical reactions between the encapsulation matrix (EM), active compounds (AC) and the powder formulation containing the encapsulation matrix (F) during the spray-drying process. The spectra of each group are presented in **Fig 3.3**. The result showed that peaks corresponding to the elongation of the O-H (alcohol and phenols) and N-H bands reflect a higher absorbance for (F)-spectrum. The same effect was noted for =CH (aromatic and unsaturated hydrocarbons), -CH₂, -CH₃ (aliphatic compounds) and C=O (carbonyl compounds) elongation bands. This observation demonstrates that the addition of the active compounds enhances molecular groups composing it such as glycerol, alpha-tocopherol, organic acids, bioflavonoids. A small =CH elongation band corresponding to the presence of trisubstituted alkene was also detected for (EM)-spectrum and (F)-spectrum at 3011 cm⁻¹. However, the intensity of amide I and amide II bands were not affected due to the absence of adding of amyl or amide. Encapsulation matrix spectra exhibited a strong amide type I at 1641 cm⁻¹, and amide II at 1580 cm⁻¹. This result is in agreement with that reported by Karrar et al. (2021) who evaluated the potential of the combination of maltodextrin with arabic gum and whey protein isolate on the microencapsulation of gurum seed oil by a spray-drying method. However, a deviation towards high frequencies and energies was noted for Amide II band in (F)-spectrum. This presumes the presence of interactions in the developed system (F). This analysis revealed that the presence of active compounds did not affect the protein structure and induced a good stability of the encapsulation system at the level of molecular interactions. Hu et al. (2020) registered that no apparent chemical change of CEO (cinnamon essential oil) was detected by the FTIR method following the microencapsulation of cinnamon EO by spray-drying using an encapsulation matrix based on WPI and MD. Also, active compounds were detected in (F)-spectrum at 1000 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹ and 1400 cm⁻¹ which corresponds to the presence of alkyl and aliphatic compounds respectively.

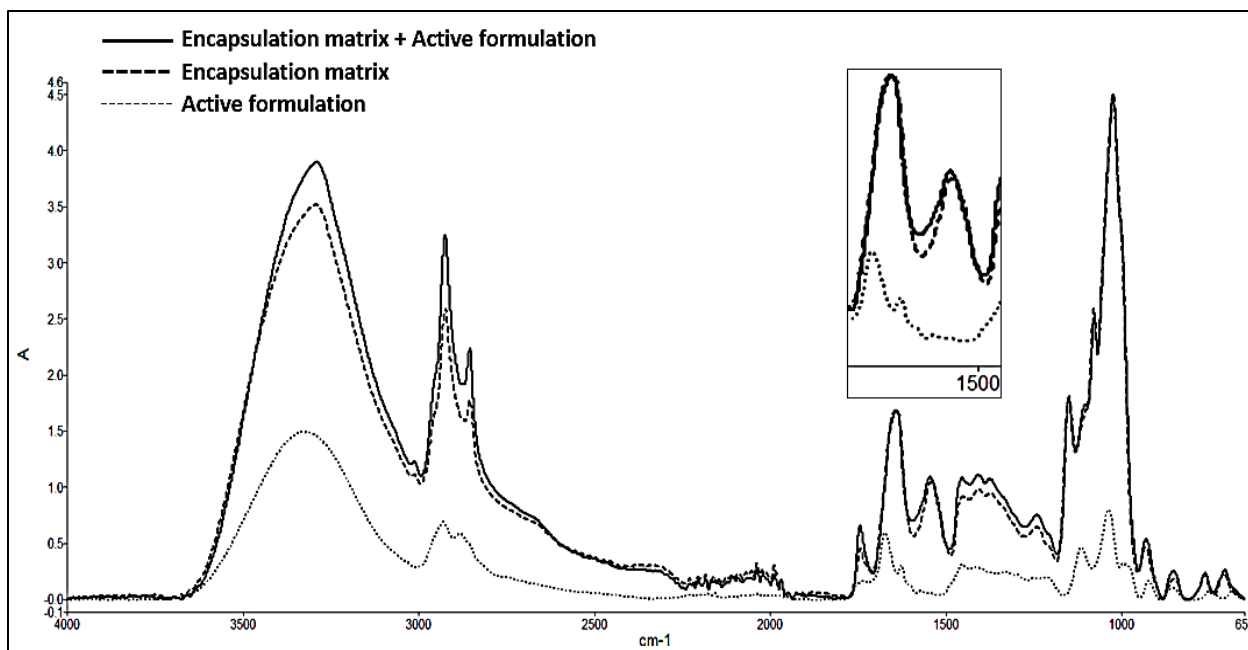


Figure 3.3 FTIR spectra of the encapsulation matrix, the active formulation and the encapsulated formulation after spray-drying process.

3.3.3 Sensory analysis

Sensory analysis of grated mozzarella cheese treated or not with five (5) different concentrations of formulation-loaded powder, was done by evaluating the odor, the texture, the taste and the overall appreciation, using a nine-point hedonic scale and results are presented in **Fig 3.4**. Samples were ranked from most appreciated (9) to least appreciated (1). Results showed that, compared to the control, grated mozzarella treated with F2 did not have any detrimental effect on the odor, on the taste and on the overall appreciation ($P > 0.05$). The values were 6.0, 6.2 and 6.0 as compared to 6.9, 7.2 and 6.8 for the control samples respectively. However, grated mozzarella treated with F1 was classified as less acceptable compared to the control ($P \leq 0.05$) in terms of odor (4.9 and 6.9 respectively), taste (4.3 and 7.2 respectively) and overall appreciation (4.3 and 6.8 respectively). The texture of the F1-treated cheese showed similar result (5.3) to those noted with the F2-treated cheese (6.2) as compared to the control (6.5) ($P > 0.05$). In addition, grated mozzarellas treated with F3, F4 and F5 were accepted compared to the control ($P > 0.05$) in terms of odor (6.7, 6.6, 6.2 and 6.7), texture (7.3, 7.1, 7.1 and 7.5), taste (6.8, 6.3, 6.5 and 7.5) and overall appreciation (6.9, 6.6, 6.5 and 7.7) respectively. In summary, compared to untreated cheese, F1 was the least accepted coating concentration by the panelists. In fact, it was the most concentrated powder which induced a less appreciated aftertaste and a slightly sweet smell, hence the reduction in the product rating. This may be associated with the presence of high amounts of cinnamon EOs in the cheese. This finding correlates with the results of Faehrich et al. (2017) and Tornambé et al. (2008) who noted an alteration in the sensory properties of cheese after the

addition of EOs only in high doses. The result suggests that grated mozzarella treated with a powder containing a concentration $\leq 2\text{g/kg}$ of active compounds does not affect the organoleptic properties and could be considered to study its antifungal activity by direct contact with food via *in situ* tests.

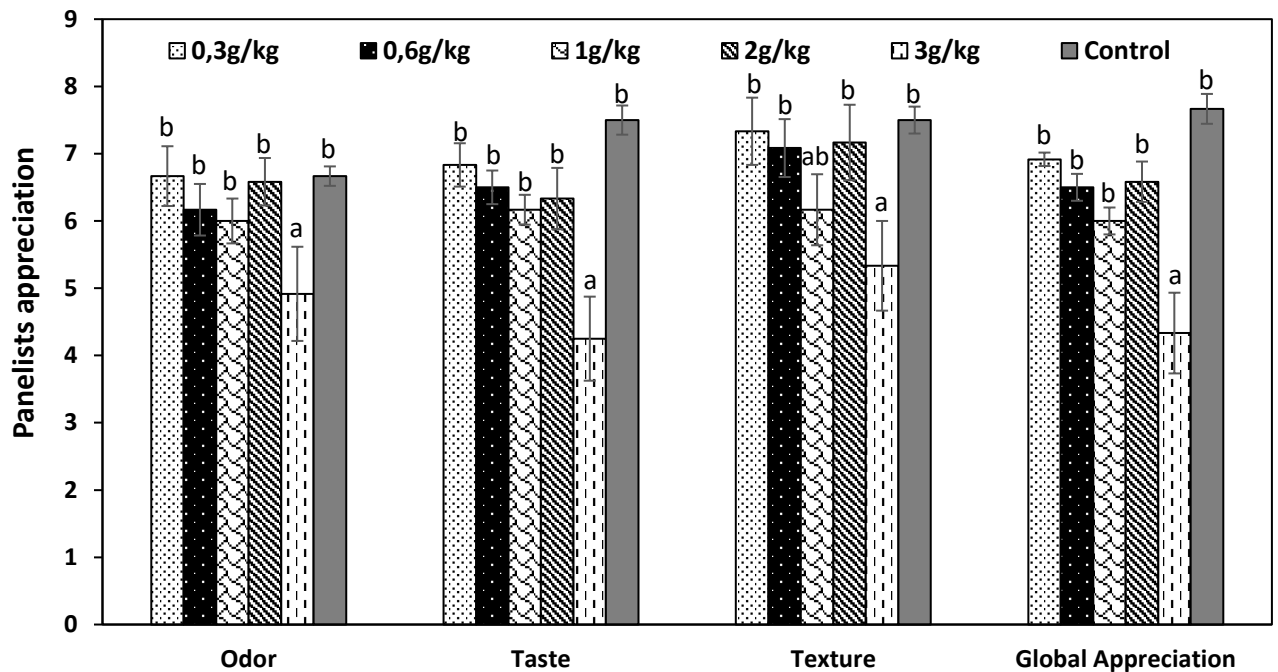


Figure 3.4 Appreciation scale of taste, smell, texture and global appreciation of grated mozzarella cheese treated with different concentrations of the powder formulation.

3.3.4 *In Situ* Test

3.3.4.1 Shelf-life

Total mesophilic flora (TMF)

The results of TMF for the cheese treated with nataseen (FN), the cheese treated with the active formulation (FP), and the untreated cheese (F), during storage (4°C) are presented in **Fig 3.5A** for SL packaging and in **Fig 3.5B** for SA packaging. When stored under air, all cheese groups showed a slight decrease in the growth of TMF was noted during the first 3 days of storage ($\text{Log } 2 \text{ CFU/g}$) followed by a gradual increase to reach 3.07 Log CFU/g for F, 2.7 Log CFU/g for FN and 2.8 Log CFU/g for FP after 84 days of storage at 4°C . Indeed, Eliot et al. (2006) found that mesophilic counts of air-packed shredded Mozzarellas decreased during the first weeks, confirming the inhibition of lactic acid bacteria by oxygen. Then, the TMF count was gradually increased due to the multiplication of yeasts, molds and staphylococcus. However, the results of grated mozzarella sealed under N_2 showed a peak ($\approx 2.6 \text{ Log CFU/g}$) at day 28 ($P > 0.05$) then, maintained relatively stable until 84 days of storage at 4°C . These

results are in agreement with Felfoul et al. (2017) who showed that the trend of total mesophilic flora count was similar for all fresh Mozzarella samples packed under five modified atmospheres (vacuum; 40% CO₂/60% N₂; 60% CO₂/40% N₂; 100% CO₂ and 100% N₂). Indeed, it started with a slight decrease followed by an increase in week 4, then remained relatively stable.

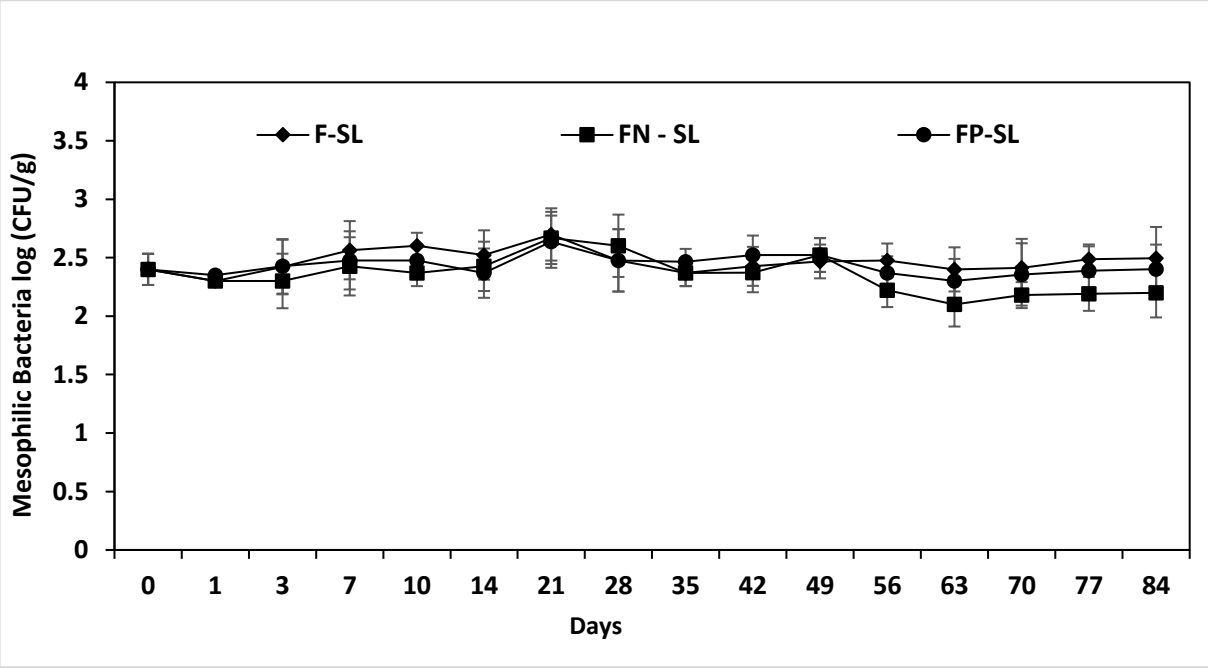


Figure 3.5A. Total mesophilic flora (TMF) in grated mozzarella sealed under N₂ (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation.

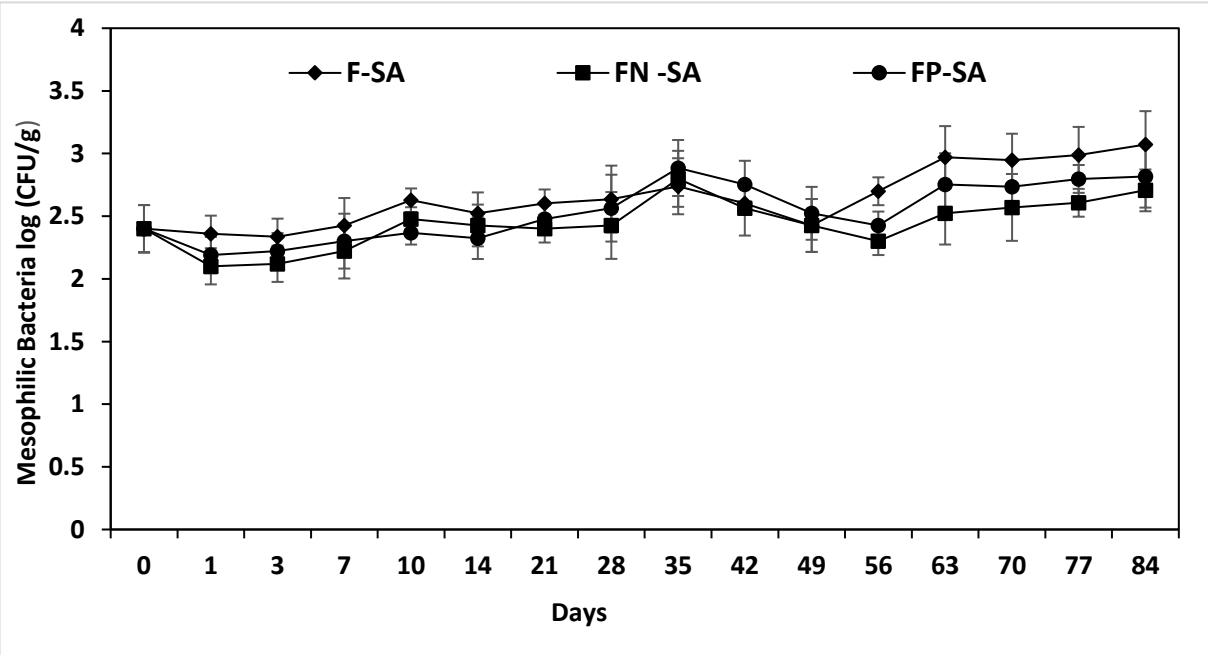


Figure 3.5B. Total mesophilic flora (TMF) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA: Control; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation.

Lactic Acid Bacteria (LAB)

The results of LAB for F, FN and FP groups sealed under N₂ (SL) and under air (SA) during storage (4°C) are presented in **Fig 3.6A** and **Fig 3.6B** respectively. For SA, a decrease of 1 Log CFU/g was noted during the first 21 days of storage followed by an increase to reach ≈ 3.3 Log CFU/g at day 84 of storage at 4°C for all groups ($P > 0.05$). However, for SL, the LAB variation was more pronounced for tested groups from day 14 of storage (4°C). Indeed, an increase has been noted for F to reach 4.6 Log CFU/g. The same observation was noted for FP (4.2 Log CFU/g) and FN 4.2 Log CFU/g) at day 49 of storage. According to Eliot et al. (2006), who worked with Mozzarella and stored at 10°C, this finding was explained by the sensitivity of anaerobic LAB to oxygen. However, its stability as well as its slight increase over time may be due to the disappearance of O₂. Also, according to Felfoul et al. (2017), LABs are slightly affected under modified atmospheres and could grow well because their Gram-positive facultative anaerobes nature which correlates with the results of this study.

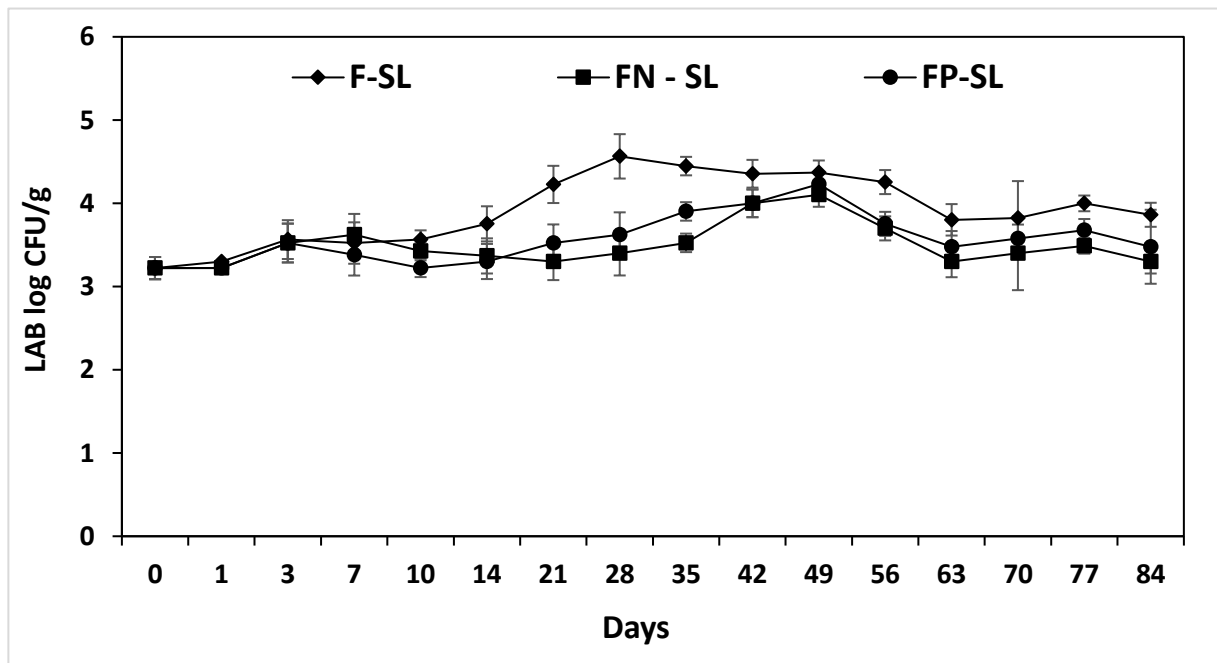


Figure 3.6A Lactic Acid Bacteria (LAB) in grated mozzarella sealed under N₂ (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation.

