



UMRt BioEcoAgro

Département des sciences des aliments

Institut Charles Viollette

Institut sur la Nutrition et les Aliments  
Fonctionnels

Université de Lille, Lille, France

Université Laval, Québec, Canada Faculté  
des études supérieures et postdoctorales

École doctorale Sciences de la Matière, du  
Rayonnement et de l'Environnement

## THÈSE DE DOCTORAT EN COTUTELLE

En vue de l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE - SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LAVAL – SCIENCES DES ALIMENTS**

Spécialité : Biotechnologies, Agroalimentaires, Sciences De L'aliment, Physiologie

---

Soutenance publique le 7 décembre 2023 par :

**Aude Commenges**

**Impact du microbiote laitier sur la biopréservation des fromages**

---

### JURY

Pr. Joseph Schacherer	Professeur, Université de Strasbourg, France	Rapporteur et Président du jury
Pr. Riadh Hammami	Professeur, Université d'Ottawa, Canada	Rapporteur
Pr. Marie Filteau	Professeure, Université Laval, Canada	Examinatrice
Pr. Antonio Fernandes	Professeur, Université de Viçosa, Brésil	Examineur
Dr. Virginie Galeote	Chargée de recherche, INRAe de Montpellier, France	Examinatrice
Pr. Steve Labrie	Professeur, Université Laval, Canada	Directeur de thèse
Pr. Djamel Drider	Professeur Université de Lille, France	Directeur de thèse
Dr. Françoise Coucheney	Maitre de conférences, Université de Lille, France	Encadrante de thèse

## Résumé

L'industrie laitière revêt une importance primordiale au sein du secteur agroalimentaire, constituant 20% de l'ensemble des industries agroalimentaires. Le fromage, en tant que produit phare de la transformation du lait, occupe une position prédominante, particulièrement en France et au Québec. La demande croissante des consommateurs pour des produits naturels et sains, associée à la nécessité de prolonger la durée de conservation des fromages, pousse les professionnels du secteur à adopter des pratiques de « clean label » et à développer des techniques de biopréservation, pour préserver la qualité des produits tout en répondant aux préoccupations sanitaires et de naturalité. Les écosystèmes fromagers abritent une grande diversité microbienne, qui participe à leur typicité, et représentent une opportunité de découvrir des candidats potentiels pour la biopréservation. L'isolement de souches possédant une activité antimicrobienne dans le fromage devient de plus en plus intéressant, notamment pour l'inhibition des microorganismes d'altération et/ou pathogènes. Dans ce projet, deux fromages artisanaux français, le Carré du Vinage et la Bourle Roncquoise, et deux fromages québécois, un cheddar et un fromage à croûte lavée, ont été sélectionnés. La caractérisation globale du microbiote des fromages français a été réalisée en utilisant des méthodes moléculaires, afin de déterminer leur typicité et leur diversité microbiologique. Grâce à un isolement systématique des microorganismes de ces fromages, un total de 830 isolats bactériens et fongiques ont pu être caractérisés pour leurs activités antimicrobiennes sur gélose double couche. L'activité antifongique a été testée contre trois levures et quatre moisissures indésirables et l'activité antibactérienne, contre neuf bactéries pathogènes ou d'altération. Les 36 isolats fromagers ayant démontré une capacité d'inhibition vis-à-vis des différents contaminants ont été identifiés par séquençage du gène de l'ARNr 16S (bactéries) ou des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) (levures). Parmi ces isolats, les levures *Metschnikowia pulcherrima* LMA-2038 du Carré du Vinage, et *Trichosporon asahii* LMA-810 de la Rose Blanche ont montré des activités à la fois antifongiques (contre *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cladosporium cladosporioides* et *Penicillium commune*) et antibactériennes (contre *Listeria innocua* et *Clostridium tyrobutyricum*). Leur potentiel comme agent de biopréservation a été testé dans des fromages modèles. Leur ajout a significativement diminué la croissance des deux levures

contaminantes *Y. lipolytica* et *R. mucilaginosa*. Des tests de caractérisation des potentiels composés antimicrobiens ont été réalisés afin de mieux comprendre la nature des molécules impliquées dans ces activités antagonistes. Ces travaux confirment que les fromages sont des réservoirs potentiels de souches antimicrobiennes qui pourraient servir comme agent de biopréservation et participer au développement d'outils pour répondre au « clean label ».

## Abstract

The dairy industry is a major sector of the agri-food industry, representing 20% of the total agri-food industry. Cheese, as the primary product of milk transformation, holds a significant position, particularly in France and Quebec. The increasing consumer demand for natural and healthy products, coupled with the need to extend the shelf life of cheeses, is driving industry professionals to adopt “clean label” practices and develop biopreservation techniques to preserve product quality while addressing health and naturalness concerns. Cheese ecosystems host a diverse microbial population that contributes to their typicity and offer an opportunity to discover potential candidates for biopreservation. The isolation of strains with antimicrobial activity from cheese has become increasingly interesting, especially for inhibiting spoilage and/or pathogenic microorganisms. In this project, two artisanal French cheeses and two Quebec cheeses were selected. The overall characterization of the microbiota in French cheeses was conducted using molecular methods to visualize their uniqueness and microbial diversity. Through systematic isolation of microorganisms from these cheeses, a total of 830 isolates comprised of bacteria, yeasts, and molds were characterized for their antimicrobial activities on double-layer agar. Antifungal activity was tested against three undesirable yeasts and four molds, while antibacterial activity was tested against nine pathogenic or spoilage bacteria. Among these, 36 cheese isolates demonstrating inhibition capacity against various contaminants were identified by DNA sequencing of the 16S rRNA (bacteria) or ITS (yeasts) regions. Among them, the yeasts *Metschnikowia pulcherrima* LMA-2038 from “Carré du Vinage” and *Trichosporon asahii* LMA-810 from “Rose Blanche” exhibited both antifungal activity (against *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Cladosporium cladosporioides*, and *Penicillium commune*) and antibacterial activity (against *Listeria innocua* and *Clostridium tyrobutyricum*). Their potential as biopreservation agents was tested in model cheeses, significantly reducing the growth of the two contaminating yeasts, *Y lipolytica* and *R. mucilaginosa*. Characterization tests of potential biopreservation compounds were conducted to better understand the nature of the molecules involved in these antagonistic activities. These findings confirm that cheeses are potential reservoirs of antimicrobial strains that could serve as biopreservation agents and contribute to the development of tools to meet the “clean label” requirements.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	v
Listes des figures .....	viii
Listes des tableaux.....	ix
Listes des annexes .....	ix
Listes des abréviations.....	x
Avant-propos .....	xiv
Introduction générale.....	1
1. Chapitre 1 : État des connaissances.....	4
1.1. Introduction sur le fromage.....	4
1.1.1. Historique et variétés de fromages .....	4
1.1.2. Du lait au fromage .....	5
1.2. Écosystèmes fromager .....	7
1.2.1. Microbiote primaire .....	7
1.2.2. Microbiote secondaire .....	8
1.2.3. Microbiote typique pour des fromages à pâte ferme et à croûte lavée .....	8
1.2.4. Microbiote typique pour des fromages à pâte pressée non cuite .....	9
1.3. Contrôle des contaminants laitiers.....	13
1.3.1. Stratégies de contrôle des contaminants du lait.....	13
1.3.2. Stratégies de contrôle des contaminants dans le fromage .....	15
1.4. Les techniques -OMIQUES pour la description des microbiotes.....	16
1.5. Biopréservation et microorganismes inhibiteurs dans les aliments .....	26
1.5.1.3. <i>Inhibition par synthèse de métabolites secondaires</i> .....	28
1.6.2.1. <i>Généralités</i> .....	37
1.6.2.2. Propriétés inhibitrices.....	38
2. Chapitre 2 : Contexte du projet .....	40
2.1. Problématique .....	40
2.2. Hypothèse de recherche .....	41
2.3. Objectifs spécifiques.....	41
3. Chapitre 3 : Caractérisation moléculaire des communautés bactériennes et fongiques de deux fromages français et leur rôle potentiel en tant que réservoir pour l'isolement de cultures protectrices. ....	42
3.1. Avant-propos.....	42
3.2. Résumé.....	42
3.3. Publication .....	43
3.4. Abstract.....	44
3.5. Introduction.....	45
3.6. Materials and Methods.....	47
3.6.1. Cheese sampling.....	47
3.6.2. DNA extraction and metabarcoding .....	47
3.6.3. Microbial enumeration and isolation .....	48
3.6.4. Abundance calculation .....	48
3.6.5. Culture of cheese isolates and screening their antimicrobial activities....	49
3.6.6. Molecular identification using rDNA sequencing of cheese isolates with antimicrobial activities. ....	50
3.7. Results and Discussion .....	51
3.7.1. Sequencing data and the diversity of cheese microbiota.....	51

3.7.2.	The ecosystem of Bourle Roncquoise .....	51
3.7.3.	The ecosystem of Carré du Vinage .....	54
3.7.4.	Screening the antimicrobial activities of cheese isolates .....	57
3.8.	Conclusion .....	61
3.9.	References .....	68
4.	Chapitre 4 : Les propriétés biopréservatives de <i>Metschnikowia pulcherrima</i> LMA 2038 et de <i>Trichosporon asahii</i> LMA 810 dans un fromage frais modèle .....	79
4.1.	Avant-propos .....	79
4.2.	Résumé .....	79
4.3.	Publication .....	80
4.4.	Abstract .....	81
4.5.	Introduction .....	81
4.6.	Materials and methods .....	83
4.6.1.	Microorganisms and growth conditions .....	83
4.6.2.	Screening inhibitory activities .....	84
4.6.3.	Preparation of a soft cheese model .....	84
4.6.4.	Fungi counting and enumeration of bacteria .....	85
4.6.5.	Evidence on inhibitory properties of antimicrobial compounds .....	86
4.6.6.	Impacts of heat treatment, pH modification and enzymatic treatment on antimicrobial activities of <i>M. pulcherrima</i> LMA-2038 and <i>T. asahii</i> LMA-810... ..	86
4.6.7.	Hemolysis and resistance to antifungals .....	87
4.6.8.	Statistical analyses .....	87
4.7.	Results .....	87
4.7.1.	The different antimicrobial activities of <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038, screening and curd model tests .....	87
4.7.2.	Effects of pH, heat, and enzymes on antifungal activity of <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038 .....	88
4.7.3.	The different antimicrobial activities of <i>T. asahii</i> LMA 810, screening and curd model tests .....	89
4.7.4.	Antifungal activity of <i>T. asahii</i> LMA 810 and the preliminary characteristics of its antifungal compounds .....	89
4.7.5.	Safety of the antagonistic yeasts, <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038 and <i>T. asahii</i> LMA 810 .....	90
4.8.	Discussion .....	90
4.9.	Conclusion .....	93
4.10.	References .....	100
5.	Chapitre 5 : <i>Trichosporon asahii</i> : Taxonomie, risques pour la santé, et applications biotechnologiques .....	106
5.1.	Avant-propos .....	106
5.2.	Résumé .....	106
5.3.	Publication .....	107
5.4.	Abstract .....	107
5.5.	Introduction .....	108
5.6.	Morphotype and Identification of the Genus <i>Trichosporon</i> .....	109
5.6.1.	The Origins and Taxonomy of <i>Trichosporon</i> spp. ....	109
5.6.2.	Morphotype and Identification of the Genus, <i>Trichosporon</i> .....	110
5.7.	<i>Trichosporon asahii</i> : An Opportunistic Pathogen .....	110
5.7.1.	The Pathogenicity of <i>Trichosporon asahii</i> .....	110
5.7.2.	Available Treatments for Trichosporonosis .....	111
5.7.3.	The Emergence of Resistance to Antifungal Molecules .....	112