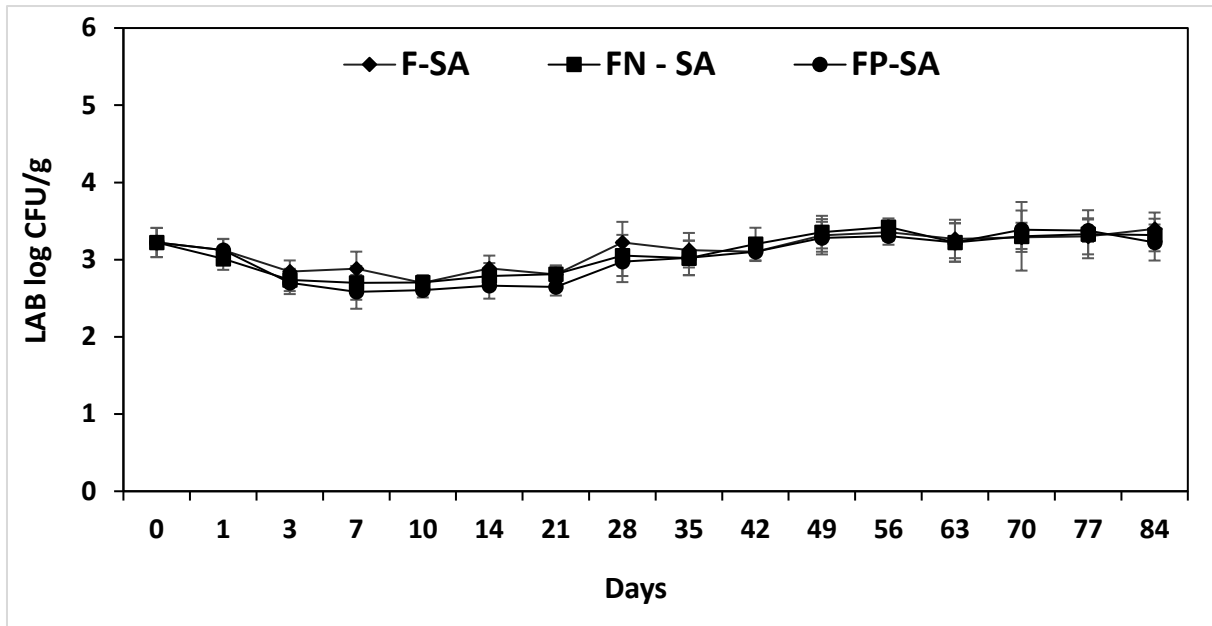


Figure 3.6B Lactic Acid Bacteria (LAB) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA: Control; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation

Yeast and mold (YM)

The results of YM for F, FN and FP groups sealed under N₂ (SL) and under air (SA) during storage (4°C) are presented in **Fig 3.7A** and **Fig 3.7B** respectively. Results showed that, for the FP and FN groups, an onset of fungal growth started on day 35 for the SA packaging and on day 56 for the SL packaging. Comparatively, for the control group, YM growth started at day 21 and 49 respectively, in SA and SL packaging. For SA packaging, YM count reached 2 Log CFU/g for FP and FN at day 70 of storage. However, F group reached this limit on the first 28 days of storage. For SL packaging, YM count attained the limit of unacceptability in a period included between 63 and 70 days for F and between 77 and 84 days for FN and FP groups. This demonstrates the effectiveness of the combined effect of the use of modified atmosphere packaging with antifungal formulations on the delay of YM growth over time. Indeed, the results of the use of natamycin was expected, given its success as an antimycotic polyene, known to prevent the growth of yeasts and molds on cheese surfaces (Ramos et al., 2012). However, compared to FP, results showed no significant difference ($P > 0.05$) over time for the two types of packaging tested. This confirms the role of the antifungal effect of the formulation developed in this study on the shelf-life extension of grated Mozzarella which was similar to that of natamycin. In this context, Ramos et al. (2012) studied the evaluation of edible antimicrobial coatings based on whey protein isolate to improve the shelf life of cheese. Comparing to natamycin, they noted that cheeses coated with antimicrobials showed no growth (< 100 cfu/g) of yeasts or molds during 60 days of storage at 10 °C. The same observation was found by

Fernandes et al. (2018) who studied the preservation of microencapsulated essential oil of oregano in grated parmesan. They found that the growth of YM was inhibited during 30 days of storage at 25 °C.

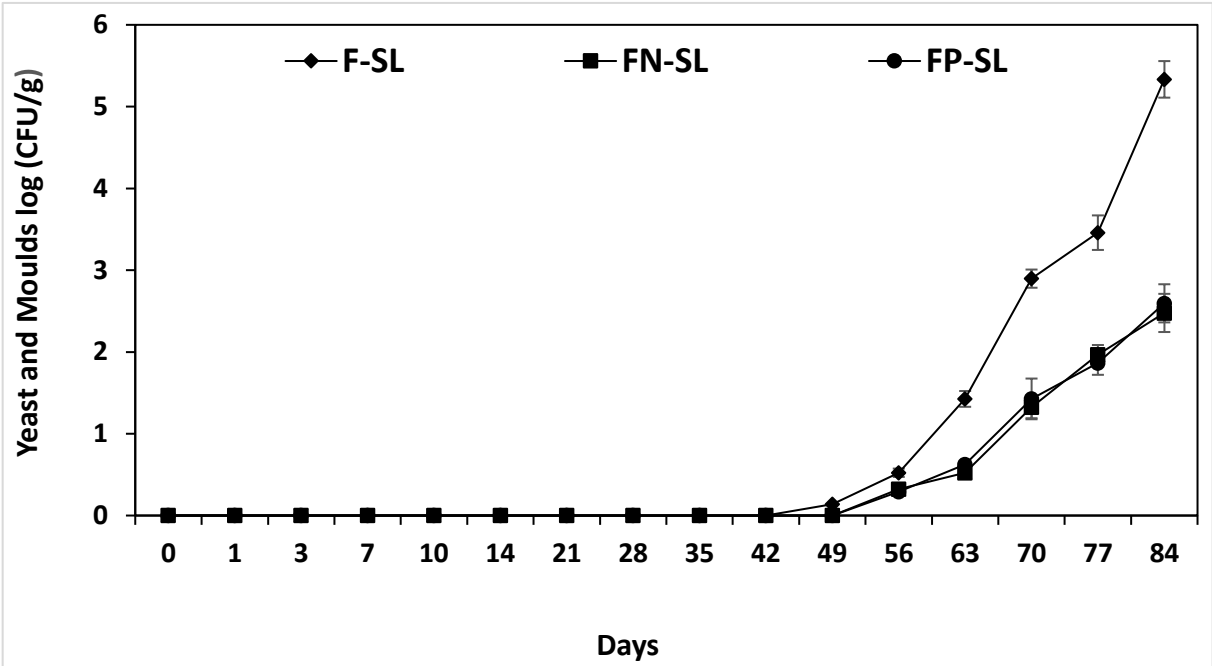


Figure 3.7A Yeasts and molds (YM) in grated mozzarella sealed under N2 (SL) at 4°C. F-SL: Control; FN-SL: Cheese + Nataseen; FP-SL: Cheese + Active Powder Formulation

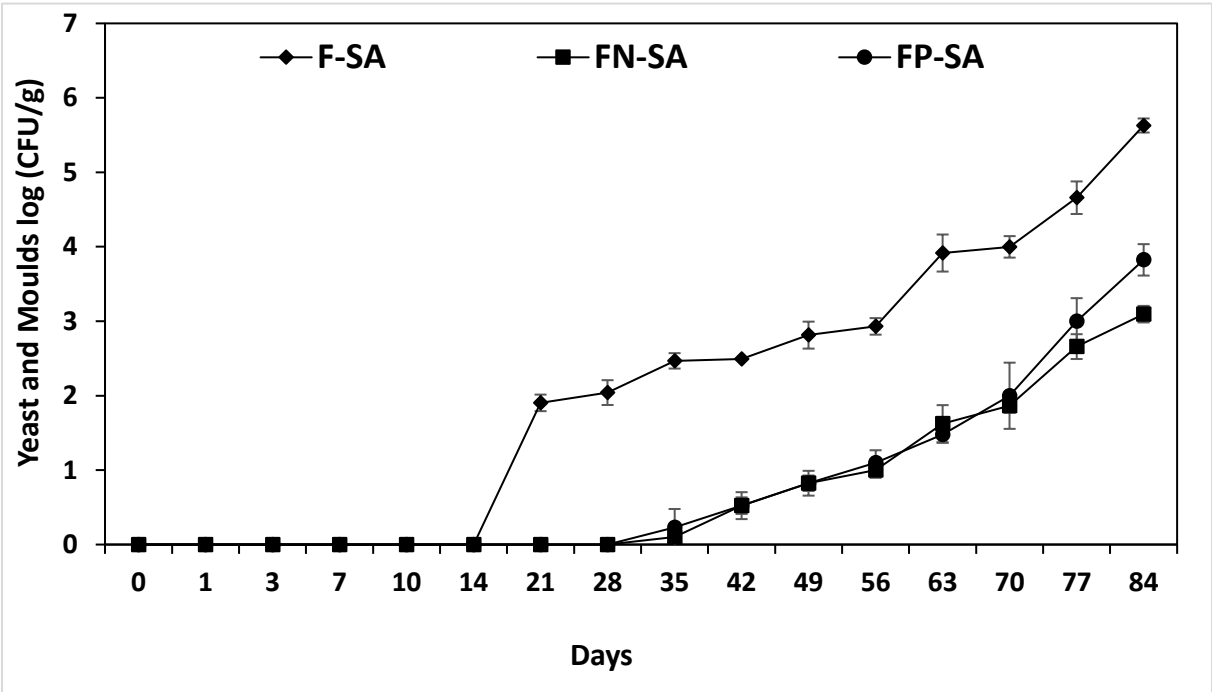


Figure 3.7B Yeasts and molds (YM) in grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F-SA : Control ; FN-SA: Cheese + Nataseen; FP-SA: Cheese + Active Powder Formulation.

3.3.4.2 Challenge test

4 log spores/g of a consortium composed of the five (5) most resistant fungal strains were inoculated into a sterile grated mozzarella samples treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP). Control samples (F) contained no active combinations (only pathogens with cheese). The results of challenge test (**Fig 3.8**) showed that, over time, a significant growth ($P \leq 0.05$) of the molds was noted for F and reached 6.34 Log CFU/g at day 56 when stored at 4°C. However, from day 10 of storage, the developed formulation (FP) showed an inhibitory effect similar to natamycin (FN) ($P > 0.05$) with a reduction of 1 log spores/g. This could be explained by the fact that a release of a sufficient quantity of active compounds took place on day 10 of storage. This progressive reduction in the growth of molds reached 0.9 Log CFU/g and 0.8 Log CFU/g on the 56th day of storage (4°C) for grated mozzarella treated with FP and FN respectively. These results show that the developed antifungal powder can significantly reduce spoilage fungi during storage of shredded mozzarella ($P \leq 0.05$). Several studies have demonstrated the effect of the application of natural bioactive compounds on the reduction of fungal growth by the reduction of the presence of mycotoxins on cheese. For example, Luz et al. (2019) studied the extension of the shelf life of mozzarella cheese contaminated with *Penicillium* spp. using the natural antifungal compound e-polylysine. They showed that the use of polylysine promoted the shelf life of mozzarella by 1-3 days compared to the control.

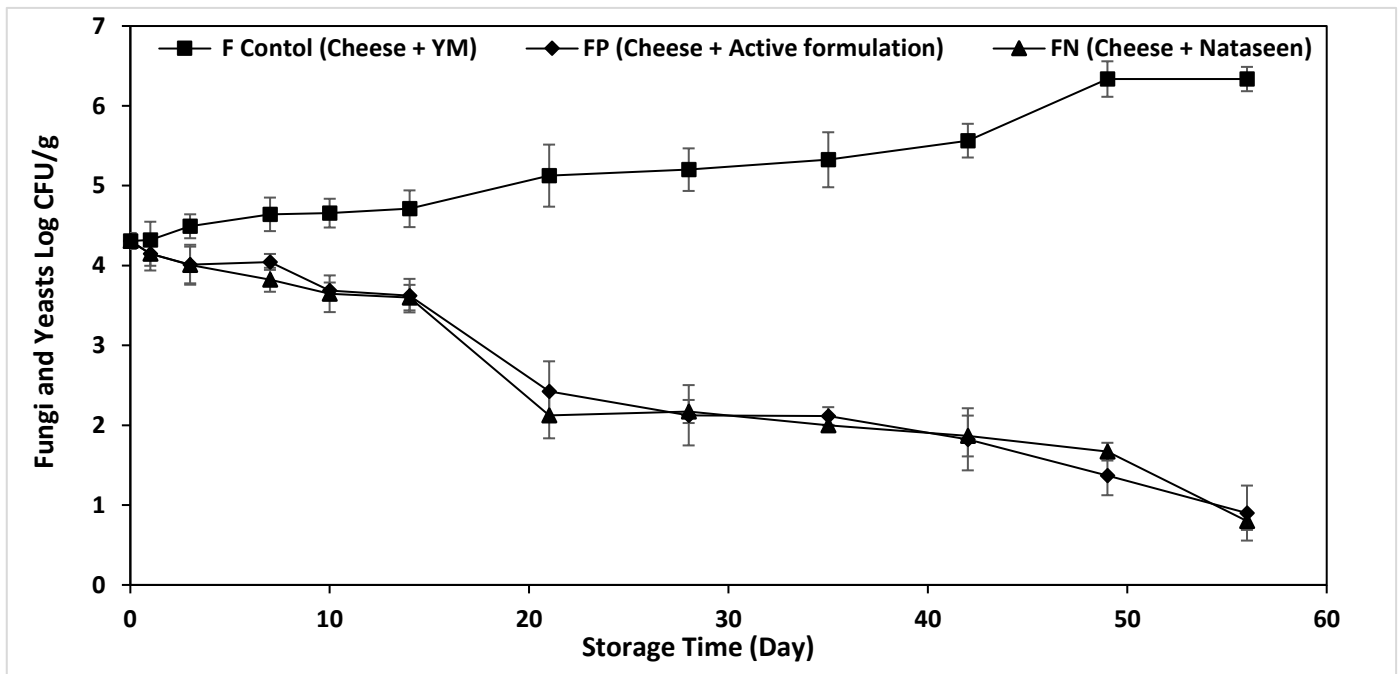


Figure 3.8 Effect of the active formulation (FP) and Natamycin (FN) applied to grated Mozzarella to control the growth of the fungal consortium (*A. niger*, *P. commune*, *Paecilomyces* spp, *P. citrinum* and *P. crustosum*). The control cheese (F) does not contain antimicrobials. Average logarithmic value ($n = 3$).

3.3.5 Physico-chemical stability

3.3.5.1 Color measurements

The color of cheese is an important index in terms of general appearance and consumer acceptance. The results of the variation of the parameters L^* , a^* and b^* for SL and SA packaging are presented in **Tables 3.2** and **3.3** respectively. For the two types of packaging and all cheese groups (F, FN and FP), grated mozzarella showed a progressive discoloration during storage period (4°C) following a decrease in L^* values ($P \leq 0.05$). The same observation was noticed by Trobetas et al. (2008) who studied the light-induced changes in grated Graviere hard cheese packaged under modified atmospheres (air; 100% CO₂; 100% N₂ and 50% CO₂ /50% N₂) and stored at 4°C. Indeed, they noted that the decrease in L^* can be attributed to light-induced carotenoid breakdown as well as the breakdown of riboflavin, which acts as a photosensitizer in photo-oxidation reactions. However, the values of a^* increased over time ($P \leq 0.05$) for the 3 tested groups of cheeses and for the two types of packaging studied, reaching a maximum value of -7.6 ± 0.0 and -7.2 ± 0.5 for F packaged under SL and SA respectively. The same effect was marked for b^* which reached 33.1 ± 0.9 and 33.2 ± 0.3 for F packed under SL and SA respectively. This reflects a gradual discoloration of the samples, probably due to the migration of fats to the surface. This discoloration was induced by the loss of yellowness and brightness (Mei et al., 2015). The results of the total color difference (ΔE) between FN and FP during storage (4°C) for SL and SA is presented in **Table 3.4**. This shows that the differences between the two cheese groups have become increasingly significant ($P \leq 0.05$) during the storage period with a more accelerated increase for air-sealed cheeses ($\Delta E = 6.6 \pm 0.6$; day 84). These last results indicate that air-sealed cheese does not remain more commercially acceptable at this level of monitoring since ΔE has become greater than 5. According to Minz & Saini. (2019), only a color difference (ΔE) between the colorimeter and the color vision system of less than 5, can be considered as a commercially acceptable result. Their study focused on the evaluation of the calibration framework of RGB calibration cubes and the effect of calibration cards on the measurement of the color of mozzarella cheese.

Table 3.2 Color measurement of grated mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under N₂, during storage at 4°C. F is the untreated control cheese. (Mean value ± standard deviation, n = 3). L*: lightness, a*: (green to red), b* (blue to yellow).

D	L*			a*			b*		
	F	FN	FP	F	FN	FP	F	FN	FP
0	79.4 ± 2.3 ^{aAB}	81.1 ± 0.5 ^{aAB}	81.8 ± 0.5 ^{aA}	-11.4 ± 0.2 ^{aA}	-11.7 ± 0.2 ^{aA}	-11.0 ± 0.1 ^{bA}	22.4 ± 0.8 ^{aA}	21.8 ± 0.5 ^{aA}	26.5 ± 1.4 ^{aA}
1	79.5 ± 0.4 ^{aAB}	80.4 ± 1.6 ^{aA}	81.8 ± 0.4 ^{aA}	-11.0 ± 0.0 ^{aAB}	-10.7 ± 0.3 ^{aB}	-9.9 ± 0.6 ^{aC}	26.4 ± 0.1 ^{aA}	28.8 ± 0.4 ^{bB}	26.9 ± 0.5 ^{aA}
3	81.0 ± 0.4 ^{abA}	82.7 ± 1.2 ^{abB}	83.5 ± 1.3 ^{bC}	-10.7 ± 0.0 ^{aA}	-10.5 ± 0.4 ^{aB}	-10.5 ± 0.4 ^{aB}	31.3 ± 0.1 ^{aA}	31.5 ± 0.6 ^{cB}	28.9 ± 0.4 ^{bC}
7	81.8 ± 0.9 ^{cA}	83.2 ± 0.1 ^{bB}	83.4 ± 0.4 ^{bB}	-11.0 ± 0.1 ^{aA}	-10.8 ± 0.3 ^{aB}	-10.5 ± 0.3 ^{aBC}	28.5 ± 0.2 ^{aA}	28.8 ± 0.2 ^{bBC}	29.0 ± 0.5 ^{bC}
10	82.9 ± 0.1 ^{cdA}	83.3 ± 0.2 ^{bB}	83.1 ± 0.3 ^{bC}	-11.1 ± 0.1 ^{aA}	-10.8 ± 0.2 ^{aB}	-10.7 ± 0.1 ^{aC}	27.5 ± 0.3 ^{aA}	28.6 ± 0.2 ^{bB}	29.5 ± 0.3 ^{bC}
14	83.5 ± 0.1 ^{dA}	83.3 ± 0.3 ^{bA}	83.0 ± 0.3 ^{bA}	-10.1 ± 0.2 ^{aA}	-10.4 ± 0.1 ^{aA}	-10.0 ± 0.1 ^{aA}	31.6 ± 0.3 ^{aA}	29.5 ± 0.3 ^{bB}	30.0 ± 0.6 ^{cC}
21	83.0 ± 0.1 ^{dA}	83.0 ± 0.1 ^{bB}	83.3 ± 0.0 ^{bA}	-10.1 ± 0.2 ^{aA}	-10.3 ± 0.0 ^{aB}	-9.8 ± 0.0 ^{cC}	30.0 ± 0.2 ^{aA}	30.3 ± 0.4 ^{cA}	30.7 ± 0.2 ^{cB}
28	82.5 ± 0.4 ^{cA}	83.2 ± 0.1 ^{bB}	82.6 ± 0.2 ^{cBC}	-10.4 ± 0.2 ^{aA}	-10.3 ± 0.0 ^{aA}	-9.7 ± 0.1 ^{cB}	30.5 ± 0.3 ^{aA}	30.7 ± 0.8 ^{cA}	31.2 ± 0.4 ^{cBC}
35	79.2 ± 0.3 ^{aA}	82.7 ± 0.3 ^{bB}	82.7 ± 0.3 ^{cB}	-9.4 ± 0.1 ^{bA}	-10.2 ± 0.1 ^{bB}	-10.0 ± 0.2 ^{aB}	32.3 ± 0.3 ^{aA}	30.9 ± 0.8 ^{cB}	31.4 ± 0.4 ^{cC}
42	79.4 ± 0.2 ^{aA}	80.6 ± 0.4 ^{aB}	79.5 ± 0.2 ^{dA}	-9.4 ± 0.2 ^{bA}	-10.3 ± 0.1 ^{bB}	-9.7 ± 0.1 ^{aC}	30.2 ± 0.1 ^{aA}	30.7 ± 0.0 ^{cB}	32.1 ± 1.5 ^{dC}
49	77.9 ± 0.2 ^{aA}	77.6 ± 0.2 ^{dA}	77.7 ± 0.3 ^{dA}	-9.6 ± 0.1 ^{bA}	-10.0 ± 0.0 ^{bB}	-9.3 ± 0.0 ^{cC}	32.7 ± 0.1 ^{aA}	31.9 ± 0.0 ^{cB}	33.2 ± 0.0 ^{eC}
56	76.0 ± 0.2 ^{aA}	75.9 ± 0.2 ^{eA}	75.2 ± 0.1 ^{cB}	-8.9 ± 0.1 ^{cA}	-9.9 ± 0.1 ^{bB}	-9.7 ± 0.0 ^{cB}	31.2 ± 0.2 ^{aA}	31.6 ± 0.4 ^{cB}	32.9 ± 0.6 ^{eC}
63	75.5 ± 0.3 ^{eA}	75.1 ± 0.1 ^{eAB}	74.9 ± 0.1 ^{cC}	-8.1 ± 0.0 ^{cA}	-8.8 ± 0.0 ^{bB}	-8.7 ± 0.2 ^{dB}	31.9 ± 0.0 ^{aA}	33.1 ± 0.0 ^{dB}	33.9 ± 0.1 ^{fC}
70	74.5 ± 0.9 ^{eA}	75.8 ± 0.5 ^{eB}	75.5 ± 0.1 ^{cBC}	-8.1 ± 0.1 ^{cA}	-8.5 ± 0.1 ^{bB}	-8.7 ± 0.1 ^{dC}	32.2 ± 1.1 ^{aA}	33.1 ± 0.4 ^{dB}	34.1 ± 0.3 ^{fC}
77	74.0 ± 0.2 ^{eA}	74.6 ± 0.1 ^{fB}	74.2 ± 0.6 ^{cA}	-7.8 ± 0.4 ^{cA}	-8.0 ± 0.3 ^{bB}	-8.1 ± 0.3 ^{cB}	32.6 ± 0.6 ^{aA}	33.6 ± 0.3 ^{dB}	34.3 ± 0.2 ^{fC}
84	74.3 ± 0.6 ^{eA}	73.9 ± 1.0 ^{fB}	73.6 ± 0.9 ^{cB}	-7.6 ± 0.0 ^{cA}	-7.7 ± 0.3 ^{cA}	-7.6 ± 0.3 ^{dA}	33.1 ± 0.9 ^{aA}	33.9 ± 0.1 ^{dB}	34.5 ± 0.2 ^{fC}

Means with different lowercase letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$). The means with different capital letters in the same row for the same commodity are significantly different ($P \leq 0.05$). L*: lightness, a*: (green to red), b* (blue to yellow).

Table 3.3. Color measurement of grated mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under air, during storage at 4°C. F is the untreated control cheese. (Mean value ± standard deviation, n = 3). L*: lightness, a*: (green to red), b* (blue to yellow).

D	L*			a*			b*		
	F	FN	FP	F	FN	FP	F	FN	FP
0	79.4 ± 2.3 ^{aA}	81.1 ± 0.5 ^{bAB}	81.8 ± 0.5 ^{bA}	-11.4 ± 0.2 ^{abA}	-11.7 ± 0.2 ^{aA}	-11.0 ± 0.1 ^{bA}	22.4 ± 0.8 ^{aA}	22.4 ± 0.8 ^{bA}	26.5 ± 1.4 ^{cA}
1	81.7 ± 0.1 ^{aB}	81.3 ± 0.1 ^{aB}	81.8 ± 0.4 ^{aA}	-11.0 ± 0.0 ^{aA}	-10.7 ± 0.3 ^{aB}	-9.9 ± 0.6 ^{aB}	26.4 ± 0.1 ^{aA}	28.8 ± 0.4 ^{bB}	26.9 ± 0.5 ^{bA}
3	80.7 ± 0.1 ^{aC}	81.6 ± 0.1 ^{aB}	81.4 ± 0.6 ^{aAB}	-11.6 ± 0.0 ^{aA}	-10.3 ± 0.1 ^{bB}	-10.2 ± 0.1 ^{bB}	31.1 ± 0.2 ^{aA}	28.3 ± 0.3 ^{abB}	29.3 ± 0.4 ^{bB}
7	79.4 ± 0.0 ^{aA}	80.7 ± 0.1 ^{bB}	80.8 ± 0.1 ^{bB}	-10.1 ± 0.1 ^{aA}	-10.1 ± 0.1 ^{aA}	-10.0 ± 0.1 ^{aA}	29.9 ± 3.5 ^{aA}	28.8 ± 0.3 ^{bB}	31.0 ± 0.1 ^{cC}
10	79.3 ± 0.1 ^{aA}	81.2 ± 0.1 ^{bB}	80.8 ± 0.2 ^{bC}	-9.2 ± 0.1 ^{aA}	-9.9 ± 0.0 ^{bB}	-9.7 ± 0.0 ^{bB}	29.1 ± 0.4 ^{aA}	30.1 ± 0.2 ^{bB}	30.9 ± 0.0 ^{bC}
14	79.0 ± 0.0 ^{aA}	81.1 ± 0.7 ^{bB}	81.2 ± 0.5 ^{bB}	-9.5 ± 0.2 ^{aA}	-9.8 ± 0.1 ^{aB}	-9.6 ± 0.0 ^{aC}	30.2 ± 0.4 ^{aA}	30.6 ± 0.0 ^{abB}	31.2 ± 0.1 ^{bC}
21	79.8 ± 0.2 ^{aA}	81.4 ± 0.2 ^{bB}	81.0 ± 0.1 ^{bC}	-9.4 ± 0.2 ^{aA}	-9.9 ± 0.1 ^{aB}	-9.5 ± 0.0 ^{aA}	30.9 ± 0.0 ^{aA}	30.7 ± 0.1 ^{aA}	31.3 ± 0.1 ^{bA}
28	79.8 ± 0.3 ^{aA}	80.1 ± 0.1 ^{aA}	79.8 ± 0.2 ^{aA}	-9.4 ± 0.2 ^{aA}	-9.5 ± 0.1 ^{aA}	-9.0 ± 0.0 ^{bB}	30.0 ± 0.2 ^{aA}	31.0 ± 0.2 ^{bB}	31.7 ± 0.2 ^{cC}
35	78.4 ± 0.1 ^{aA}	81.5 ± 0.2 ^{bB}	78.8 ± 0.2 ^{aC}	-9.6 ± 0.0 ^{aA}	-9.5 ± 0.1 ^{aA}	-9.2 ± 0.1 ^{bB}	31.3 ± 0.2 ^{aA}	31.3 ± 0.3 ^{aA}	32.0 ± 0.4 ^{bB}
42	78.1 ± 0.5 ^{aA}	80.0 ± 0.1 ^{bB}	80.5 ± 0.3 ^{bB}	-9.2 ± 0.1 ^{aA}	-10.4 ± 0.0 ^{bB}	-10.0 ± 0.0 ^{cB}	33.2 ± 0.2 ^{aA}	31.6 ± 0.3 ^{bE}	32.0 ± 0.2 ^{cC}
49	76.1 ± 0.0 ^{aA}	79.8 ± 0.1 ^{bB}	80.1 ± 0.2 ^{bB}	-9.0 ± 0.2 ^{aA}	-10.3 ± 0.1 ^{bBC}	-10.0 ± 0.1 ^{bB}	33.2 ± 0.1 ^{aA}	31.8 ± 0.0 ^{bB}	32.3 ± 0.1 ^{cC}
56	75.6 ± 0.2 ^{aA}	77.1 ± 0.1 ^{bB}	78.3 ± 0.1 ^{cC}	-8.6 ± 0.2 ^{aA}	-10.3 ± 0.0 ^{bB}	-9.8 ± 0.2 ^{bC}	33.3 ± 0.2 ^{aA}	32.0 ± 0.1 ^{bB}	32.2 ± 0.0 ^{bB}
63	74.5 ± 0.3 ^{aA}	73.2 ± 0.0 ^{bB}	77.7 ± 0.0 ^{cC}	-7.9 ± 0.1 ^{aA}	-9.1 ± 0.1 ^{bB}	-9.8 ± 0.1 ^{cC}	34.7 ± 0.1 ^{aA}	32.2 ± 0.0 ^{bB}	32.6 ± 0.0 ^{cB}
70	74.3 ± 0.1 ^{aA}	73.8 ± 0.6 ^{aB}	74.9 ± 1.1 ^{aC}	-7.8 ± 0.3 ^{aA}	-8.8 ± 0.1 ^{aB}	-9.2 ± 0.0 ^{aC}	34.9 ± 0.6 ^{aA}	32.1 ± 0.0 ^{aB}	32.4 ± 0.1 ^{aB}
77	73.6 ± 0.5 ^{aA}	73.5 ± 0.1 ^{aA}	74.6 ± 0.2 ^{aB}	-7.6 ± 0.0 ^{aA}	-8.4 ± 0.3 ^{aB}	-8.6 ± 0.2 ^{aB}	33.8 ± 1.1 ^{aA}	31.6 ± 0.4 ^{aB}	32.0 ± 0.0 ^{aB}
84	73.8 ± 0.1 ^{aA}	73.6 ± 0.3 ^{aA}	74.0 ± 0.1 ^{aB}	-7.2 ± 0.5 ^{aA}	-7.4 ± 0.6 ^{aA}	-7.9 ± 0.2 ^{aB}	33.2 ± 0.3 ^{aA}	31.2 ± 0.1 ^{aB}	31.7 ± 0.3 ^{aC}

Means with different lowercase letters in the same column are significantly different ($P \leq 0.05$). The means with different capital letters in the same row for the same commodity are significantly different ($P \leq 0.05$). L*: lightness, a*: (green to red), b* (blue to yellow).

Table 3.4 ΔE measurement of grated mozzarella du Mozzarella treated with natamycin (FN) and the active formulation (FP), sealed under N₂ (SL) and under air (SA), during storage at 4°C. (Mean value \pm standard deviation, n = 3).

Days	ΔE FN-FP	
	SL	SA
0	1.7 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
1	1.8 \pm 0.0	1.8 \pm 0.3
3	1.5 \pm 0.2	1.7 \pm 0.1
7	1.8 \pm 0.1	2.0 \pm 0.1
10	2.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1
14	2.4 \pm 0.0	2.9 \pm 0.3
21	3.0 \pm 0.1	3.7 \pm 0.1
28	3.5 \pm 0.0	3.9 \pm 0.2
35	3.7 \pm 0.4	4.9 \pm 0.6
42	4.1 \pm 0.2	5.5 \pm 0.4
49	3.7 \pm 0.1	5.4 \pm 0.3
56	4.2 \pm 0.2	5.3 \pm 0.5
63	4.7 \pm 0.2	5.1 \pm 0.1
70	4.3 \pm 0.4	5.6 \pm 0.1
77	5.2 \pm 0.0	6.1 \pm 0.2
84	6.3 \pm 0.2	6.6 \pm 0.6

3.3.5.2 Water activity

Water activity (a_w) is a parameter characterizing the stability of food products. Its increase is determined by the molecular properties of the bulk water in the system, which can be easily transported to the cheese surface (Baranowska et al., 2017). In general, water activity of most cheese varieties is not low enough to prevent the growth of yeasts and molds and many bacteria (Arboatti et al., 2014). The results of a_w monitoring of F, FN and FP, sealed under nitrogen and under air, during storage (4°C) are presented in **Fig 3.9A** and **Fig 3.9B** respectively. At day 0, a_w was between 0.940 (F) and 0.943 (FP). During storage, this, noted a significant increase ($P \leq 0.05$) for F samples, sealed under air, rising a_w values of 0.955 while this effect was noted for F, sealed in N₂, from day 14 of storage at 4°C. These results showed that, overall, the presence of air in the packaging bags, on the contrary of N₂, accelerates the increase in free water of mozzarella. On the 84th day of storage, this reached 0.965 and 0.962 for F sealed under air and under N₂ respectively. The water activity of FN and FP samples did not show a significant difference/day for the two types of packaging ($P > 0.05$). These two

groups also noted an increase in their a_w with time which was less accelerated in sealed packages under N₂. This can be explained by the fact that the presence of O₂ favors the absorption of water by the proteins, thus inducing the aging of the product. In this context, Kuo et al. (2001) have observed that as water migrates into the protein matrix during aging, proteins take up more water, thus the hydration sphere of proteins increases to accommodate water molecules additional. In mozzarella cheese, the protein network could be formed similarly to the starch network in other products. Water molecules participate in the construction of the nodes of the biopolymer network (Baranowska et al., 2017). Also, as the water activity increases, less energy is required for water to escape from the protein matrix binding site in the cheese, subsequently the cheese melts more easily (Dai et al., 2018).

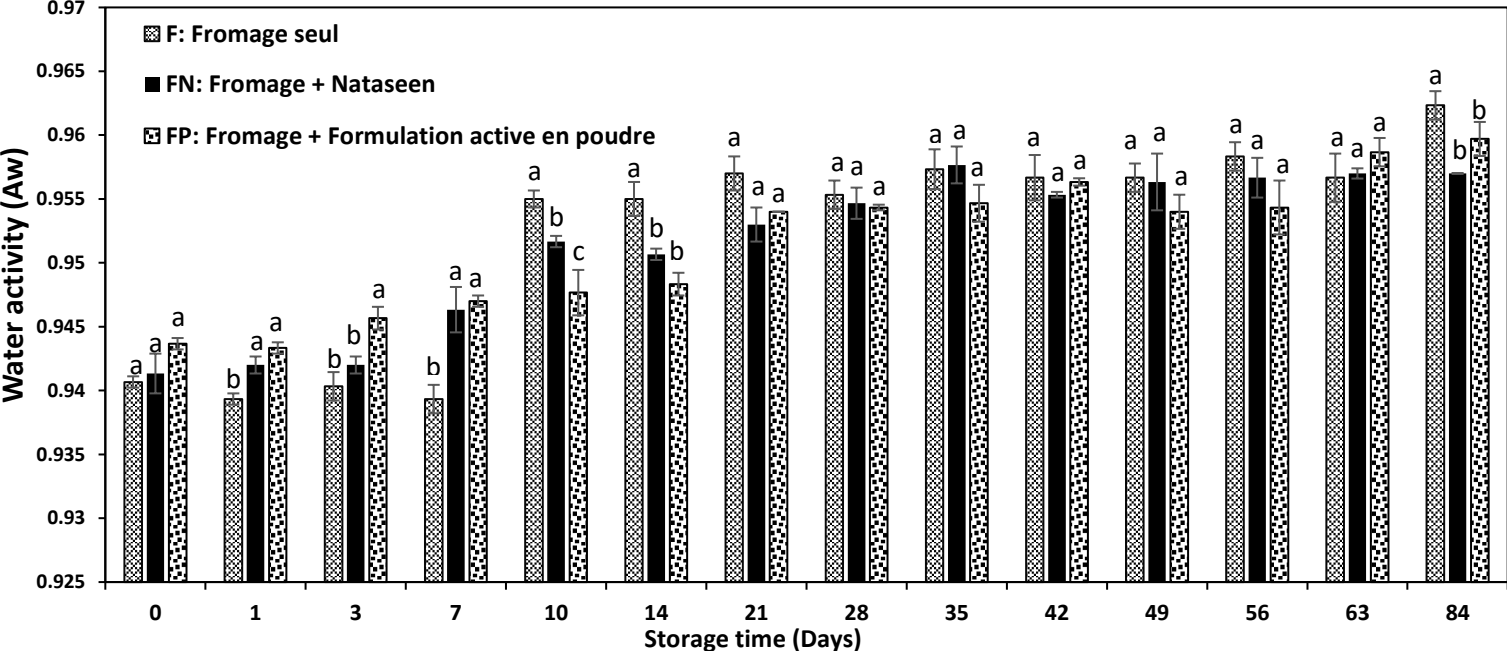


Figure 3.9A Water activity (a_w) of grated mozzarella sealed under N₂ at 4°C. F: Control; FN: Cheese + Nataseen; FP: Cheese + Active Powder Formulation. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean a_w values of every group on each day. Data shown is the mean \pm SD (n=3).