5.8.	<i>Trichosporon asahii</i> as a Potential Biotechnological Agent .....	113
5.8.1.	<i>Trichosporon asahii</i> and the Production of Aromatic Compounds .....	113
5.8.2.	<i>Trichosporon</i> as a Bioremediation Agent .....	115
5.8.3.	Limitation of Utilization of Opportunistic Pathogenic Yeasts in Industrial Settings	116
5.9.	<i>Trichosporon asahii</i> in the Dairy Industry .....	117
5.9.1.	The Use of Oleaginous Yeasts as Food Supplements for Dairy Cattle....	117
5.9.2.	The Occurrence of <i>Trichosporon asahii</i> in Dairy Products, and its Impacts on the Sensory Characteristics of Cheese .....	118
5.9.3.	The Inhibitory Properties of the Yeast <i>Trichosporon</i> in the Dairy Industry	119
5.10.	Conclusions and perspectives .....	120
5.11.	References.....	123
Chapitre 6 : Discussion générale .....		132
6.1.	Diversité microbienne et typicité des fromages.....	132
6.2.	Carte d'identité microbiologique des fromages à l'étude .....	134
6.3.	Métabarcoding vs approche culture dépendante.....	135
6.4.	Fromage : réservoir de souches possédant une activité de biopréservation.....	137
6.5.	Les levures dotées d'activités antimicrobiennes.....	138
6.6.	Utilisation des levures comme agent de biopréservation.....	140
Bibliographie .....		145
Annexes .....		186

## Listes des figures

<b>Figure 1.</b> Résumé des différentes étapes de fabrication d'un fromage (Fox, 2011, Zheng et al., 2021). .....	6
<b>Figure 2.</b> Résumé des différentes étapes du séquençage Illumina (van Dijk et al., 2018) .....	21
<b>Figure 3.</b> Différents mécanismes d'inhibition des microorganismes (Ceugnietz, 2017) .....	27
<b>Figure 4.</b> Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Bin Hafeez et al., 2021) .....	31
<b>Figure 5.</b> Abundance of bacteria (-B) and Fungi (-F) in both the core (-C) and the rind (-R) of Bourle Roncquoise (BR) (left) and Carré du Vinage (CV) (right) french cheeses. ....	64
<b>Figure 6.</b> Growth of target strains on the curd cheese model. Counts were performed after 7 days in the presence and absence of <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038.....	95
<b>Figure 7.</b> Growth of cheese contaminants after 7 days in the presence or absence of <i>T. asahii</i> LMA 810 .....	97
<b>Figure 8.</b> The four mutations in the TOR pathway of <i>T. asahii</i> are implicated in fluconazole resistance. Adapted from Li et al. (2017) and Padovan et al. (2019).....	121
<b>Figure 9.</b> Formation of volatile aroma compounds (terpene and norisoprenoid) from aroma glycosides (monoterpene polyol and norisoprenoid glycoside) by $\beta$ -glucosidase produce by <i>T. asahii</i> . Adapted from Wang and al. (2012) .....	122



## Listes des tableaux

<b>Tableau 1</b> Récapitulatifs des avantages et des désavantages des technologies NGS actuellement disponibles (adapté de Pervez et al., 2022).....	20
<b>Table 2.</b> Antifungal activities of cheese strains.....	65
<b>Table 3</b> Antibacterial activities of cheese strains .....	67
<b>Table 4</b> Antimicrobial activities of cheese yeast strains, <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038 and <i>T. asahii</i> LMA 810.....	94
<b>Table 5</b> Effects of pH, heat, and enzymes on the antimicrobial compounds produced by <i>Mestchnikowia pulcherrima</i> LMA2038 .....	96
<b>Table 6</b> Characteristics of the antimicrobial compounds of <i>Trichosporon asahii</i> LMA 810 .....	98
<b>Table 7</b> Susceptibility of non- <i>Saccharomyces</i> <i>M. pulcherrima</i> LMA 2038 and <i>T. asahii</i> LMA 810 to clinical antifungal drugs.....	99
<b>Table 8</b> Overview of the Genome Assembly related of <i>T. asahii</i> .....	121

## Listes des annexes

<b>Annexe 1:</b> Souches issues des fromages québécois .....	186
<b>Annexe 2:</b> Activités antifongiques des souches fromagères .....	187
<b>Annexe 3 :</b> Activités antibactériennes des souches fromagères .....	189

## Listes des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

AMP/PAM : *Antimicrobial peptide*/Peptide antimicrobien

AOC : Appellation d'origine contrôlée

ASV : *Amplicon Sequence Variant*/Variant de séquence d'amplicon

A<sub>w</sub> : Activité de l'eau

-B : *Bacterial ecosystem*

BHA : Butylated HydroxyAnisole

BHI: *Brain Heart Infusion*

BHT: Butylated HydroxyToluene

BR : Bourle Roncquoise

BTEX: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene

CL : *clean label*

COV : Composés organiques volatils

CV : Carré du Vinage

-C : *Core/Cœur*

DO : Densité optique

DPPH : diphenyl-1-picrylhydrazyl

EPS : *Extracellular Polymeric Substance*/ Substances polymériques extracellulaires

-F : *Fungal ecosystem*

FAO : *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GCS: *Culture Supernatant*

GRAS : *Generally Recognised As Safe*/ Généralement reconnu comme sûr

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*/Chromatographie Liquide haute performance

HR : Humidité relative

HTST : *Hight Temperature, Short Time* / Haute Température, courte durée

ICV : Institut Charles Viollette

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

LAB : Lactic Acid Bacteria/ Bactérie lactique  
LMA : Laboratoire de Mycologie Alimentaire  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
ONUAA : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture  
OTU: *Operational Taxonomic Unit*/Unité taxonomique opérationnelle  
NCBI : *National Center for Biotechnology Information*  
NGS : *Next Generation Sequencing*/Séquençage de nouvelle génération  
QPS : *Qualified Presumption of Safety*/ Prémption qualifiée de sécurité  
PAH : *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*/Hydrocarbones aromatiques polycycliques  
Pb : paires de bases  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*/ Réaction de polymérisation en chaîne  
pH : Potentiel hydrogène  
-R/-S : *Rind*/Surface  
RMN/NMR : Résonance magnétique nucléaire/ *Nuclear Magnetic Resonance*  
RPM : *Revolutions per minute*/Rotation par minutes  
ROS : *Reactive Oxygen Species*/Espèce réactive à l'oxygène  
S/M: *Salt/Moisture ratio*  
TOR : *Target Of Rapamycin*  
TSA: *Tryptic Soy Agar*  
YEG: *Yeast Extract Glucose*  
YEGC: *Yeast Extract Glucose Chloramphenicol*

## Remerciements :

Un merci tout particulier aux membres du comité examinateur de cette thèse : Pr. Riadh Hammami et Pr. Joseph Schacherer, pour avoir accepté le rôle de rapporteur de mon jury de thèse et Pre. Marie Filteau, Pr. Antonio Fernandes ainsi que le Dre. Virginie Galeote d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers mes encadrants lillois, le Pr. Djamel Drider, directeur de thèse, et le Dre. Françoise Coucheney, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, ainsi que pour leurs expertises et leurs conseils tout au long de mes travaux.