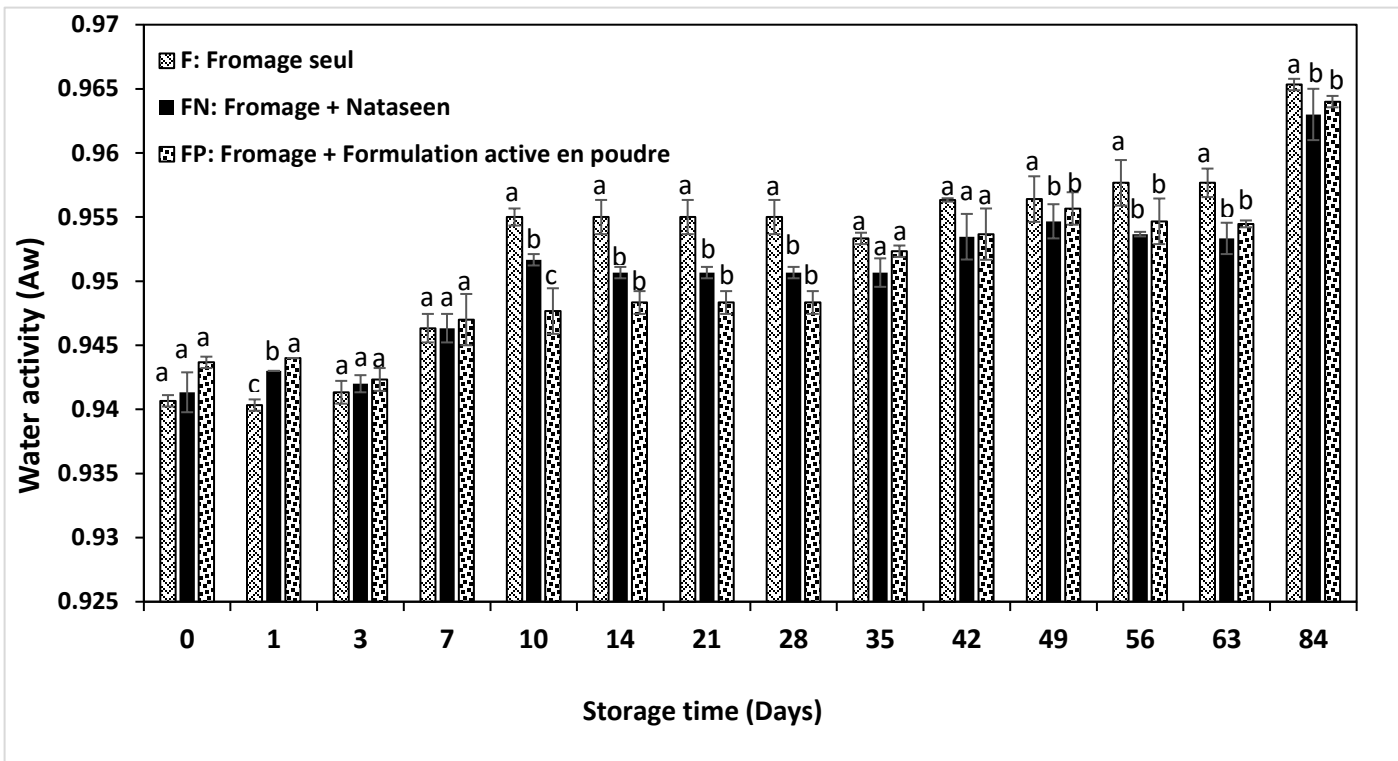


Figure 3.9B Water activity (a_w) of grated mozzarella sealed under air (SA) at 4°C. F: Control; FN: Cheese + Nataseen; FP: Cheese + Active Powder Formulation. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences ($P \leq 0.05$) between the mean a_w values of every group on each day. Data shown is the mean \pm SD (n=3).

3.4 Conclusions

Spray-drying process allowed the retention of a good content of phenolic compounds in the powder formulation (62 %) which kept a good oxidative stability for 30 days of storage at 25°C and 60°C. The addition of bioactive agents in the developed dried formulation induced a better stability of the encapsulation system. Grated mozzarella treated with a concentration $\leq 2\text{g/kg}$ of the developed formulation was more appreciated by the sensory panel. *In situ* evaluation revealed that the application of antifungal formulation was effective inhibiting the growth of fungi and yeast during 70 and 77 days of grated cheese stored at 4°C for SA and SL packaging respectively. Challenge test showed that the developed formulation showed an inhibitory effect similar to natamycin, with a reduction of 3.4 log CFU/g on the 56th day of storage (4°C). Finally, with the growing of the consumer demand for the marketing of food products containing natural antimicrobial agents, the developed formulation can respond to this requirement and present a potential alternative to natamycin. It can be used by cheese industry but possibly in other food sectors (meat, vegetables, and marine products).

Acknowledgments

This research was supported by the Consortium for Research, Innovation and Transformation of Agrifood at McGill University (Consortium-RITA), the Agropur Dairy Cooperative Inc. (Quebec, Canada), Novalait Inc. (Quebec, Canada) and Bel Cheese Canada Inc. (Quebec, Canada), project 251814.

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

Ghada Sassi: methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing, visualization. **Stephane Salmieri:** software, data curation, writing—review and editing. **Salwa Karboune:** review and editing. **Monique Lacroix:** Conceptualization, validation, data curation, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de recherche a porté sur le développer d'une formulation antifongique complexe à base d'additifs d'origines naturelles aussi efficace que la natamycine et la mise au point d'un procédé d'encapsulation adéquat afin que les propriétés organoleptiques du fromage râpé soient préservées, et l'exigence des consommateurs pour des produits " étiquette épurée " sera respecté.

4.1 Sélection des meilleurs antifongiques d'origine naturelle

Le criblage des meilleurs composés antifongiques de sources naturelles efficaces pour la réduction de moisissures d'altération du fromage nous a permis de mettre en œuvre une cartographie de 20 composés antimicrobiens en fonction de leurs propriétés antifongiques *in vitro* par l'intermédiaire des analyses qualitatives (méthode de diffusion sur gélose) et quantitative (concentration minimale inhibitrice ; CMI). Les HEs de la cannelle, et celles de la citronnelle, d'origon, de basilic sacré ainsi que les extraits de citrus A et B étaient les meilleurs composés ayant montrés une forte capacité antifongique à des faibles CMI contre les souches fongiques étudiées. Ces agents sont principalement constitués de *trans*-cinnamaldéhyde, de carvacrol, de citral, d'eugénol, et d'autres composés phénoliques et flavones polyméthoxylées. Ceci prouve l'efficacité des constituants à structure phénoliques contre les micro-organismes (Muñoz Castellanos et al., 2020). En effet, ils dénaturent les protéines et réagissent avec les phospholipides de la membrane cellulaire qui modifient leur perméabilité (Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, 2012).

4.2 Sélection de la meilleure formulation synergique antifongique

Les meilleurs composés antifongiques ont été retenus pour évaluer leur effet combiné par la méthode du Checkerboard (FIC) sur les pathogènes ciblés et d'identifier ainsi la formulation antifongique optimale. Parmi 8 combinaisons testées, en se basant sur l'ensemble des mesures de FIC, la meilleure formulation antimicrobienne était celle qui combine l'extrait de citrus A avec l'HE de la cannelle. Cette combinaison présente la plus faible concentration d'inhibition de toutes les souches fongiques testées (625 ppm) avec 9 effets synergiques et un seul effet additif. Ces résultats prouvent que l'effet combiné produit marque une activité antifongique plus efficace que celle obtenue par chaque extrait seul à des concentrations réduites. D'après nos connaissances, l'effet synergique entre des extraits de citrus et l'HE de cannelle n'a pas été spécifiquement étudié.

Cependant, des chercheurs ont mis le point sur l'effet synergique de la combinaison de cinnamaldéhyde (phénylpropanoïde conjugué) et de citronellal (aldéhyde monoterpénique) par rapport à leur action individuelle sur l'inhibition de la croissance des moisissures vertes dans les agrumes (*Penicillium digitatum*). En effet, l'utilisation combinée de ces deux substrats (5:16 v/v) a accéléré les dommages de la paroi et la membrane cellulaire fongique (OuYang et al., 2020).

4.3 Mise au point d'une nanoémulsion antifongique

L'objectif de cette partie était de développer une nanoémulsion stable basée sur la formule sélectionnée en utilisant des émulsifiants appropriés. La lécithine Habo HHSL (HLB 7) et le Sucrose monopalmitate (HLB 18) ont été choisis pour être utilisés comme surfactant et co surfactant dans cette étude. La caractérisation physicochimique du potentiel-zêta, de la taille particulaire et du PDI des nanoémulsions testées à différents HLB (7, 10, 12 et 15) a permis de conclure que la nanoémulsion contenant 73% de lécithine et 27% de sucrose monopalmitate (HLB 10) était la plus stable pendant 15 jours d'entreposage à 4°C. Cette nanoémulsion a révélé un potentiel zêta de -37.5mv, une taille particulaire réduite de 79.2 nm et un système à dispersion homogène et constante (PDI = 0.2). Cette nanoémulsion a été considérée comme la formule efficace (F) pour optimiser, dans une deuxième partie, sa concentration appropriée avec le mélange d'émulsifiants (E). Les résultats ont révélé que, à partir d'un ratio Émulsifiant : Formulation de 0.75:1, la nanoémulsion présente une très bonne stabilité (potentiel zêta de -38.82 mV) avec une taille particulaire réduite (71.5 nm) dans un système dispersé homogène (PDI = 0.2). Ceci révèle que la présence majoritaire de lécithine dans les émulsions étudiées a permis de diminuer la tension interfaciale induisant des particules à faible tendance d'agrégation. En effet, les émulsifiants, en tant qu'agents tensioactifs, agissent en diminuant la tension interfaciale, réduisant ainsi la quantité d'énergie requise pour perturber les gouttelettes en formant d'autres particules de plus petite taille (Fathi Azarbayjani et al., 2009b). Aussi, la réduction de la taille des composés actifs incorporés dans une solution augmente la surface par unité de masse des nanoémulsions et améliore la bio-accessibilité des composés actifs encapsulés (Odriozola-Serrano et al., 2014). Bien que la stabilité s'améliore en augmentant la concentration de l'émulsifiant par rapport à celle de la formulation, le ratio 0.75:1 (HLB 10) à une concentration de 0.75 % d'émulsifiants et d'1% de formulation antimicrobienne a été sélectionnée pour les expériences ultérieures.

4.4 Mise au point d'une méthode d'encapsulation de la formulation antifongique optimisée

Un procédé de microencapsulation de la nanoémulsion sélectionnée (Émulsifiant : Formulation 0.75:1 p/p) avec Émulsifiant = Lécithine : Sucrose monopalmitate (73 :27 à HLB 10), à base des polymères Isolats de protéines de lactosérum : Maltodextrine (WPI : MD = 1 : 2 p/p) et (WPI : MD = 1 : 3 p/p) a été optimisé et caractérisé au niveau physico-chimique, microbiologique et rendement d'encapsulation. L'encapsulation de la formulation bioactive avec WPI : MD (1 : 3 p/p) dans des conditions de microfluidisation de 11500psi / 2 cycles a mené à un système plus stable (potentiel-zeta : -40.5 mV), plus homogène (PDI = 0.2), à taille particulaire plus réduite (115nm), et une meilleure efficacité d'encapsulation de 91% ayant une activité antifongique efficace à faible concentration (315ppm). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'effet du MD à fortes concentrations sur la conformation des protéines de lactosérum et par une plus grande exposition des résidus négatifs à la surface des protéines. Selon Pérez-Córdoba et al. (2018), des valeurs négatives de potentiel zêta supérieur au seuil de 30 mV améliorent la stabilité des émulsions face aux phénomènes de crémage et de floculation dus à la répulsion électrostatique entre les gouttelettes. Par conséquent, la diminution du potentiel zêta reflète une meilleure stabilité des nanoémulsions. Aussi, le processus de microfluidisation a montré un effet significatif sur l'induction d'interactions WPI-MD conduisant ainsi à l'amélioration de la capacité d'encapsulation des composés bioactifs. Almasi et al. (2020) ont constaté que que les complexes de polysaccharides protéiques peuvent fournir un EE plus élevé du matériau de base. Le processus d'encapsulation, induit par la microfluidisation, a également favorisé une amélioration importante de l'activité antifongique des nanoémulsions bioactives. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Wan et al. (2019) qui ont étudié l'effet des conditions d'homogénéisation à haute pression sur la stabilité et l'activité antifongique des nanoémulsions à base d'HE. Les résultats obtenus ont montré qu'une approche de procédé à haute pression telle que la microfluidisation avait la capacité de générer des forces perturbatrices intenses qui décomposent la phase huileuse en minuscules gouttelettes d'huile au cours du processus d'homogénéisation h/e. En particulier, la réduction de la taille des particules a apporté des propriétés fonctionnelles aux nanoémulsions en plus de leur plus grande stabilité. Tajkarimi et al. (2010) ont également signalé que la petite taille des gouttelettes de composés actifs incorporés dans les nanoémulsions à base d'HE stimulait leurs interactions avec les cellules fongiques et provoquait la mort de micro-organismes en raison de la plus grande solubilité dans l'eau de la nanoémulsions. Le suivi de l'effet de l'encapsulation sur le contenu antimicrobien disponible (libre et encapsulé) pendant le stockage a été établi via le modèle à puit profond- BHI –agar. Ceci a révélé que la microencapsulation de formulation antifongique développée a permis

de maintenir une quantité de composé bioactif capable d'agir contre *Paecilomyces* pendant 28 jours de stockage (4°C) contrairement à la formulation non-encapsulée (21 jours).

4.5 Mise au point d'un procédé de séchage par atomisation (spray drying ; SD) et caractérisation de la poudre développée

Un procédé de séchage par atomisation (spray-drying) de la formulation antimicrobienne a été réalisé. La poudre obtenue a été caractérisée (dosage des phénols totaux, analyse structurale – FTIR, efficacité d'encapsulation et stabilité à l'oxydation). Le procédé de séchage par atomisation a permis de conserver 75% des composés phénoliques de la formulation antifongique développée induisant à une bonne efficacité d'encapsulation de la formulation active totale (72.30%). Ceci montre que le séchage par atomisation était une technique satisfaisante et la contrainte thermique sur les polyphénols est mineure avec les conditions opératoires adaptées (Température d'entrée = 150°C ; Température de sortie = 90°C). La même observation a été rapportée par Fang and Bhandari. (2011) qui ont étudié l'effet du séchage par atomisation et du stockage sur la stabilité des polyphénols de baies. Ils ont trouvé que le jus de baies, séché par atomisation (Température d'entrée = 150°C ; Température de sortie = 80°C), en utilisant de la maltodextrine (DE 10) comme support a permis une rétention du contenu phénolique total élevé (96%). Aussi, la poudre développée a gardé une bonne stabilité à l'oxydation pendant 30 jours de stockage à 25°C et 60°C. Ces résultats ont prouvé que l'approche de séchage par atomisation appliquée n'a pas induit d'effet néfaste sur la peroxydation du composé actif de la formulation développée. En effet, la quantité d'huile présente à la surface des particules était faible, donc moins de contact avec l'oxygène, donc moins de sensibilité à l'oxydation grâce à l'encapsulation. Il a été rapporté que dans un système à base de protéines seules, la porosité de la matrice de paroi est élevée favorisant sa perméabilité à l'oxygène. Tandis que, l'utilisation d'un mélange de protéines et des glucides comme la MD à DE élevé affectent moins la porosité de la matrice de la paroi du système et améliore ainsi la stabilité à l'oxydation. Ceci peut être expliqué par le fait que l'oxygène est hydrophobe et que la présence d'un composé plus hydrophile (MD) pourrait réduire la perméabilité à l'oxygène de la matrice de la paroi (Bae and Lee, 2008 ; Dzondo-Gadet et al, 2005). L'analyse structurale de la formulation développée par FTIR a révélé que la présence d'agents bioactifs n'a pas affecté la structure des protéines et a induit une bonne stabilité du système d'encapsulation au niveau des interactions moléculaires. Hu et al. (2020) n'ont marqué aucun changement chimique apparent du CEO n'a pu être détecté par la méthode FTIR à la suite de la microencapsulation de l'HE de la cannelle par séchage par atomisation en utilisant une matrice d'encapsulation à base de WPI et MD.

4.6 Évaluations : sensorielle – microbiologique et physicochimique

4.6.1 Analyse sensorielle

Une analyse sensorielle de la mozzarella râpée traitée par la formulation antifongique en poudre a été établie. Le résultat a montré que le fromage traité avec la concentration la plus élevée de la poudre (3g /kg) était le moins accepté par le panel en termes d'odeur, de goût et d'appréciation globale. Ce traitement a induit un arrière-goût moins apprécié ainsi qu'une odeur un peu sucrée ce qui a réduit la note du produit. Ceci peut être associé à la présence des quantités élevées de l'huile essentielle de la cannelle dans le fromage. Ceci se corrèle avec les résultats de Faehrich et al. (2017) et Tornambé et al. (2008) qui ont notés une altération des propriétés sensorielles du fromage après l'ajout d'huiles essentielles uniquement à fortes doses. Cependant, le reste des concentrations utilisées étaient appréciées par les testeurs au niveau de l'ensemble des attributs sensoriels étudiés ($P \geq 0,05$). Les résultats ont suggéré qu'une concentration de poudre \leq à 2g/kg de fromage n'affecte pas les propriétés organoleptiques du fromage râpé. Celle-ci a été considérée pour étudier son activité antifongique par contact direct avec l'aliment via des tests *in situ*.

4.6.2 Analyse microbiologique

- Test de provocation

L'évaluation *in situ* de la capacité antifongique de la formulation en poudre appliquée sur de la mozzarella râpé par challenge test a donné que, à partir du jour 10 d'entreposage (4°C), la formulation développée (FP) a montré un effet inhibiteur similaire à la natamycine (FN) ($P \geq 0.05$) avec une réduction d'1 log spores/g. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'une libération d'une quantité suffisante en composé actif a eu lieu au jour 10 du stockage. Le comptage des moisissures présentes dans le fromage traité par FP et FN a atteint Log 0.9 CFU/g (pour FP) et Log 0.8 CFU/g (pour FN) au 56^{ème} jour d'entreposage (4°C). Ce résultat montre que la poudre antifongique développée peut réduire, d'une manière similaire, significativement ($P \leq 0,05$), les champignons de détérioration pendant le stockage de la mozzarella râpé. Plusieurs études ont prouvé l'effet de l'application de composés bioactifs naturels sur la réduction de la croissance fongique par la réduction des mycotoxines sur le fromage. Par exemple, Luz et al. (2019) ont étudié la prolongation de la durée de conservation du fromage mozzarella contaminé par *Penicillium spp.* en utilisant le composé antifongique naturel e-polylysine. Ils ont prouvé que l'utilisation d'e-polylysine a favorisé la durée de conservation de la mozzarella de 1 à 3 jours par rapport au contrôle.

- **Suivi de la durée de vie**

Le résultat du suivi de la durée de conservation de la mozzarella rapée traitée avec la formulation bioactive (FP) et avec du Natasseen (FN), scellée sous azote (SL) et sous air (SA), ont révélé que le dénombrement de la flore mésophile totale et des bactéries lactiques a été maintenu relativement stable par rapport au fromage témoin (non traité). Ce résultat était en accord avec celui de Felfoul et al. (2017) qui ont trouvé que la tendance de la croissance de la flore mésophile totale était similaire dans tous les échantillons du Mozzarella fraîche emballée sous cinq atmosphères modifiées (vide ; 40 % CO₂/60 % N₂ ; 60 % CO₂/40 % N₂ ; 100 % CO₂ et 100 % N₂). En effet, il a commencé par une légère baisse suivie d'une augmentation en semaine 4, puis, est resté relativement stable. Ils ont également constaté que les bactéries lactiques sont légèrement affectées sous les atmosphères modifiées et pouvaient bien se développer car les LAB sont de nature Gram positive anaérobie facultative ce qui corrèle avec les résultats de cette étude. Pour les groupes FP et FN, un début de croissance fongique a été noté au jour 35 dans l'emballage SA et au jour 56 dans l'emballage SL. Comparativement au contrôle, la croissance fongique a débuté au jour 21 et au jour 49 dans les emballages SA et SL, respectivement. Le résultat dû à l'utilisation de la natamycine était attendu, vu son succès, en tant que polyène antimycotique, connu dans la prévention de la croissance des levures et des moisissures sur les surfaces du fromage (Ramos et al., 2012). Cependant, comparativement à FP, la différence au niveau de la croissance des levures et moisissures avec le temps est non-significative pour les deux types d'emballage testés. Ceci confirme le rôle de l'effet antifongique de la formulation développée dans cette étude sur l'extension de la durée de vie de la Mozzarella râpée qui était similaire à celui de la natamycine. Dans ce contexte, Ramos et al. (2012) ont étudiés l'évaluation d'enrobages comestibles antimicrobiens à base d'isolat de protéines de lactosérum pour l'amélioration de la durée de conservation du fromage. En se comparant à la natamycine, ils ont noté que les fromages enrobés d'antimicrobiens n'ont pas montré de croissance de levures ou moisissures (< 100 ufc/g) pendant 60 jours de stockage à 10°C. La même observation a été trouvée par Fernandes et al. (2018) qui ont étudié l'effet de l'application de l'huile essentielle d'origan microencapsulée sur la conservation du parmesan râpé. Ils ont constaté que la croissance des levures et moisissures a été inhibée pendant 30 jours de stockage à 25°C.

4.6.3 Analyse physicochimique

- **Stabilité des couleurs**

Au cours de l'entreposage à 4°C de la mozzarella rapée traitée avec la formulation bioactive (FP) et avec du Natasseen (FN), scellée sous azote (SL) et sous air (SA), une décoloration progressive,

des échantillons a été notée à la suite de la diminution des valeurs de L^* et l'augmentation de a^* et b^* . Cette observation a été plus accélérée pour les emballages SA. Elle est probablement due à la migration des graisses vers la surface (Mei et al., 2015). La même observation a été remarquée par Trobetas et al. (2008) à la suite de leur étude qui porte sur les changements induits par la lumière dans du fromage à pâte dure Graviera râpé conservé sous lumière fluorescente à 4°C sous différents atmosphères modifiées (air ; 100% CO₂ ; 100% N₂ et 50% CO₂/50% N₂). Ils ont noté que la diminution de L^* peut être attribué à la décomposition des caroténoïdes induite par la lumière ainsi qu'à la décomposition de la riboflavine qui, agit comme un photosensibilisateur dans les réactions de photo-oxydation. La différence de couleur totale (ΔE) entre FN et FP est devenue de plus en plus significatives ($P < 0.05$) au cours de la durée de stockage avec une augmentation plus accélérée pour les fromages scellés sous air ($\Delta E = 6.6 \pm 0.6$; day 84). Ceci indique que, à ce niveau de suivi, le fromage ne demeure plus commercialement acceptable puisque ΔE est devenue supérieure à 5. D'après Minz and Saini. (2019), seulement une différence de couleur (ΔE) entre le colorimètre et le système de vision des couleurs inférieure à 5, peut être considérée comme un résultat commercialement acceptable.

- **Activité d'eau (a_w)**

Au cours de l'entreposage, le résultat du suivi de a_w de la mozzarella rapée traitée avec la formulation bioactive (FP) et avec du Natasseen (FN), scellée sous azote (SL) et sous air (SA), a montré une augmentation significative pour tous les échantillons étudiés, mais plus accélérée pour SA. Ceci reflète que la présence d'air dans les sacs d'emballage, contrairement au N₂, accélère l'augmentation de l'eau libre de la mozzarella. Cependant l'activité d'eau de FN et FP n'a pas montré une différence significative/jour pour les deux types d'emballage. Ceci peut être expliqué par le fait que la présence d'O₂ favorise l'absorption d'eau par les protéines induisant ainsi le vieillissement du produit en question. Dans ce contexte, Kuo et al. (2001) ont noté qu'au fur et à mesure que l'eau migre dans la matrice protéique au cours du vieillissement, les protéines absorbent plus d'eau, ainsi la sphère d'hydratation des protéines augmente pour accueillir les molécules d'eau supplémentaires. Dans le fromage mozzarella, le réseau de protéines pourrait être formé de la même manière que le réseau d'amidon dans d'autres produits. Les molécules d'eau participent à la construction des nœuds du réseau de biopolymères (Baranowska et al., 2017).

CHAPITRE 5 : CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif principal du projet était de développer une formulation antifongique complexe à base d'additifs d'origines naturels aussi efficace que la natamycine et de mettre au point un procédé d'encapsulation afin que les propriétés organoleptiques du fromage râpé soient préservées, et l'exigence des consommateurs pour des produits " étiquette épurée " sera respecté.

Afin d'y arriver, il a fallu dans une première partie de nos travaux de faire des tests de screening *in vitro* des composés naturels ayant les meilleures propriétés antifongiques et les mesures d'effets synergiques ont permis de déterminer la meilleure formulation antimicrobienne à base d'un mélange d'extrait de citrus A et d'HE de la cannelle .La formulation choisie a été stabilisée en utilisant un mélange Lécithine : Sucrose monopalmitate (73:27, HLB 10) comme émulsifiant avec un ratio Émulsifiant : Formulation de 0.75 :1 menant ainsi à un système monodispersé (PDI = 0.2), de taille de particules nanométrique (71.5 nm) et démontrant une bonne stabilité (potentiel zêta de -38.82 mV) pendant 15 jours d'entreposage à 4°C.

Dans la 2ème partie de nos travaux, cette nanoémulsion a été encapsulée avec un mélange WPI : MD (1 :3). En particulier, l'efficacité du procédé de microfluidisation a été démontrée à une pression et un nombre de cycles relativement faibles (11,500 psis ; 2 cycles) afin de produire une nanoémulsion encapsulée stable (potentiel zêta de -40.5 mV) ayant une taille de gouttelettes réduites (115 nm) dans un système homogène monodispersé (0.2). La matrice WPI : MD (1 :3) a également montré une efficacité d'encapsulation de 91% ainsi qu'un grand pouvoir inhibiteur des souches fongiques évaluées à des faibles concentrations inhibitrices (315 ppm). La microencapsulation de formulation antifongique développée a permis de maintenir une quantité de composé bioactif capable d'agir contre *Paecilomyces*. spp pendant 28 jours de stockage (4°C) contrairement à la formulation non-encapsulée (21 jours).

Dans une 3ème partie de nos travaux, un procédé de séchage par atomisation (spray-drying) de la formulation antimicrobienne a été réalisé. Celui-ci a favorisé la conservation de 75% des composés phénoliques dans la poudre résultante et a induit à une efficacité d'encapsulation de 72.30%. La poudre développée a gardé une bonne stabilité à l'oxydation pendant 30 jours de stockage à 25°C et 60°C. L'analyse structurale de la formulation développée par FTIR a révélé que la présence d'agents bioactifs n'a pas affecté la structure des protéines et a induit une bonne stabilité du système d'encapsulation au niveau des interactions moléculaires. L'analyse sensorielle des Mozzarellas traités par la poudre développée a révélé que l'utilisation d'une concentration $\leq 2\text{g/kg}$ était apprécié par les testeurs par rapport au contrôle.

Finalement, L'évaluation *in situ* de sa capacité antifongique sur de la mozzarella râpée par test de provocation a montré que, la formulation développée avait un effet inhibiteur similaire à la natamycine (réduction de Log 3.4 CFU/g au 56ème jour d'entreposage à 4°C). Le suivi de la durée de vie de la mozzarella râpée, traitée par la formulation développée et par la natamycine, scellé sous azote et sous air, a révélé que, le dénombrement de la flore mésophile totale et des bactéries lactiques a été maintenu relativement stable par rapport au fromage témoin (non traité). Pour les groupes FP et FN, un début de croissance fongique a été noté au jour 35 dans l'emballage SA et au jour 56 dans l'emballage SL. Comparativement au contrôle, la croissance fongique a débuté au jour 21 et au jour 49 dans les emballages SA et SL.

À l'issue de ces résultats, la formulation développée démontre un potentiel de son application comme alternative à la natamycine pour la conservation de la qualité du fromage. Son développement ainsi que la mise au point de méthodes de stabilisation par microencapsulation, assurent le développement de nouvelles technologies novatrices et l'application de la démarche " étiquette épurée " dans le secteur des fromages affinés. Le remplacement de la natamycine par cette formule répond à une demande importante des consommateurs pour des aliments sains, sans additifs nuisibles à la santé, mais il s'intègre aussi comme une solution pour lutter contre les micro-organismes pathogènes et de détérioration qui sont de plus en plus résistants aux antibiotiques. Ceci favorise le bien-être social et permet aux fabricants de fromages du Québec de se positionner avantageusement sur le marché international des produits naturels.

Comme perspectives, il sera intéressant de tester la formulation sur d'autres produits laitiers afin d'évaluer son pouvoir d'adhésion avec différentes matrices sans pouvoir altérer les qualités organoleptiques des produits. Un travail d'optimisation de la concentration à appliquer, qui sera effective sur les plans sensoriels et *in situ* à la fois, est bien évidemment requis. Il sera également important de faire des analyses complémentaires en termes d'évaluation de la toxicité à titre d'exemple afin de s'assurer de l'effet de son utilisation à long terme et donc de mieux la classer comme formulation antifongique conviviale qui répond aux exigences de la réglementation fédérale.

6. BIBLIOGRAPHIE

Abbas, S., Hayat, K., Karangwa, E., Bashari, M., Zhang, X., (2013). An Overview of Ultrasound Assisted Food-Grade Nanoemulsions. *Journal of Food Engineering Rev* 5, 139–157. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9066-3>

Adetunji, V. O., Olaoye, O. O., (2013). Fungicidal effect of bacteriocins harvested from *Bacillus* spp. *McGill Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.21161/mjm.41412>

Ahmad, A., Khan, A., Manzoor, N., (2013). Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.09.016>

Almasi, H., Azizi, S., Amjadi, S., (2020). Development and characterization of pectin films activated by nanoemulsion and Pickering emulsion stabilized marjoram (*Origanum majorana* L.) essential oil. *Food Hydrocolloids* 99, 105338. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105338>

Anandaraman, S., Reineccius, G.A., (1986). Stability of encapsulated orange peel oil. *Food technology (USA)* 40, 88-93.

Anna K Jager, S.H.F., (2014). Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review. *Med Aromat Plants* 03. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000154>

Arboatti, A.S., Olivares, M.L., Sabbag, N.G., Costa, S.C., Zorrilla, S.E., Sihufe, G.A., (2014). The influence of sodium chloride reduction on physicochemical, biochemical, rheological and sensory characteristics of Mozzarella cheese. *Dairy Science & Technology* 94, 373–386. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0169-2>

Asmawati, Mustapha, W.A.W., Yusop, S.M., Maskat, M.Y., Shamsuddin, A.F., (2014). Characteristics of cinnamaldehyde nanoemulsion prepared using APV-high pressure homogenizer and ultra turrax. *AIP Conference Proceedings* 1614, 244–250. <https://doi.org/10.1063/1.4895203>

Bae, E.K., Lee, S.J., (2008). Microencapsulation of avocado oil by spray drying using whey protein and maltodextrin. *Journal of Microencapsulation* 25, 549–560. <https://doi.org/10.1080/02652040802075682>

Bagheri, L., Khlifi, M., Maherani, B., Salmieri, S., Lacroix, M., (2020). Thermosensitization enhancement of *A. niger*, *S. cerevisiae*, and *L. fructivorans* using combination of mild heat

treatment with nanoemulsion-based mediterranean formulation to fabricate wholesome orange juice. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 123, 109094. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109094>

Bai, L., Huan, S., Gu, J., McClements, D.J., (2016). Fabrication of oil-in-water nanoemulsions by dual-channel microfluidization using natural emulsifiers: Saponins, phospholipids, proteins, and polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 61, 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.035>

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D., Idaomar, M., (2006). Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 606, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.005>

Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., Liang, L., (2016). Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications: Encapsulation of marine, vegetable, essential oils. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety* 15, 143–182. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12179>

Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adams, H.E., (2015). Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *International Journal of Current Microbiology*, 70, 792–800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>

Baranowska, H.M., Tomaszewska-Gras, J., Cais-Sokolińska, D., Bierzuńska, P., Kaczyński, Ł.K., (2017). Water mobility and thermal properties of smoked soft cheese. *Mljekarstvo Časopis Za Unaprjeđenje Proizv. Prerade Mlijeka*, 67, 188–196. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2017.0303>

Barthe, C., Centre quebecois d'inspection des aliments et de santé animale, Laboratoires d'expertises et d'analyses alimentaires, (2006). Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire. Agriculture, pecheries et alimentation Quebec, *Direction du laboratoire d'expertises et d'analyses alimentaires: Centre quebecois d'inspection des aliments et de santé animale, Quebec*. <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/recueil.pdf> ; ISBN 978-2-550-84613-0

Basilico, J.C., deBasilico, M.Z., Chiericatti, C., Vinderola, C.G., (2001). Characterization and control of thread mould in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 32, 419–423. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00934.x>

Ben-Fadhel, Y., Cingolani, M.C., Li, L., Chazot, G., Salmieri, S., Horak, C., Lacroix, M., (2021). Effect of γ -irradiation and the use of combined treatments with edible bioactive coating on carrot

preservation. *Food Packaging and Shelf Life* 28, 100635.
<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100635>

Ben-Fadhel, Y., Maherani, B., Aragones, M., Lacroix, M., (2019). Antimicrobial Properties of Encapsulated Antimicrobial Natural Plant Products for Ready-to-Eat Carrots. *Foods* 8, 535.
<https://doi.org/10.3390/foods8110535>

Ben-Fadhel, Y., Saltaji, S., Khlifi, M.A., Salmieri, S., Dang Vu, K., Lacroix, M., (2017). Active edible coating and γ -irradiation as cold combined treatments to assure the safety of broccoli florets (*Brassica oleracea* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 241, 30–38.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.010>

Bhandari, B.R., Dumoulin, E.D., Richard, H.M.J., Noleau, I., Lebert, A.M., (1992). Flavor Encapsulation by Spray Drying: Application to Citral and Linalyl Acetate. *Journal of Food Science* 57, 217–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1992.tb05459.x>

Boniface, Y., Philippe, S., de Lima, H.R., Pierre, N.J., Alain, A.G., Fatiou, T., Dominique, S., (2012). Chemical composition and antimicrobial activities of *Cinnamomum zeylanicum* Blume dry Leaves essential oil against Food-borne Pathogens and Adulterated Microorganisms. *International Research Journal of Biological Sciences*, Vol. 1(6), 18-25.
<https://www.researchgate.net/publication/233791183>; ISSN 2278-3202

Botrel, D.A., Fernandes, R.V. de B., Borges, S.V., (2015). Microencapsulation of Essential Oils Using Spray Drying Technology, in: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications*. Elsevier, pp. 235–251. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00013-3>

Branch, L.S., (2022). Consolidated federal laws of Canada, Food and Drug Regulations. https://laws-lois.justice.gc.ca/eng/regulations/C.R.C.,_c._870/section-B.08.034.html (accessed 6.27.22).

Caillet, S., Salmiéri, S., Lacroix, M., (2006). Evaluation of free radical-scavenging properties of commercial grape phenol extracts by a fast colorimetric method. *Food Chemistry* 95, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.011>

Çakır, İ., (2010). Antibacterial and antifungal activities of some lactic acid bacteria isolated from naturally fermented herbs.
<https://www.researchgate.net/publication/283159530> *Antibacterial and antifungal activities o*
some_lactic_acid_bacteria_isolated_from_naturally_fermented_herbs (Consulté le 30 aout 2021).

Calligaris, S., Manzocco, L., Kravina, G., Nicoli, M.C., (2007). Shelf-life Modeling of Bakery Products by Using Oxidation Indices. *J. Agric. Journal of Food Chemistry*, 55, 2004–2009. <https://doi.org/10.1021/jf063004h>

Centre canadien d'information laitière (CCIL), (2019). Code national sur les produits laitiers. https://www.dairyinfo.gc.ca/index_f.php?s1=dr-rl&s2=canada&s3=ndc-cnpl&s4=05-2005. (Consulté le 07 septembre 2020).

Santé Canada, (2021). Archivée 11- Liste des agents de conservation autorisés. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/additifs-alimentaires/listes-autorises/11-conservation/archivees-009.html> (Consulté le 25 aout 2021).

Santé Canada, (2014). Décision d'homologation RD2014-07, Natamycine. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/securite-produits-consommation/rapports-publications/pesticides-lutte-antiparasitaire/decisions-mises-jour/decision-homologation/2014/natamycine-rd2014-07.html> (Consulté le 07 mai 2019).

Santé Canada, (2006). Archivée 1-Liste des agents antiagglomérants autorisés. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/aliments-nutrition/salubrite-aliments/additifs-alimentaires/listes-autorises/1-agents-antiagglomerants-2020-08-06.html> (Consulté le 29 aout 2021)

Cardoso-Ugarte, G.A., López-Malo, A., Jiménez-Munguía, M.T., (2016). Application of nanoemulsion technology for encapsulation and release of lipophilic bioactive compounds in food, in: *Emulsions*. Elsevier, pp. 227–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804306-6.00007-6>

Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D., (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033>

Chen, C.-C., Wagner, G., (2004). Vitamin E Nanoparticle for Beverage Applications. *Chemical Engineering Research and Design* 82, 1432–1437. <https://doi.org/10.1205/cerd.82.11.1432.52034>

Cheong, E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielehner, J., Bansal, N., Turner, M.S., (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>

- Chung, T.C., Axelsson, L., Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., (1989). *In Vitro* Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 137–144. <https://doi.org/10.3109/08910608909140211>
- Dai, S., Jiang, F., Corke, H., Shah, N.P., (2018). Physicochemical and textural properties of mozzarella cheese made with konjac glucomannan as a fat replacer. *Food Research International*, 107, 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.069>
- Dang Vu, K., Salmieri, S., Rosa, A.-U.B., Lacroix, M., (2017). Evaluation of Bioconversion Conditions on Reuterin Production Using Response Surface Methodology and *Listeria Monocytogenes* as Target Bacteria. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6, 1007–1011. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.4.1007-1011>
- Davidson, P., Naidu, A., (2000). Phyto-phenols, in: Natural Food Antimicrobial Systems. *Journal of Food Science and Technology*. pp265–294. doi: 10.1007/s13197-011-0275-6
- De Vuyst, L., Leroy, F., (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 194–199. <https://doi.org/10.1159/000104752>
- Donsì, F., Annunziata, M., Vincensi, M., Ferrari, G., (2012a). Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: Effect of the emulsifier. *Journal of Biotechnology* 159, 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.07.001>
- Donsì, F., Cuomo, A., Marchese, E., Ferrari, G., (2014). Infusion of essential oils for food stabilization: Unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 22, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.01.008>
- Donsì, F., Ferrari, G., (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology* 233, 106–120. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.005>
- Donsì, F., Sessa, M., Ferrari, G., (2013). Nanometric-Size Delivery Systems for Bioactive Compounds for the Nutraceutical and Food Industries, in: Bagchi, D., Bagchi, M., Moriyama, H., Shahidi, F. (Eds.), *Bio-Nanotechnology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 619–666. <https://doi.org/10.1002/9781118451915.ch37>
- Donsì, F., Sessa, M., Ferrari, G., (2012b). Effect of Emulsifier Type and Disruption Chamber Geometry on the Fabrication of Food Nanoemulsions by High Pressure Homogenization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 51, 7606–7618. <https://doi.org/10.1021/ie2017898>

Dzondo-Gadet, M., Nzikou, J.M., Etoumoungou, A., Linder, M., Desobry, S., (2005). Encapsulation and storage of safou pulp oil in 6DE maltodextrins. *Process Biochemistry* 40, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.013>

Eliot, S.C., Vuilleumard, J.-C., Emond, J.-P., (2006). Stability of Shredded Mozzarella Cheese Under Modified Atmospheres. *Journal of Food Science* 63, 1075–1080. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15858.x>

Emma Bedford, (2021). Cheese market in Canada. Statista, URL <https://www.statista.com/topics/4202/cheese-market-in-canada/> (accessed 7.18.21).