Je souhaite également adresser mes remerciements au Pr. Steve Labrie pour sa supervision au cours de ces trois dernières années. Sa disponibilité, ses commentaires éclairés et son expérience ont joué un rôle déterminant dans ma progression. Tu as su me guider avec justesse tout en me laissant la liberté d'explorer ma propre voie dans ma recherche scientifique.

Un grand merci au Dre. Marie-Hélène Lessard, pour son aide, ses conseils, et son soutien constants tout au long de ma thèse. Ta contribution a été inestimable pour la réussite de ce projet. Merci d'être toujours disponible et de toujours répondre à mes blocs de questions avec pertinence et bienveillance. Et merci pour le prêt de tes raquettes, j'ai découvert une nouvelle passion !

Merci à toute l'équipe du LMA, pour tous les bons moments passés ensemble au laboratoire et en dehors (Ottawa reste un très bon souvenir). À Adèle (aka Adèle l'incroyable), Auriane, Charlotte (aka Chachou), Gabrielle, Karl, Shérazade (aka Shéra), merci pour votre bonne humeur au quotidien et votre esprit d'entraide. Et un merci particulier à Typhaine (aka Typhou), pour ta compagnie lors des longues journées au laboratoire de mycologie, pour nos discussions sur nos travaux respectifs mais aussi sur des sujets moins scientifiques.

Mes séjours entre la France et le Québec m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes que j'aimerais remercier ici en espérant n'oublier personne.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire de l'Université de Lille Barbara, Carlos, Fatima, Florian, Morgan, Pauline, Alan, Océane, Maxime, Radja, Yanath, Kévin, Ali et Adrien. Nos moments partagés, entre rires et célébrations de succès collectifs, ont contribué à une atmosphère chaleureuse et à une culture d'entraide, transformant ainsi notre lieu de travail en un espace agréable à vivre. Merci également aux membres de l'AGIDSA pour tous ces bons moments organisés ensembles (le meilleur reste le concours de décoration de citrouilles).

Maël, merci pour toutes ces soirées où tu cuisines et moi je mange et de m'avoir soutenu tout au long de cette thèse. Merci à Jean (meilleur voisin de bureau), à Héliorie, à Lille ou à Québec tu es toujours là; à Axel, un presque béarnais à Québec; à Baptiste, à Alexandre et à Chloé pour toutes nos randonnées, à Paul, pour toutes nos discussions, Éva, voisine de bureau et de rue, à Éric, merci de me mentir sur mon niveau d'escalade et à Eugénie, une très belle rencontre de MT180s. Une pensée également à Mikaël (ta nappe Cochonou reste ton meilleur achat !), Pierre et Romane (NY ensemble était une vraie aventure surtout le trajet !) pour nos soirées avec toujours beaucoup de fromages.

Merci également à Apolline (le gel de nos cheveux dans le jacuzzi reste mémorable), Pollux, Guillaume et Marylin, un petit bout de l'ESITech à Montréal et à St Hyacinthe, vous savoir à côté a été une vraie source de réconfort.

Un merci particulier à Tommy, de m'avoir écouté parler et reparler de fromages, de biopréservation et de moisissures (qui sont toujours très belles en toute objectivité !). Merci d'avoir été patient et d'avoir été présent.

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers ma famille pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure. Un immense merci à mes parents, Marie-Laure et Dominique, et à ma mamie, Marie, pour votre soutien et vos encouragements sincères depuis le tout début de cette aventure. À mes sœurs, Agathe et Jeanne, et ma cousine Emily de m'avoir remotivé lors de moments de doutes, pour les séances de sports sur zoom et d'avoir toujours été présentes (de 7h30 à 8h → préparation, de 12h à 13h → mioumioume et à partir de 18h → sur le vélo ou dans la voiture).

« Sacrebleu, je suis astronome, je ne suis pas docteur! Enfin si, je suis docteur, mais pas ce genre de docteur, j'ai un doctorat, ce n'est pas la même chose! »

Dr. Delbert Doppler

## Avant-propos

Cette thèse présente un projet de doctorat, réalisée en cotutelle entre l'Université de Lille, sous la direction du Pr. Djamel Drider et du Dre. Françoise Coucheney, et l'Université Laval sous la direction du Pr. Steve Labrie. Les travaux de cette thèse portent sur l'impact du microbiote laitier pour la biopréservation des fromages et se compose de plusieurs sections dont l'introduction générale, six chapitres et une conclusion finale. Le premier chapitre correspond à un état de l'art sur lequel l'hypothèse et les objectifs de la recherche se sont appuyés. Le second chapitre présente la problématique, l'hypothèse de recherche et les objectifs qui découlent de l'état de l'art. Les chapitres 3, 4 et 5, constituent le corps de la thèse et correspondent aux travaux de recherche réalisés et une revue de littérature en lien avec les travaux de recherches. Enfin, le chapitre 6 présente une discussion générale des travaux réalisés tout au long de ce projet suivi d'une conclusion tirée des résultats obtenus et d'une série de perspectives au projet. Les trois chapitres de résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques en cours de soumission.

Le chapitre 3, contient les résultats de l'étude des écosystèmes fongique et bactérien, de cœur et de surface des deux fromages fermiers français et les résultats du criblage des isolats de ces fromages vis-à-vis de l'écosystème contaminant de ces fromages. Ce chapitre a été écrit sous la forme d'un article intitulé « **Molecular characterization of the bacterial and fungal communities of two French cheeses and their potential role as a reservoir for the isolation of protective cultures.** », soumis dans *Food Microbiology* en octobre 2023. Les auteurs sont: Aude Commenges (Candidate au PhD.: planification et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article), Marie-Hélène Lessard (Professionnelle de recherche à l'Université Laval: supervision scientifique de l'étudiante correction et révision du manuscrit), Françoise Coucheney (Encadrante de thèse, Université de Lille supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit), Djamel Drider (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit) et Steve Labrie (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit). Ces résultats ont été présentés sous forme d'une présentation orale lors des congrès scientifiques Acfas (Québec, Canada) en 2022 et Green Food Tech (Montréal, Canada) en 2023.