Ersus, S., Yurdagel, U., (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.009>

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (2021). Retracted: Essential Oils Loaded in Nanosystems: A Developing Strategy for a Successful Therapeutic Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 1–1. <https://doi.org/10.1155/2021/7259208>

Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamakrishnan, C., (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. *Food Bioprocess Technology* 6, 628–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0944-0>

Faehnrich, B., Chizzola, R., Schabauer, A., Pracser, N., Duerschmid, K., (2017). Volatiles in dairy products after supplementation of essential oils in the diet of cows and influence on taste of cheese. *European Food Research and Technology*, 243, 1783–1797. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2883-5>

Fang, Z., Bhandari, B., (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry* 129, 1139–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.093>

Faridi Esfanjani, A., Jafari, S.M., Assadpour, E., (2017). Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry* 221, 1962–1969. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.149>

Fathi Azarbayjani, A., Jouyban, A., Chan, S., (2009b). Impact of Surface Tension in Pharmaceutical Sciences. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences* 12, 218–28. <https://doi.org/10.18433/J32P40>

Felfoul, I., Attia, H., Bornaz, S., (2017). Shelf-Life Determination of Fresh Cheese Subjected to Different Modified Atmospheres Packaging. *Journal of Agricultural Science and Technology*, Vol. 19: 847-860. DOR: 20.1001.1.16807073.2017.19.4.13.4

Fernandes, R.V. de B., Silva, E.K., Borges, S.V., de Oliveira, C.R., Yoshida, M.I., da Silva, Y.F., do Carmo, E.L., Azevedo, V.M., Botrel, D.A., (2017). Proposing Novel Encapsulating Matrices for Spray-Dried Ginger Essential Oil from the Whey Protein Isolate-Inulin/Maltodextrin Blends. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 115–130. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1803-1>

Fernandes, R.V.B., Botrel, D., Monteiro, P.S., Borges, S.V., Souza, A., Mendes, L.E.S., (2018). Microencapsulated oregano essential oil in grated Parmesan cheese conservation. *International Food Research Journal*, 25, 661–669. <https://www.researchgate.net/publication/325755380>

Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M.N., Dumoulin, E., (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering* 75, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.047>

Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>

Geranpour, M., Assadpour, E., Jafari, S.M., (2020). Recent advances in the spray drying encapsulation of essential fatty acids and functional oils. *Trends in Food Science & Technology* 102, 71–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.028>

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International* 40, 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Gaya, P., Garde, S., (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. *Food Microbiology* 42, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.018>

Gupta, A., Eral, H.B., Hatton, T.A., Doyle, P.S., (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter* 12, 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>

- Hammer, K.A., (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53, 1081–1085. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh243>
- Han, J.H., Patel, D., Kim, J.E., Min, S.C., (2014). Retardation of *Listeria Monocytogenes* Growth in Mozzarella Cheese Using Antimicrobial Sachets Containing Rosemary Oil and Thyme Oil: Antimicrobial sachets of essential oils. *Journal of Food Science*, 79, E2272–E2278. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12659>
- Hassan, R., El-Kadi, S., Sand, M., (2015). Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. *International Journal of Advances in Biology* 2, 12.
- Hossain, F., Follett, P., Dang Vu, K., Harich, M., Salmieri, S., Lacroix, M., (2016). Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food Microbiology* 53, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.006>
- Hossain, F., Follett, P., Salmieri, S., Vu, K.D., Harich, M., Lacroix, M., (2019). Synergistic Effects of Nanocomposite Films Containing Essential Oil Nanoemulsions in Combination with Ionizing Radiation for Control of Rice Weevil *Sitophilus oryzae* in Stored Grains. *Journal of Food Science*, 84, 1439–1446. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14603>
- Hossain, F., Follett, P., Vu, K.D., Salmieri, S., Senoussi, C., Lacroix, M., (2014). Radiosensitization of *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum* using basil essential oil and ionizing radiation for food decontamination. *Food Control* 45, 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.022>
- Hou, P., Pu, F., Zou, H., Diao, M., Zhao, C., Xi, C., Zhang, T., (2019). Whey protein stabilized nanoemulsion: A potential delivery system for ginsenoside Rg3 whey protein stabilized nanoemulsion: Potential Rg3 delivery system. *Food Bioscience*, 31, 100427. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100427>
- Hu, Q., Li, X., Chen, F., Wan, R., Yu, C., Li, J., McClements, D.J., Deng, Z., (2020). Microencapsulation of an essential oil (cinnamon oil) by spray drying: Effects of wall materials and storage conditions on microcapsule properties. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14805>
- Huang, F., Kong, J., Ju, J., Zhang, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., Xie, Y., Yao, W., (2019). Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). *Scientific Reports*, 9, 490. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36989-7>

- Huq, T., Riedl, B., Bouchard, J., Salmieri, S., Lacroix, M., (2014). Microencapsulation of nisin in alginate-cellulose nanocrystal (CNC) microbeads for prolonged efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Cellulose* 21, 4309–4321. <https://doi.org/10.1007/s10570-014-0432-y>
- Huq, T., Vu, K.D., Riedl, B., Bouchard, J., Lacroix, M., (2015). Synergistic effect of gamma (γ)-irradiation and microencapsulated antimicrobials against *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) meat. *Food Microbiology*, 46, 507–514. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.013>
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., Coton, E., (2014). Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review: Filamentous fungi and mycotoxins in cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 437–456. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., (2008). Encapsulation Efficiency of Food Flavours and Oils during Spray Drying. *Drying Technology* 26, 816–835. <https://doi.org/10.1080/07373930802135972>
- Jafari, S.M., He, Y., Bhandari, B., (2007). Optimization of nano-emulsions production by microfluidization. *European Food Research and Technology* 225, 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0476-9>
- Jaiswal, M., Dudhe, R., Sharma, P.K., (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech* 5, 123–127. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0214-0>
- Jeon, Y.-J., Vasanthan, T., Temelli, F., Song, B.-K., (2003). The suitability of barley and corn starches in their native and chemically modified forms for volatile meat flavor encapsulation. *Food Research International* 36, 349–355. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00226-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00226-0)
- Jia, Z., Dumont, M.-J., Orsat, V., (2016). Encapsulation of phenolic compounds present in plants using protein matrices. *Food Bioscience* 15, 87–104. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.05.007>
- Juneja, V.K., Dwivedi, H.P., Yan, X., (2012). Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 381–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101241>
- Kaci, M., Arab-Tehrany, E., Dostert, G., Desjardins, I., Velot, E., Desobry, S., (2016). Efficiency of emulsifier-free emulsions and emulsions containing rapeseed lecithin as delivery systems for vectorization and release of coenzyme Q10: physico-chemical properties and in vitro evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 147, 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.036>

Kallinteri, L.D., Kostoula, O.K., Savva, I.N., (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. *Food Microbiology*, 36, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.006>

Karrar, E., Mahdi, A.A., Sheth, S., Mohamed Ahmed, I.A., Manzoor, M.F., Wei, W., Wang, X., (2021). Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on the microencapsulation of gurun seed oil using a spray-drying method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.045>

Kenyon, M.M., Anderson, R.J., (1988). Maltodextrins and Low-Dextrose-Equivalence Corn Syrup Solids 5. *Flavor encapsulation* Chapter 2pp 7-11. DOI: 10.1021/bk-1988-0370.ch002

King, W., Perry, P., Benckiser J.A., (1976). Modified starch encapsulating agents offer superior emulsification, film forming, and low surface oil [Incorporation into dry food systems]. *Food Product Development* p. 54, 56-57.

Kostov, G., Shopka, V., Denkova, R., Ivanova, M., Balabanova, T., Vlaseva, R., (2016). Encapsulation of plant and animal oils used in dairy industry: A review. *Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology* 20, 21–40. <https://doi.org/10.1515/auaft-2016-0002>

Kumar, H., Kumar, V., (2018). Ultrasonication assisted formation and stability of water-in-oil nanoemulsions: Optimization and ternary diagram analysis. *Ultrasonics Sonochemistry* 49, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.022>

Kuo, M.-I., Gunasekaran, S., Johnson, M., Chen, C., (2001). Nuclear Magnetic Resonance Study of Water Mobility in Pasta Filata and Non-Pasta Filata Mozzarella. *Journal of Dairy Science* 84, 1950–1958. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74637-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74637-1)

Lavanya, M.N., Kathiravan, T., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C., (2020). Influence of spray-drying conditions on microencapsulation of fish oil and chia oil. *Drying Technology*, 38, 279–292. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1553181>

Leclercq-Perlat, M.-N., Sicard, M., Trelea, I.C., Picque, D., Corrieu, G., (2012). Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 95, 4666–4682. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5368>

Luz, C., Torrijos, R., Quiles, J., Mañes, J., Meca, G., (2019). Shelf-life extension of mozzarella cheese contaminated with *Penicillium* spp. using the antifungal compound ϵ -polylysine. *Food Science and Technology International*, 25, 295–302. <https://doi.org/10.1177/1082013218823136>

- Maali, A., Mosavian, M.T.H., (2013). Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). *Journal of Dispersion Science and Technology* 34, 92–105. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- Macedo, J.P.F., Fernandes, L.L., Formiga, F.R., Reis, M.F., Nagashima Júnior, T., Soares, L.A.L., Egito, E.S.T., (2006). Micro-emultocrit technique: A valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech* 7, E146–E152. <https://doi.org/10.1208/pt070121>
- Maherani, B., Khlifi, M.A., Salmieri, S., Lacroix, M., (2018). Design of biosystems to provide healthy and safe food. Part A: effect of emulsifier and preparation technique on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *European Food Research and Technology* 244, 1963–1975. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3108-2>
- Maherani, B., Khlifi, M.A., Salmieri, S., Lacroix, M., (2019). Design of biosystems to provide healthy and safe food—part B: effect on microbial flora and sensory quality of orange juice. *European Food Research and Technology*, 245, 581–591. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-03228-2>
- Maherani, B., Harich, M., Salmieri, S., Lacroix, M., (2018a). Comparative evaluation of antimicrobial efficiency of FOODGARD F410B citrus extract and sodium benzoate against foodborne pathogens in strawberry filling. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, e13549. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13549>
- Mahfoudhi, N., Sessa, M., Chouaibi, M., Ferrari, G., Donsì, F., Hamdi, S., (2014). Assessment of emulsifying ability of almond gum in comparison with gum arabic using response surface methodology. *Food Hydrocolloids* 37, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.009>
- Kahina Maya Makhloufi, (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Bactériologie. Université Pierre et Marie Curie – Paris. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00678029> (Consulté le 11 janvier 2022).
- Mani-López, E., Palou, E., López-Malo, A., (2016). Preservatives: Classifications and Analysis, in: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 497–504. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00567-5>.
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, R635–R666. <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>

- McClements, D.J., Jafari, S.M., (2018). Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 251, 55–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.001>
- McClements, D.J., Rao, J., (2011). Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- McNamee, B.F., O’Riorda, E.D., O’Sullivan, M., (1998). Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4551–4555. <https://doi.org/10.1021/jf9803740>
- Mei, J., Guo, Q., Wu, Y., Li, Y., (2015). Evaluation of Chitosan-Starch–Based Edible Coating to Improve the Shelf Life of Bod Ljong Cheese. *Journal of Food Protection* 78, 1327–1334. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-402>
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D., Lacroix, M., (2007). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 102, 274–282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03044.x>
- Minemoto, Y., Fang, X., Hakamata, K., Watanabe, Y., Adachi, S., Kometani, T., Matsuno, R., (2002). Oxidation of Linoleic Acid Encapsulated with Soluble Soybean Polysaccharide by Spray-drying. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66, 1829–1834. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1829>
- Minz, P.S., Saini, C.S., (2019). Evaluation of RGB cube calibration framework and effect of calibration charts on color measurement of mozzarella cheese. *Food Measure* 13, 1537–1546. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00069-9>
- Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, (2012). Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.5897/AJPP10.004>
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., del Valle, C.E., Roura, S.I., (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT - Food Science and Technology* 38, 565–570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>
- Muñoz Castellanos, L., Amaya Olivas, N., Ayala-Soto, J., De La O Contreras, C.M., Zermeño Ortega, M., Sandoval Salas, F., Hernández-Ochoa, L., (2020). In Vitro and In Vivo Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and

Functional Extracts against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *International Journal of Microbiology* 2020, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2020/1702037>

Murugesan, R., Orsat, V., (2012). Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review. *Food Bioprocess Technology* 5, 3–14. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0638-z>

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., Feo, V.D., (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals* 10, 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>

Oberg, C.J., Wang, A., Moyes, L.V., Brown, R.J., Richardson, G.H., (1991). Effects of Proteolytic Activity of Thermolactic Cultures on Physical Properties of Mozzarella Cheese. *Journal of Dairy Science*, 74, 389–397. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78180-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78180-0)

Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Martin-Belloso, O., (2014). Nanoemulsion-Based Delivery Systems to Improve Functionality of Lipophilic Components. *Frontiers in Nutrition*, 1, 24. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00024>

OuYang, Q., Okwong, R.O., Chen, Y., Tao, N., (2020). Synergistic activity of cinnamaldehyde and citronellal against green mold in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 162, 111095. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.111095>

Ozturk, B., McClements, D.J., (2016). Progress in natural emulsifiers for utilization in food emulsions. *Current Opinion in Food Science* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.008>

Pei, J., Li, X., Han, H., Tao, Y., (2018). Purification and characterization of plantaricin SLG1, a novel bacteriocin produced by *Lb. plantarum* isolated from yak cheese. *Food Control* 84, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.07.034>

Pérez-Córdoba, L.J., Norton, I.T., Batchelor, H.K., Gkatzionis, K., Spyropoulos, F., Sobral, P.J.A., (2018). Physico-chemical, antimicrobial and antioxidant properties of gelatin-chitosan based films loaded with nanoemulsions encapsulating active compounds. *Food Hydrocolloids*, 79, 544–559. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.12.012>

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58, 1454–1462. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>

Pongtharangkul, T., Demirci, A., (2004). Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1579-5>

- Porras, M., Solans, C., González, C., Martínez, A., Guinart, A., Gutiérrez, J.M., (2004). Studies of formation of W/O nano-emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 249, 115–118. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.08.060>
- Q. Lüthi-Peng, S. Schärer, Z. Puhanz., (2002). Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60, 73–80. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1099-0>
- Quattrini, M., Liang, N., Fortina, M.G., Xiang, S., Curtis, J.M., Gänzle, M., (2019). Exploiting synergies of sourdough and antifungal organic acids to delay fungal spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology* 302, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.007>
- Ramos, Ó.L., Pereira, J.O., Silva, S.I., Fernandes, J.C., Franco, M.I., Lopes-da-Silva, J.A., Pintado, M.E., Malcata, F.X., (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *Journal of Dairy Science* 95, 6282–6292. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5478>
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., Barat, J.M., Ferrari, G., Donsì, F., (2017). Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against *Aspergillus niger*. *Food Control* 73, 784–795. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.044>
- Salvia-Trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O., McClements, D.J., (2013). Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141, 1472–1480. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.050>
- Sassi, G., Salmieri, S., Allahdad, Z., Karboune, S., Lacroix, M., (2022). Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend. *Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16273>
- Schmidt, M., Lynch, K.M., Zannini, E., Arendt, E.K., (2018). Fundamental study on the improvement of the antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* R29 through increased production of phenyllactic acid and reuterin. *Food Control* 88, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.041>
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., Ulrich, J., (2004). High-Pressure Homogenization as a Process for Emulsion Formation. *Chemical Engineering & Technology*, 27, 361–368. <https://doi.org/10.1002/ceat.200406111>

Services publics et Approvisionnement Canada, (2002). Cheese and cheese products = Fromage et produits de fromage. : P29-5-032-172-1988-PDF - Publications du gouvernement du Canada. <https://publications.gc.ca/site/fra/9.841815/publication.html> (Consulté le 26 aout 2021).

Sessa, M., Balestrieri, M.L., Ferrari, G., Servillo, L., Castaldo, D., D'Onofrio, N., Donsì, F., Tsao, R., (2014). Bioavailability of encapsulated resveratrol into nanoemulsion-based delivery systems. *Food Chemistry* 147, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.088>

Sessa, M., Donsì, F., (2015). Nanoemulsion-Based Delivery Systems, in: Microencapsulation and Microspheres for Food Applications. *Elsevier*, pp. 79–94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800350-3.00007-8>

Sessa, M., Tsao, R., Liu, R., Ferrari, G., Donsì, F., (2011). Evaluation of the Stability and Antioxidant Activity of Nanoencapsulated Resveratrol during in Vitro Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12352–12360. <https://doi.org/10.1021/jf2031346>

Shah, B., Davidson, P.M., Zhong, Q., (2012). Encapsulation of eugenol using Maillard-type conjugates to form transparent and heat stable nanoscale dispersions. *LWT* 49, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.04.029>

Sharma, N., Tripathi, A., (2008). Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research* 163, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>

Shehata, M.G., Badr, A.N., Sohaimy, S.A.E., (2018). Novel antifungal bacteriocin from lactobacillus paracasei KC39 with anti-mycotoxigenic properties. *Bioscience research*, 2018 15(4):4171-4183.

Shibamoto, T., Bjeldanes, L.F., (1993). Chapter 9 - Food Additives, in: Shibamoto, T., Bjeldanes, L.F. (Eds.), *Introduction to Food Toxicology, Food Science and Technology*. Academic Press, San Diego, pp. 157–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092577-6.50014-9>

Silva, H.D., Cerqueira, M.Â., Vicente, A.A., (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. *Food Bioprocess Technology* 5, 854–867. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0683-7>

Solans, C., Solé, I., (2012). Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17, 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.003>

Sonu, K.S., Mann, B., Sharma, R., Kumar, R., Singh, R., (2018). Physico-chemical and antimicrobial properties of d-limonene oil nanoemulsion stabilized by whey protein–maltodextrin

conjugates. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 2749–2757. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3198-7>

Soottitantawat, A., Bigeard, F., Yoshii, H., Furuta, T., Ohkawara, M., Linko, P., (2005). Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated d-limonene by spray drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 6, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.09.003>

Stéphanie Keable, (2021). Bioclips actualité bioalimentaire. https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Bioclips/BioClips2021/Volume_29_no1.pdf. (Consulté le 23 mars 2019).

Sun, Q., Li, J., Sun, Y., Chen, Q., Zhang, L., Le, T., (2020). The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food Chemistry*, 317, 126405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126405>

Tabibiazar, M., Hamishehkar, H., (2015). Formulation of a Food Grade Water-In-Oil Nanoemulsion: Factors Affecting on Stability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 21, 220–224. <https://doi.org/10.15171/PS.2015.40>

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control* 21, 1199–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>

Tastan, Ö., Ferrari, G., Baysal, T., Donsì, F., (2016). Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions. *Food Hydrocolloids* 61, 756–771. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.036> The Clean Label Guide to Europe from Ingredion, n.d.

Thomas, B., Contet Audonneau, N., Machouart, M., Debourgogne, A., (2019). Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *Journal of Medical Mycology*, 29, 56–58. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.01.003>

Tiwari, B.K., Valdramidis, V.P., O' Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., Cullen, P.J., (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5987–6000. <https://doi.org/10.1021/jf900668n>

Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D., (2011). Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. *Food Research International*, 44, 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>

Tornambé, G., Cornu, A., Verdier-Metz, I., Pradel, P., Kondjoyan, N., Figueredo, G., Hulin, S., Martin, B., (2008). Addition of Pasture Plant Essential Oil in Milk: Influence on Chemical and Sensory Properties of Milk and Cheese. *Journal of Dairy Science* 91, 58–69. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0154>

Trobetas, A., Badeka, A., Kontominas, M.G., (2008). Light-induced changes in grated Graviera hard cheese packaged under modified atmospheres. *International Dairy Journal* 18, 1133–1139. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.06.002>

Tunc, S., Chollet, E., Chalier, P., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., (2007). Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.004>

Les Producteurs laitiers du Canada, (2019). Une histoire de fromage-Plaisirs laitiers. <https://producteurslaitiersducanada.ca/fr/plaisirs-laitiers/une-histoire-de-fromage> (Consulté le 15 septembre 2021).