Le chapitre 4 fait suite aux résultats de criblage antimicrobien des isolats provenant du fromage par l'étude de deux levures fromagères ayant manifesté des activités antimicrobiennes prometteuses. Leurs activités antimicrobiennes ont été testées dans un modèle plus complexe, à savoir un caillé modèle et des essais préliminaires visant à identifier les molécules responsables de ces propriétés antifongiques et antibactériennes extracellulaires dans les surnageants de culture de chacune de ces levures antagonistes ont été réalisés. Les résultats ont été présentés sous forme d'article : « **The biopreservative properties of *Metschnikowia pulcherrima* LMA 2038 and *Trichosporon asahii* LMA 810 in a model fresh cheese, are presented** », publié dans *Food Bioscience* en décembre 2023. Les auteurs sont: Aude Commenges (Candidate au PhD.: planification et réalisation des expériences, analyse des résultats et rédaction de l'article), Marie-Hélène Lessard (Professionnelle de recherche à l'Université Laval: supervision scientifique de l'étudiante révision du manuscrit), Françoise Coucheney (Encadrante de thèse, Université de Lille supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit), Steve Labrie (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit) et Djamel Drider (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, correction et révision du manuscrit). Ces résultats ont été présentés sous forme d'une présentation orale lors du congrès scientifique ADSA (Ottawa, Canada) en 2023.

Le chapitre 5, décrit sous forme d'une revue scientifique, le potentiel biotechnologique d'une des deux levures, *Trichosporon asahii* sélectionnés lors de ce projet : « ***Trichosporon asahii*: taxonomy, health hazards, and biotechnological applications** », soumis dans *Fungal Biology Reviews* en août 2023. Les auteurs sont: Aude Commenges (Candidate au PhD.: rédaction de l'article), Marie-Hélène Lessard (Professionnelle de recherche à l'Université Laval: supervision scientifique de l'étudiante correction et révision du manuscrit), Françoise Coucheney (Encadrante de thèse, Université de Lille supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit), Djamel Drider (Directeur de thèse, Université de Lille, supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit) et Steve Labrie (Directeur de thèse, Université Laval, supervision scientifique de l'étudiante, révision du manuscrit).

## Introduction générale

L'industrie laitière occupe une position prédominante se classant comme le deuxième domaine d'activité au sein du secteur agroalimentaire mondial. Cette industrie représente environ 20 % de l'ensemble des industries agroalimentaires, générant un chiffre d'affaires considérable de 31,9 milliards d'euros (ESANE 2014).

Une part importante de cette industrie est consacrée à la transformation du lait en divers produits tels que le yogourt, le beurre et particulièrement le fromage. En France, par exemple, environ 34,4 % du lait collecté est transformé en fromage, faisant du fromage le produit de transformation laitière le plus significatif (CNIEL, 2021). La France est le deuxième producteur de fromage de l'Union Européenne (EuroStats, 2020). Au Canada, le Québec est la principale province productrice de fromages avec 51 % du total de la production (lait.org, 2020). L'industrie fromagère présente donc un poids économique important dans ces deux régions du monde et doit donc répondre à des exigences sanitaires toujours plus importantes tout en continuant à innover.

Dans ce contexte, l'industrie fromagère fait face à divers défis, dont certains proviennent des attentes des consommateurs. Toujours plus soucieux de leur santé, ils se questionnent sur les agents de conservation et leurs impacts sur leurs santé et sont à la recherche de plus de « naturalité ». Ils recherchent des produits alimentaires plus naturels et exempts de composés artificiels (Asioli et al., 2017). En parallèle, les industriels cherchent continuellement des solutions pour prolonger la durée de conservation et éviter la détérioration des fromages afin de limiter les pertes économiques (Leyva Salas et al., 2017). Pour répondre à ces enjeux, l'industrie fromagère adopte la perspective du « clean label » (Asioli et al., 2017). Il est possible, de définir, de manière globale, le « clean label » comme un label répondant à la vision des consommateurs sur un produit, cherchant à réduire le nombre d'ingrédients utilisés et en proposant des procédés de fabrication durables. Les produits « clean label » impliquent souvent l'utilisation d'ingrédients biologiques, naturels ou exempts d'additifs artificiels (Asioli et al., 2017). Pour atteindre ces standards, les entreprises peuvent innover en adoptant des méthodes de biopréservation. Cette approche, qui se base sur l'utilisation de microorganismes bénéfiques ou de leurs produits métaboliques pour contrôler la croissance de



microorganismes indésirables responsables de la détérioration et de la contamination des aliments, est en forte croissance (Stiles, 1996). La biopréservation, contrairement aux méthodes traditionnelles de conservation des aliments, se fonde sur des mécanismes naturels et écologiques pour assurer la qualité et la sécurité alimentaire. Les bactéries lactiques (LAB) ont historiquement joué un rôle majeur dans cette approche (Crowley et al., 2013a). Leur capacité à acidifier leur environnement, grâce à une métabolisation rapide du lactose, et à produire des composés bactéricides tels que les bactériocines, font d'elle des candidates de choix pour la biopréservation. Elles sont utilisées comme cultures bioprotectrices par les industriels de plusieurs filières de l'industrie agroalimentaire (Buehler et al., 2018a). Elles ont montré leur efficacité antimicrobienne autant sur des fruits, que du pain ou encore du fromage (Gerez et al., 2009 ; Crowley et al., 2013b). Sur les fromages, des activités antagonistes contre certains pathogènes et agents d'altération, comme *Listeria monocytogenes* et *Clostridium tyrobutyricum*, ont été démontrées dans différentes publications (Callon et al., 2014 ; Câmara et al., 2019). Grâce à ces caractéristiques de biopréservation, des cultures de bactéries lactiques sont commercialisées et exploitées dans l'industrie laitière (Holdbac [DuPont Danisco], FreshQ [CHR Hansen]) (Leyva Salas et al., 2019). Ces cultures sont aujourd'hui très utilisées dans la fabrication de divers fromages : gouda, brie, edam, etc. Ces pratiques s'inscrivent dans la recherche de naturalité et la politique anti-gaspillage des industries fromagères.