Villalobos, F., Granillo-Guerrero, V., Leyva-Daniel, D., Beltran, L., Gutiérrez-López, G., Monroy-Villagrana, A., Jafari, S., (2018). Fabrication of Nanoemulsions by Microfluidization, in: Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization. pp. 207–232. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.00008-4>

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., (2007). Antifungal Activities of Thyme, Clove and Oregano Essential Oils. *Journal of Food Safety*, 27. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2007.00063.x>

Wan, J., Zhong, S., Schwarz, P., Chen, B., Rao, J., (2019). Physical properties, antifungal and mycotoxin inhibitory activities of five essential oil nanoemulsions: Impact of oil compositions and processing parameters. *Food Chemistry* 291, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.032>

Wang, S., Shi, Y., Tu, Z., Zhang, L., Wang, H., Tian, M., Zhang, N., (2017). Influence of soy lecithin concentration on the physical properties of whey protein isolate-stabilized emulsion and microcapsule formation. *Journal of Food Engineering* 207, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.03.020>

Wu, X., Cheng, A., Sun, L., Lou, H., (2008). Effect of plagiochin E, an antifungal macrocyclic bis(bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans*. *Acta Pharmacol Sin* 29, 1478–1485. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00900.x>

- Yun, J., Lee, D.G., (2016). A novel fungal killing mechanism of propionic acid. *FEMS Yeast Research* 16, fow089. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow089>
- Zehren, V.L., (1984). Concerns and Problems of Storing and Marketing Manufactured Cheese. *Journal of Dairy Science* 67, 2100–2107. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81552-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81552-0)
- Zouari, A., Lajnaf, R., Lopez, C., Schuck, P., Attia, H., Ayadi, M.A., (2021). Physicochemical, techno-functional, and fat melting properties of spray-dried camel and bovine milk powders. *Journal of Food Science* 86, 103–111. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15550>
- Muresan, V., Muste, S., Racolta, E., Semeniuc, C.A., Man, S., Birou (Pop), A., Chircu, C., (2010). Determination of Peroxide Value in Sunflower Halva using a Spectrophotometric Method. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca*, 67. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-agr:5116>
- G. Sassi, S. Salmieri, Z. Allahdad, S. Karboune, M. Lacroix, (2022). Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend. *Journal of Food Science*, 1–19. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16273>

7. ANNEXE I

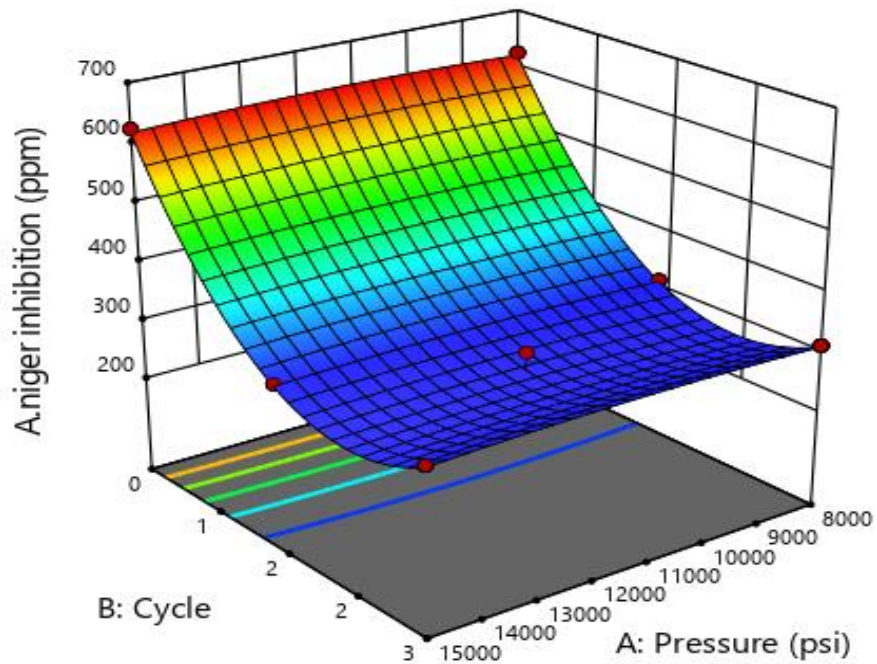


Figure 7.13a Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *A. niger*.

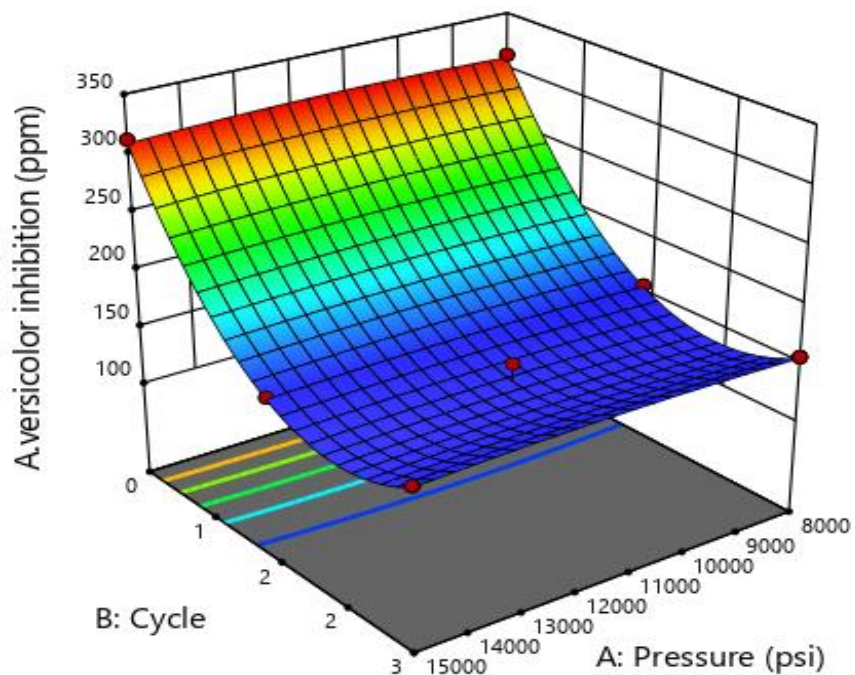


Figure 7.13b Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *A. versicolor*.

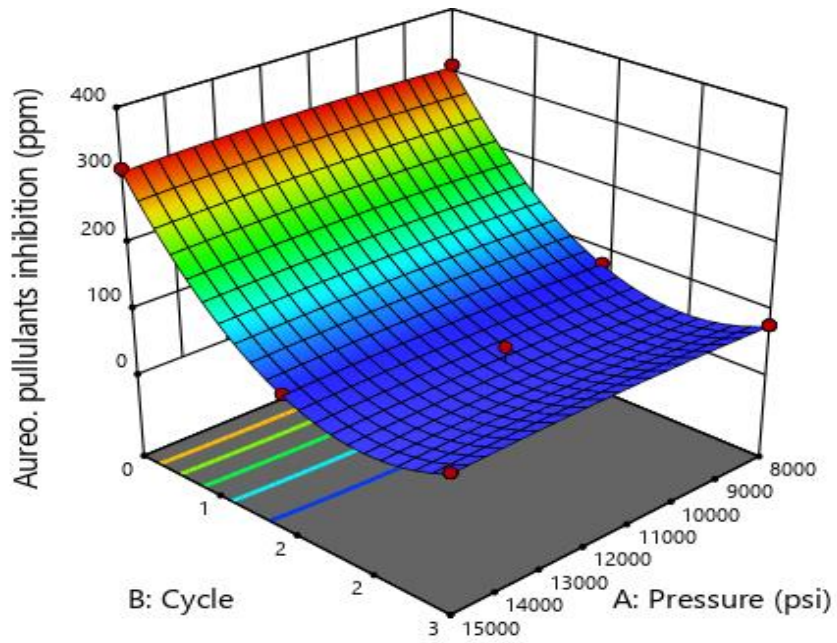


Figure 7.13c Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Aureo pullulants*.

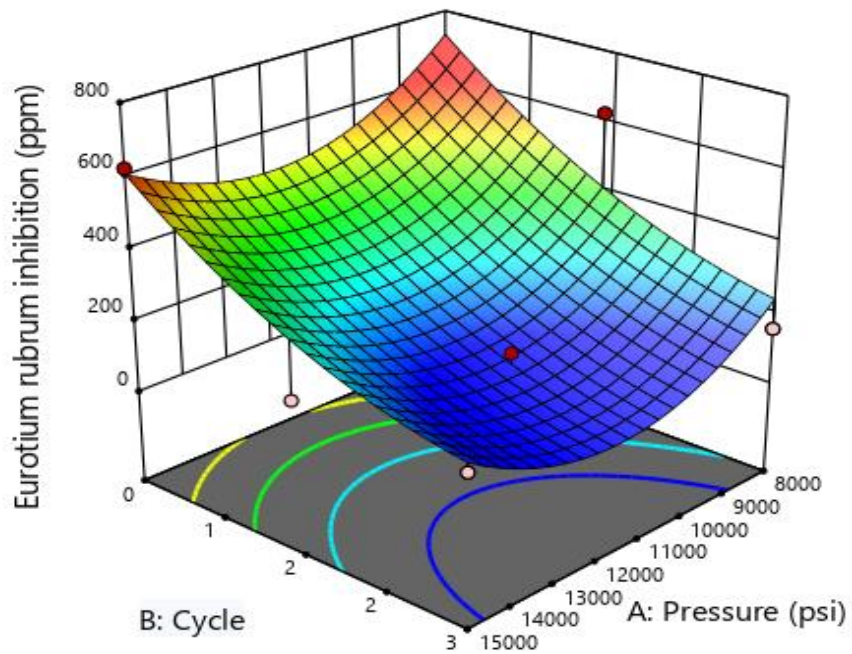


Figure 7.13d Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Eurotium rubrum*.

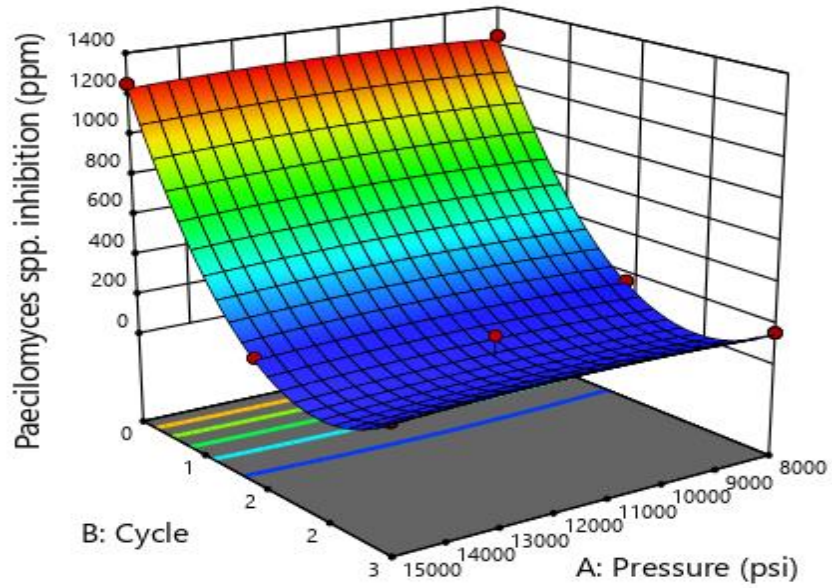


Figure 7.13e Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *Paecilomyces* spp.

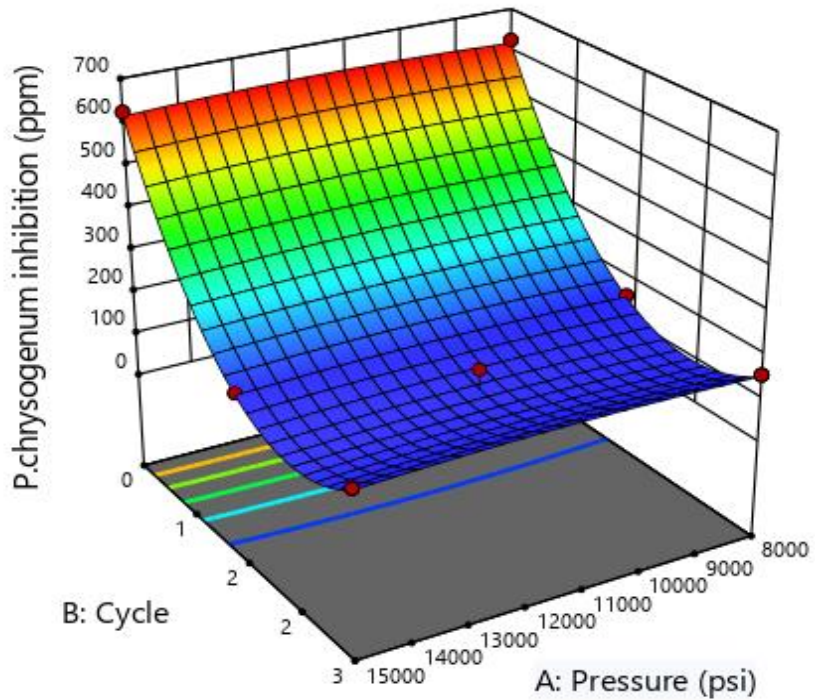


Figure 7.13f Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. chrysogenum*.

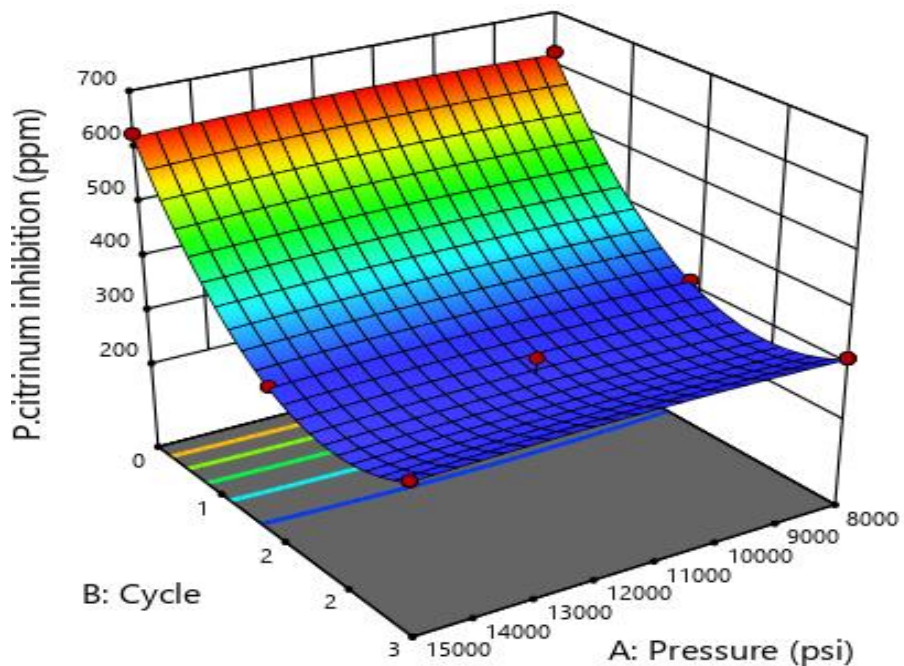


Figure 7.13g Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. citrinum*.

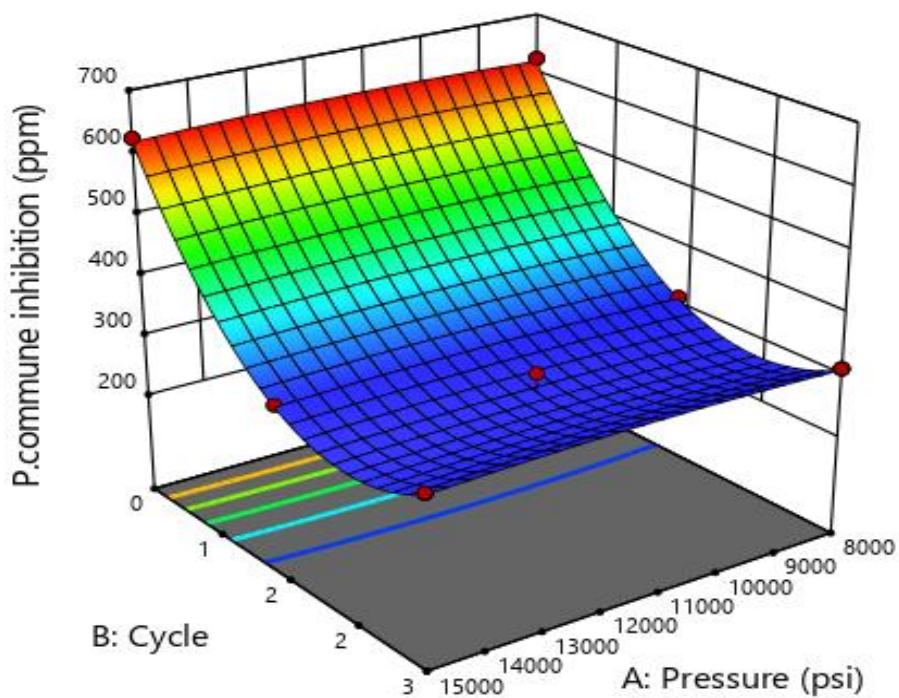


Figure 7.13h Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. commune*.

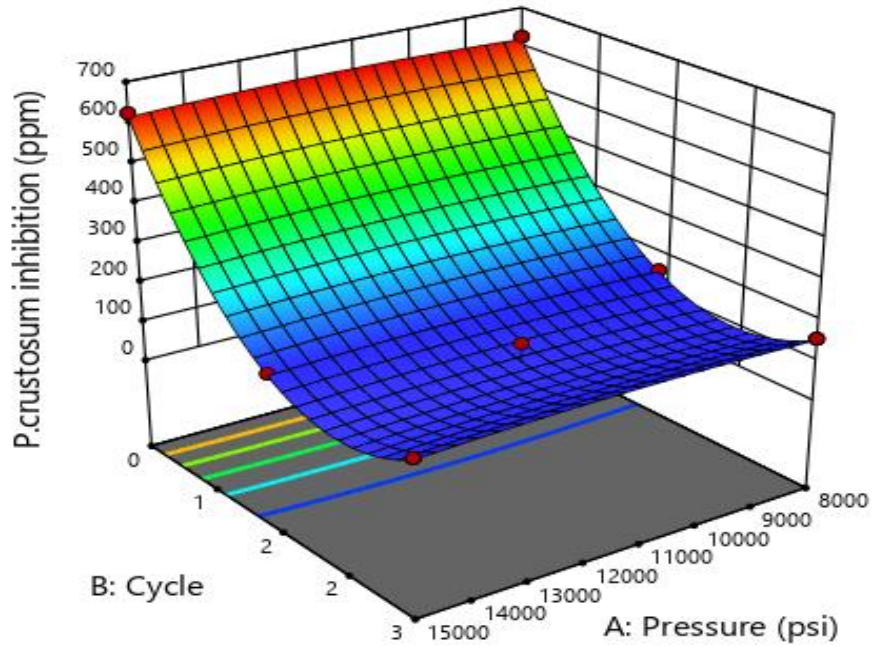


Figure 7.13i Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. crustosum*.

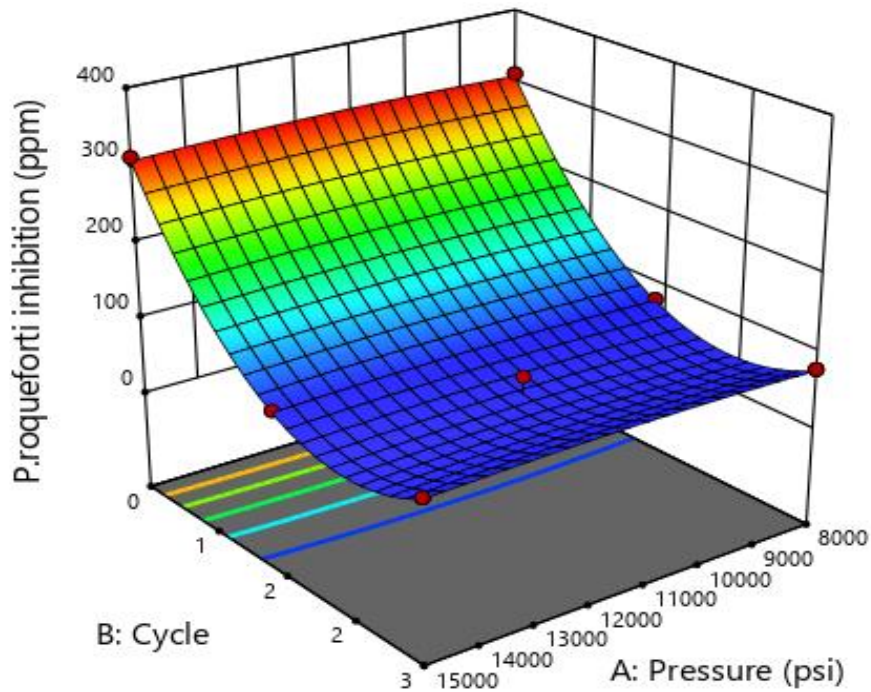


Figure 7.13j Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:2) against *P. roqueforti*.

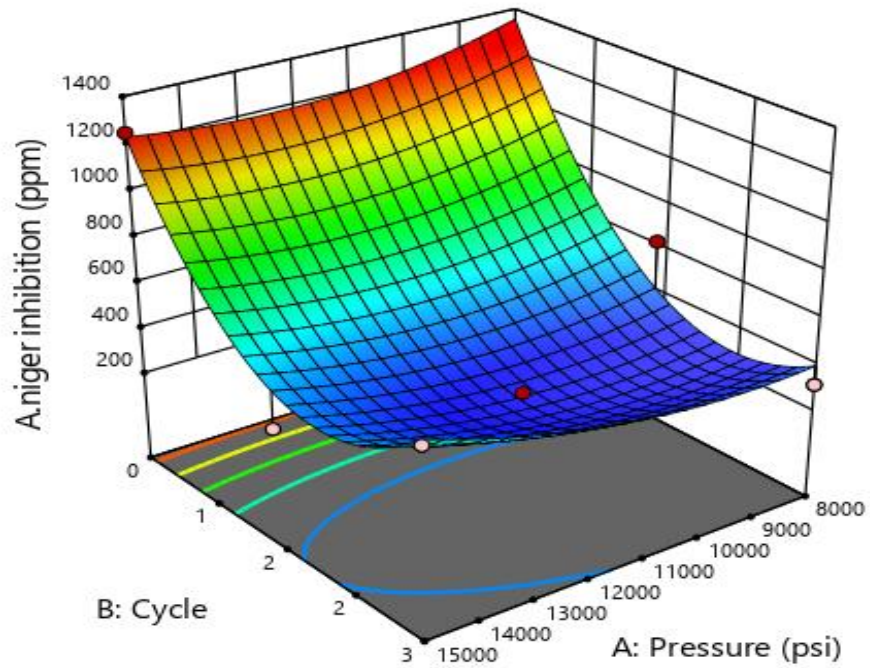


Figure 7.14a Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *A. niger*.

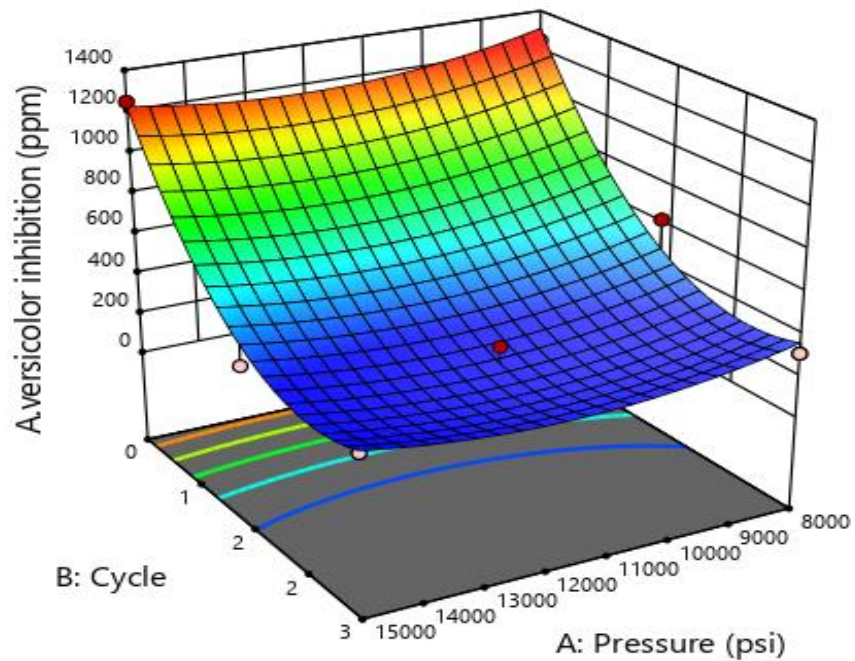


Figure 7.14b Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *A. versicolor*.

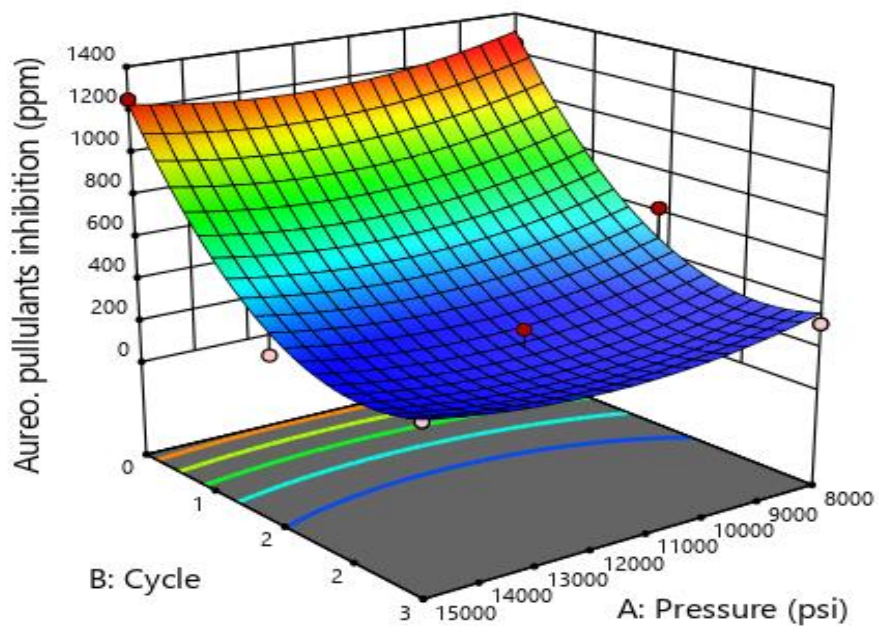


Figure 7.14c Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *Aureo pullulants*.

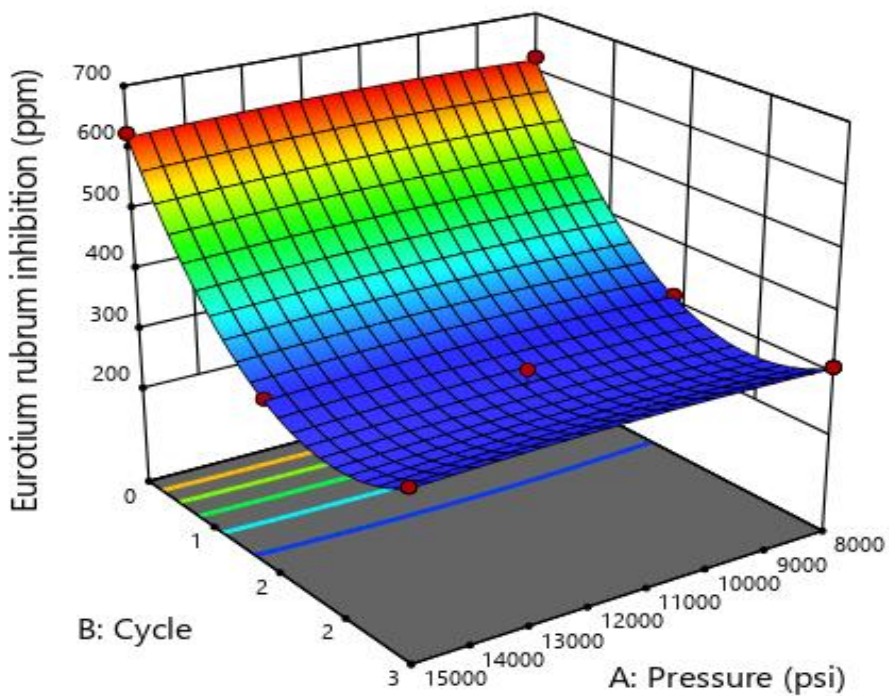


Figure 7.14d Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *Eurotium rubrum*.

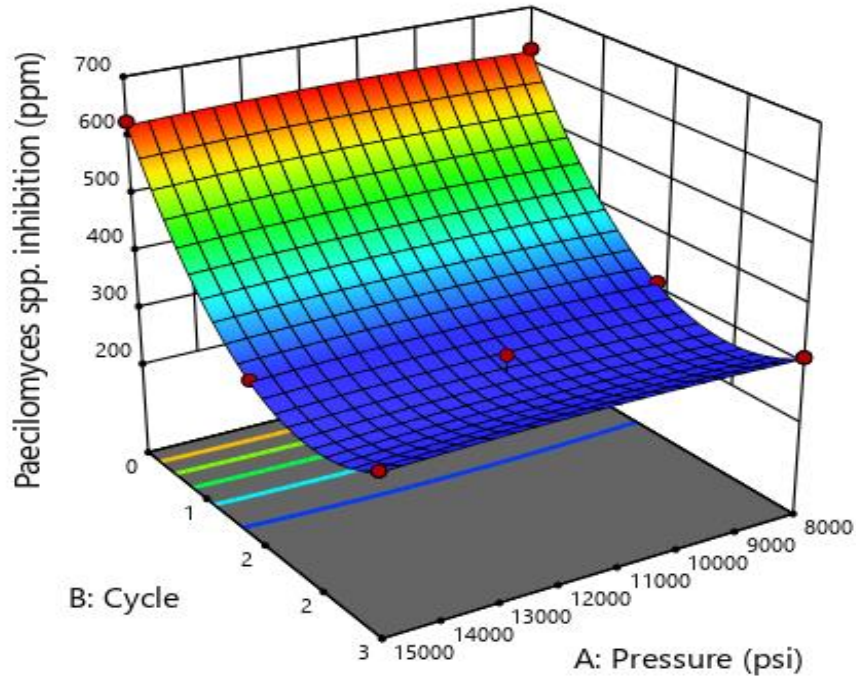


Figure 7.14e Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *Paecilomyces* spp.

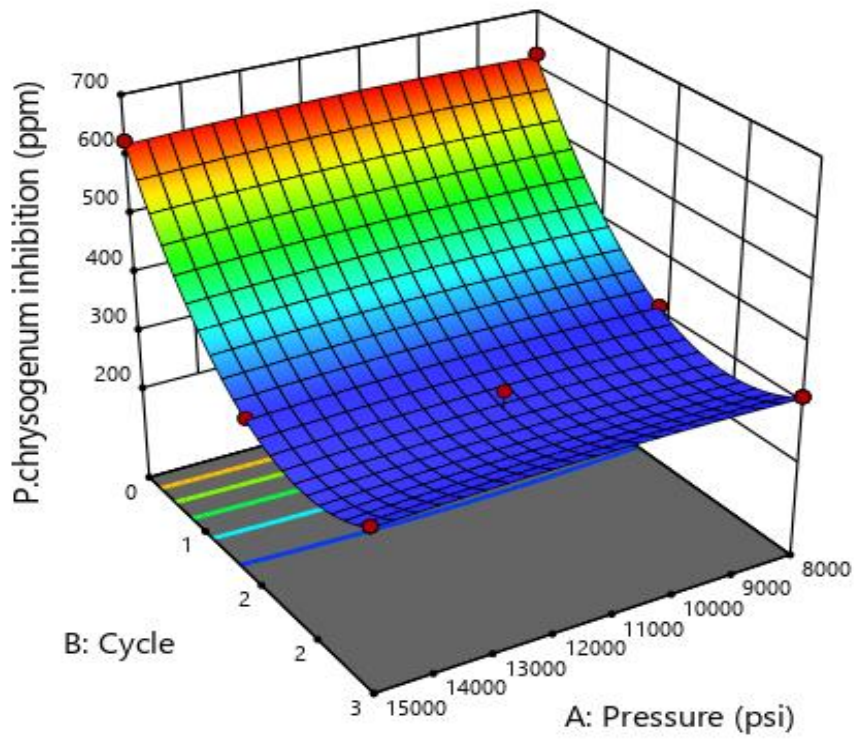


Figure 7.14f Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *P. chrysogenum*.

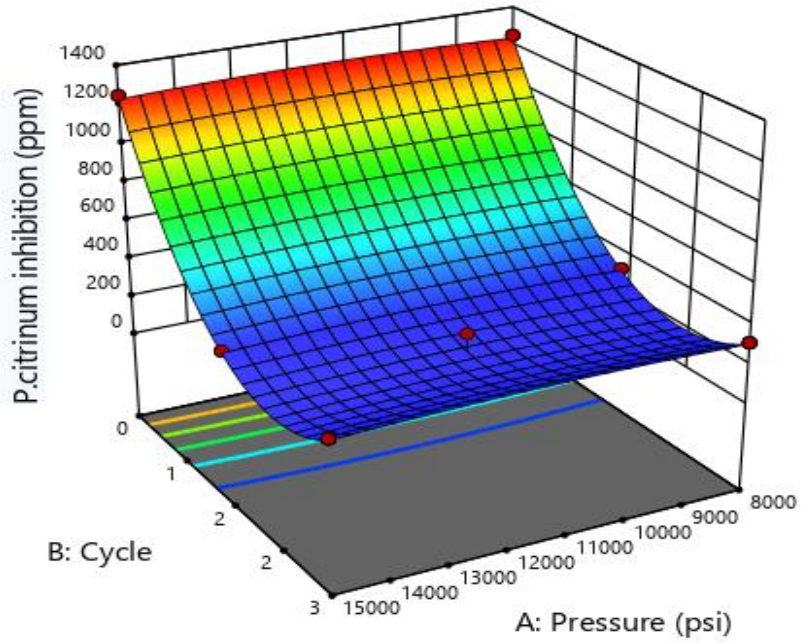


Figure 7.14g Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *P. citrinum*.

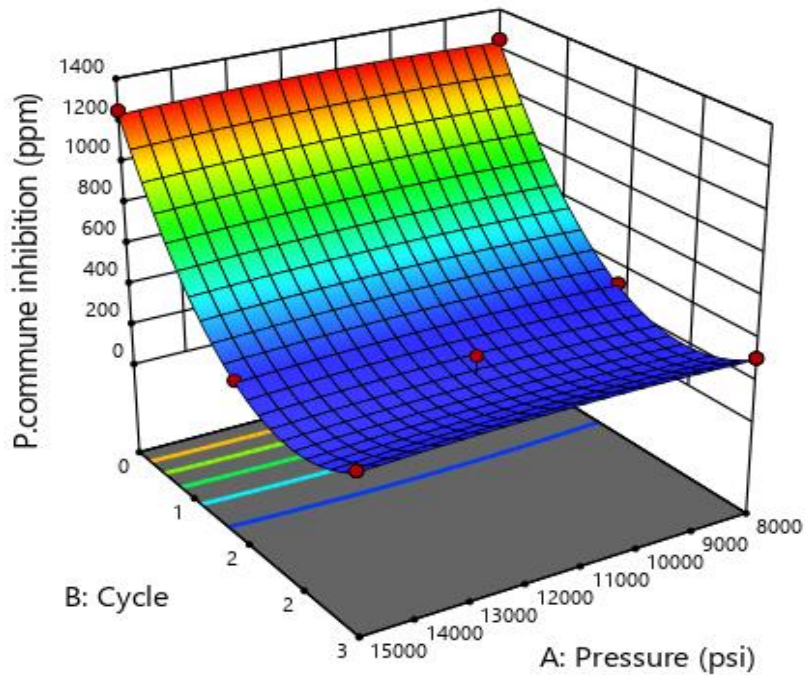


Figure 7.14h Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *P. commune*.

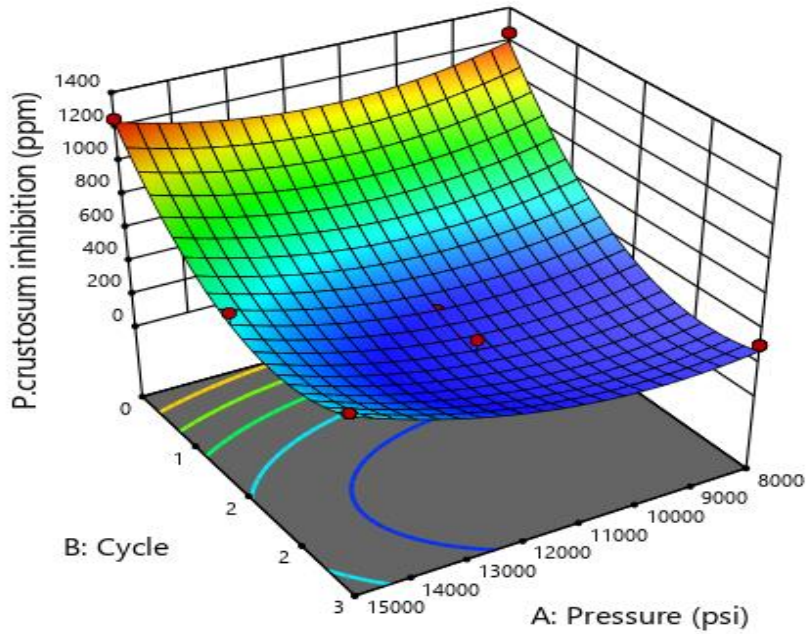


Figure 7.14i Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *P. crustosum*.

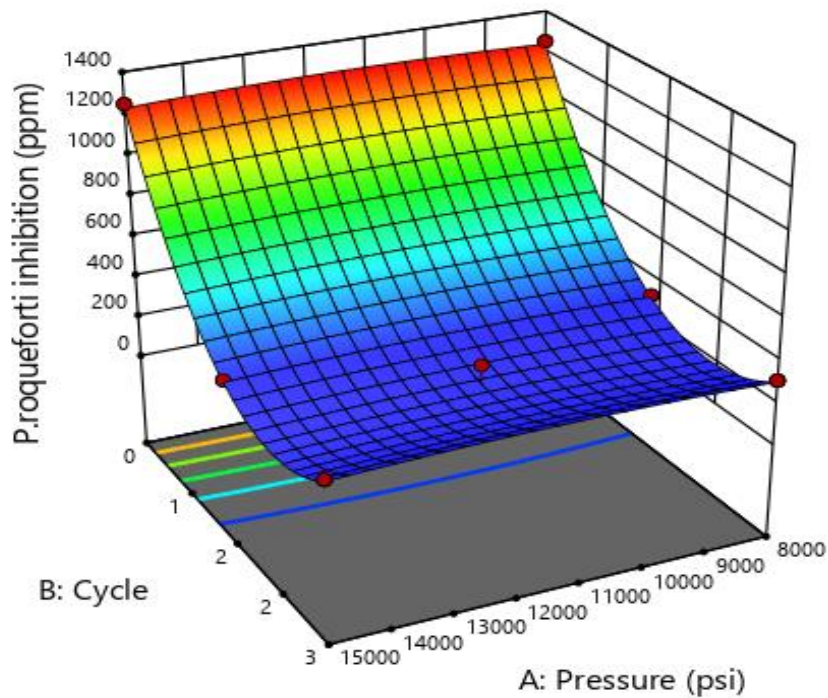


Figure 7.14j Combined effect of pressure and number of cycles on antifungal activity of nanoemulsions encapsulated with WPI: MD (1:3) against *P. roqueforti*.