L'enjeu économique est donc important vis-à-vis de ces cultures. Ces dernières années, des études ont permis la découverte de nouvelles souches présentant des qualités technologiques et antimicrobiennes utiles en transformation alimentaire. Pour cela les scientifiques se sont tournés vers les écosystèmes fromagers, et notamment celui des fromages au lait cru ou thermisé (Ceugniet et al., 2015; Fernandez et al., 2017; Buehler et al., 2018; Câmara et al., 2019). Les fromages au lait cru présentent une diversité microbienne plus importante que les fromages pasteurisés, apportant divers avantages, notamment vis-à-vis des arômes et de la texture, mais également de la lutte contre les contaminations microbiologiques (André et al., 2008).

Dans cette thèse, l'écosystème microbien de deux variétés de fromages ont été étudiés, soit un fromage à pâte pressée non cuite et un fromage à pâte molle à croûte lavée. Ces écosystèmes abritent une grande diversité microbienne, qui participe à leur typicité, et

représentent une opportunité de découvrir des candidats potentiels pour la biopréservation. Des candidats potentiels ont été isolés et caractérisés lors de cette étude.

# 1. Chapitre 1 : État des connaissances

## 1.1. Introduction sur le fromage

### 1.1.1. Historique et variétés de fromages

La transformation du lait en fromage est un procédé vieux de plusieurs milliers d'années (Fox, 2011). Ce processus est apparu comme un sous-produit de l'élevage laitier, permettant une plus longue conservation du lait et apportant une diversité dans l'alimentation humaine (Marcellino et Benson, 2013). Les communautés pastorales ont rapidement compris que le fromage était une source précieuse de nutriments, de protéines et de matières grasses qui pouvaient être stockées et consommées pendant les périodes de famine (Kindstedt, 2012). Le fromage est devenu un produit de consommation courante dans le monde entier. Chaque région a apporté sa propre influence culturelle, ses propres conditions d'élevage, dépendante par exemple du climat de chaque pays et de ses méthodes de fabrication spécifiques, donnant naissance à une grande variété de fromages. Le fromage est devenu un aliment emblématique dans de nombreuses cultures. Des pays comme la France, l'Italie et la Suisse sont réputés pour leurs fromages artisanaux de renommée mondiale, chacun ayant sa propre tradition et son savoir-faire (Fox et al., 2011).

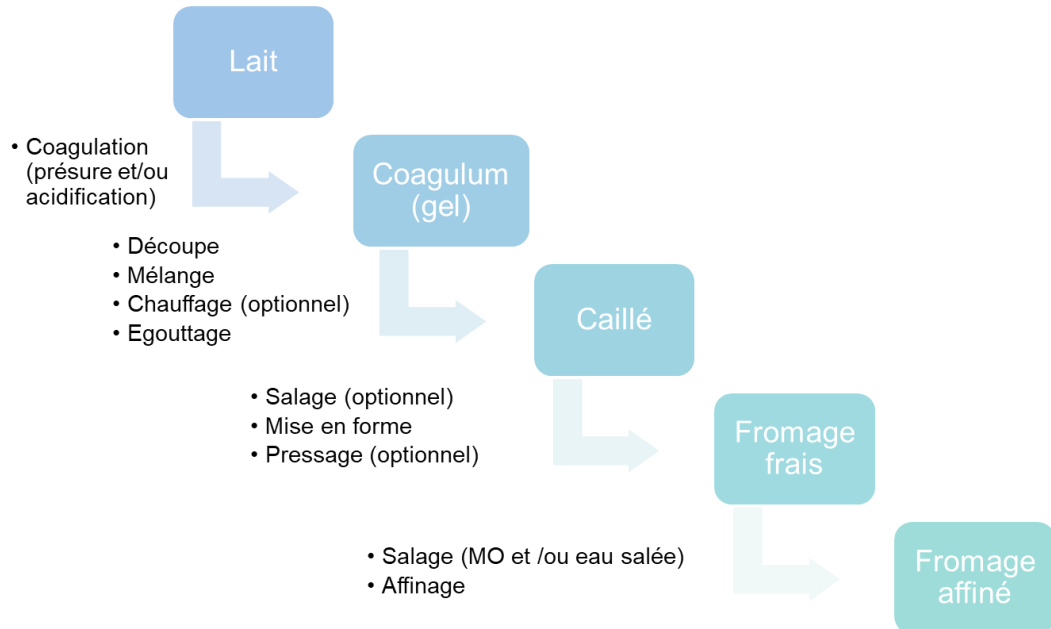
Aujourd'hui, dans le monde, environ mille types de fromages existent, voire plus en tenant compte des fromages fermiers non référencés, avec des textures, des saveurs et des arômes toujours plus divers. Cette diversité est permise notamment par la nature du lait, les étapes de production et des différents microorganismes impliqués dans la transformation du caillé en fromage. La fabrication du fromage est un savoir-faire qui continue d'évoluer, avec des fromagers innovants qui explorent de nouvelles techniques et combinent des saveurs pour créer des produits uniques. Que ce soit sous forme de Camembert français, de Mozzarella italienne ou de Cheddar anglais, le fromage reste un pilier de la gastronomie mondiale (Irlinger et al., 2015).

### 1.1.2. Du lait au fromage

Le constituant principal du fromage est le lait, pouvant provenir de plusieurs origines différentes (vache, chèvre, brebis, bufflone, yak, chamelle, ânesse, jument), supplémenté avec différents microorganismes, d'enzymes et de sel. Le lait peut être cru, thermisé ou pasteurisé, ces traitements thermiques ayant un impact sur la composition et les caractéristiques organoleptiques finales des fromages (Zheng et al., 2021). Le lait de vache est le plus utilisé dans la production de fromage (Almena-Aliste et Mietton, 2014). Il est constitué d'eau (87,6 %), de matière grasse (3,6 %), de lactose (4,7 %), de protéines (3,2 %, dont 80 % sont des caséines), de minéraux (Ca, K, Mg, Na) (0,8 %) et de vitamines (E, A, B12) (0,1 %) (Haug et al., 2007; Pereira, 2014).

Le terme fromage regroupe un nombre important de produits, il est défini par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (ONUAA/FAO) et par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme « un solide, frais ou maturé, ou un produit semi-solide obtenu par coagulation du lait, du lait écrémé, du lait partiellement écrémé, de crème, de crème de lactosérum, de babeurre, ou toute combinaison de ces produits, par l'action de présure ou de tout agent coagulant adapté, et par un égouttage partiel du lactosérum résultant de cette coagulation ». Cette définition permet de mettre en avant les différentes grandes étapes nécessaires à la création d'un fromage. La première étape est la transformation du lait en caillé par coagulation sous l'effet de la présure et/ou par acidification. Les micelles de caséine composant le lait sont alors déstabilisées et formeront un gel, qui finira par précipiter et former le coagulum. Une fois l'étape de coagulation terminée, le gel est découpé en plus ou moins grande taille et l'étape de l'égouttage commence. Cette dernière se caractérise par la contraction du caillé. Le lactosérum est expulsé du caillé, en plus ou moins grande quantité en fonction du fromage produit, c'est la synérèse. Le caillé est alors constitué en grande partie de caséines et de matières grasses. À la suite de la coagulation et de l'égouttage, le caillé va être mis en forme avant ou après salage. C'est lors de cette étape que le caillé peut être pressé afin d'éliminer davantage de lactosérum, ce qui permettra de produire des variétés de fromage avec un plus faible taux d'humidité. Une fois le tout complété, le fromage est placé dans des conditions environnementales (température et humidité) qui sont spécifique à la variété pendant une période plus ou moins longue. Il s'agit de l'étape d'affinage qui permet le développement des arômes et de l'apparence du fromage. Cette étape est aussi

responsable de la typicité du fromage sous l'action de microorganismes déjà présents dans le lait ou bien ajoutés lors des étapes de transformation ou encore sélectionnés par l'étape de salage ou provenant de l'environnement (Fox, 2011, Zheng et al., 2021).



**Figure 1.** Résumé des différentes étapes de fabrication d'un fromage (Fox, 2011, Zheng et al., 2021).

Il est possible de classer les différents types de fromages en cinq grandes catégories (Almena-Aliste et Mietton, 2014):

- Fromages frais (ex. Mozzarella)
- Fromage à pâte molle, non cuite, à croûte fleurie ou lavée (ex. Brie, Maroilles)
- Fromage à pâte pressée, non cuite, à croûte naturelle ou lavée (ex. Reblochon, Cheddar)
- Fromage à pâte pressée, cuite, à croûte lavée (ex. Comté)
- Fromage à pâte persillée (ex. Roquefort)

Ces différents types de fromages sont obtenus par l'utilisation de méthodes spécifiques, mais les microbiotes fromagers exercent également une grande influence sur les caractéristiques organoleptiques des fromages.

## 1.2. Écosystèmes fromager

Les microbiotes fromagers sont complexes et évoluent au cours du temps lors de la production et de l'affinage. Les activités des microorganismes vont induire des modifications physico-chimiques du lait puis du caillé qui seront à l'origine des caractéristiques organoleptiques des fromages (Montel et al., 2014). Différents microbiotes peuvent être identifiés dans un fromage en fonction de l'origine (primaire et secondaire) et de la localisation (cœur et croûte) (Ceugnietz, 2017).

### 1.2.1. Microbiote primaire

Le microbiote primaire est composé de microorganismes inoculés (ferments d'affinage) dans le lait, mais aussi du microbiote naturel du lait pour les fromages au lait cru. Ces microorganismes, essentiellement des bactéries lactiques, appartenant principalement aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*, vont permettre l'acidification du lait en quelques heures, par la production d'acide lactique à partir du lactose, étape indispensable à la coagulation. Par leurs activités métaboliques, ces bactéries vont générer des composés aromatiques ou leurs précurseurs, nécessaires au développement de certaines saveurs (Broome et al., 2011; Carafa et al., 2019). Par ailleurs, certaines souches microbiennes (bactéries, levures ou moisissures) seront inoculées dans le seul but de s'assurer du bon déroulement de la maturation du fromage, il s'agit du ferment d'affinage. Il est également possible d'ajouter, en même temps que les ferments d'affinage, des souches présentant un intérêt technologique et pouvant avoir des propriétés antimicrobiennes ou probiotiques. Cette culture va être définie comme auxiliaire, car elle ne participe pas uniquement à l'acidification du milieu, mais peut contribuer aux caractéristiques organoleptiques du fromage. *Lacticaseibacillus rhamnosus* est un exemple de souche commercialisée pour ses propriétés de bioprotection (Makki et al., 2020). La connaissance des activités de ces microbiotes est une information primordiale pour les industriels, puisque cela permet la standardisation des fromages par le choix et les concentrations de chaque microorganisme inoculé (Silva et al., 2018; Bettera et al., 2023).

### 1.2.2. Microbiote secondaire

Le microbiote secondaire est, lui, non inoculé volontairement et ne provient pas du lait. Il présente une diversité plus importante que le microbiote primaire et participe à la typicité des fromages (Irlinger et Mounier, 2009). Ce microbiote sera d'autant plus complexe pour les fromages au lait cru (en opposition au lait pasteurisé) et ceux fabriqués dans des conditions artisanales (Bettera et al., 2023). La composition de ce microbiote est fortement influencée par la localisation géographique, le processus de fabrication et les pratiques d'hygiène et d'affinage des fromages. En conséquence, chaque fromage peut développer une signature microbiologique unique, contribuant à sa spécificité et à ses caractéristiques propres (Montel et al., 2014). Au cœur des fromages de n'importe quel type, les bactéries lactiques sont majoritaires, en raison des conditions d'anaérobiose et de pH bas. Les écosystèmes de surface représentent de manière plus significative la typicité des fromages et sont, dans la majorité des variétés fromagères, plus diversifiés (Bettera et al., 2023).

### 1.2.3. Microbiote typique pour des fromages à pâte ferme et à croûte lavée

Les fromages à croûte lavée sont principalement composés de bactéries à Gram positif telles que *Micrococcus* sp., *Streptococcus* sp. et d'espèces corynéformes comme *Corynebacterium* sp., ainsi que de bactéries à Gram négatif, telles que *Psychrobacter* sp. (Brennan et al., 2002). Les bactéries corynéformes représentent 75 – 95 % de l'écosystème bactérien de surface et donnent une couleur orangée typique des fromages à croûte lavée (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001; Cogan et al., 2014). Ces genres bactériens, ainsi que *Staphylococcus*, *Brevibacterium* et *Microbacterium* font partie du microbiote secondaire du fromage et contribuent fortement aux caractéristiques organoleptiques du fromage à croûte lavée. Ces genres participent au processus d'affinage par la production de protéinases et lipases extracellulaires, de pigments et de composés aromatiques (Bockelmann et al., 1997; Brennan et al., 2002; Deetae et al., 2007 ; Ritschard et al., 2018). Les solutions de soin appliquées à la surface du fromage lors du frottage et indispensables à l'affinage des fromages à croûte lavée, sont souvent inoculées avec *Brevibacterium linens*, considéré comme culture d'affinage. Cependant, l'écosystème évoluant au cours de la période d'affinage, cette espèce est rarement

retrouvée en fin d'affinage, étant le plus souvent remplacée par le microbiote secondaire (Giuffrida et al., 2020). La teneur en sel de la croûte favorisera les bactéries corynéformes et les bactéries à Gram négatif, tandis que le développement de levures permettra l'alcalinisation du milieu (Irlinger et Monnet, 2021). Les mycètes présents à la surface du fromage jouent aussi un rôle important lors de l'alcalinisation du milieu en assimilant le lactate et en produisant des métabolites alcalins, notamment l'ammoniac (Gori et al., 2013). Les principaux responsables de cette augmentation du pH dans différents types de fromages à croûte lavée sont *Geotrichum candidum*, *Fusarium domesticum* et *Debaryomyces hansenii*. Ces fungi prospèrent dans l'environnement très humide de la salle d'affinage et peuvent se développer dans un milieu ayant une forte teneur en sel (Montel et al., 2014). La teneur élevée en sel à la surface du fromage favorise également la croissance de bactéries habituellement présentes dans des environnements marins, tel qu'*Halomonas* spp., *Marinomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. et *Vibrio* spp. (Feurer et al., 2004; Ritschard et al., 2018).

#### 1.2.4. Microbiote typique pour des fromages à pâte pressée non cuite

Les fromages à pâte pressée non cuite ne subissent pas de traitement particulier en surface lors de l'affinage. Dans le centre du fromage, le pressage de la pâte chasse l'oxygène du cœur du fromage, empêchant les moisissures de se développer dans cet environnement anaérobie (Marcellino et Benson, 2013). Par conséquent, l'écosystème dans le cœur du fromage est principalement composé de levures, telles que *Candida* sp., et de bactéries lactiques qui peuvent se développer dans des conditions anaérobies ou micro-aérophile (Polke et al., 2015). La diversité fongique et bactérienne dans le cœur du fromage sera donc faible et proviendra principalement de l'environnement de la ferme et du microbiote natif du lait utilisé pour la fabrication du fromage, ainsi que des ferments d'affinage inoculés lors de la fabrication (Irlinger et al., 2015 ; Bintsis, 2021). Si les fromages ne sont pas affinés dans un emballage sous-vide, il est fréquent de retrouver en surface diverses levures et moisissures comme *Penicillium* sp. et *Geotrichum* sp., donnant un aspect blanchâtre. Ces mycètes sont favorisés par l'humidité élevée de la salle d'affinage ou de la cave, ainsi que par la présence de fromages plus anciens où le microbiote de surface s'est déjà développé (Bodinaku et al., 2019; Jurado et Vicente, 2020). Certains



fromages à pâte pressée non cuite sont affinés en condition anaérobie, comme le Cheddar, ce qui limite le développement de moisissures à la surface (Choi et al., 2020).

#### 1.2.5. Écosystème contaminant

Le fromage est un aliment produit par la combinaison de l'action de différents microorganismes. Ces microorganismes sont considérés comme un microbiote positif et sans danger pour la santé humaine. Toutefois un microbiote indésirable peut croître et entraîner des répercussions tant au niveau économique, avec des microorganismes altérant les caractéristiques organoleptiques, que sur la santé humaine, avec des bactéries ou fungi pathogènes.

##### 1.2.5.1. *Agents d'altération*

Les levures et moisissures sont les principaux agents d'altérations des fromages. Lorsqu'ils se retrouvent accidentellement sur les fromages, ces mycètes vont avoir un impact négatif sur les caractéristiques (aspect, texture, goût et arômes) de la croûte et du cœur du fromage. Également, ces microorganismes influenceront le développement des différents microorganismes positifs intervenant lors de la production et l'affinage des fromages (Jurado et Vicente, 2020). Les champignons les plus souvent décrits dans la littérature comme indésirables (pour les types de fromages de ces travaux) sont *Penicillium commune*, *Mucor racemosus*, *Yarrowia lipolytica* ou encore *Cladosporium* spp. (Garnier et al., 2017b; Leyva Salas et al., 2017; Correa et al., 2019; Jurado et Vicente, 2020). Une altération du produit peut être caractérisée par une production de saveurs non voulues, de gaz, une décoloration, un brunissement ou encore un changement de texture (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Toutefois des levures ou champignons qui sont décrits comme intéressants pour un type de fromage peuvent se révéler délétères pour une autre variété. Par exemple *Penicillium camemberti*, indispensable dans l'écosystème du camembert, sera considéré comme une contamination dans un fromage frais (Leyva Salas et al., 2017), et une concentration trop importante d'une même espèce de fungi peut devenir une source d'altération et modifier le processus d'affinage (Ceugniet, 2017). En effet, la présence de levures en trop grande quantité peut modifier la croissance et le métabolisme des autres microorganismes déjà présents, ainsi

que le pH, permettant de rendre la matrice fromagère favorable à la croissance de pathogènes déjà présents en faible quantité (Fröhlich-Wyder et al., 2019).

#### 1.2.5.2. *Agents pathogènes*

Les microorganismes pathogènes dans les fromages sont majoritairement des bactéries. Plusieurs études sur l'origine, les modes de contaminations et les solutions pour limiter leurs proliférations ont été réalisées et ces problématiques continuent d'être traitées puisque des toxi-infections sont rapportées périodiquement lors de la consommation de fromages. Dans la littérature, certaines bactéries ont pu être identifiées comme les pathogènes les plus fréquents liés aux fromages, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en sont des exemples (Cogan, 2011; Ganz et al., 2020; Dos Santos Rosario et al., 2021).

*L. monocytogenes* est une bactérie à Gram positif principalement présente dans les fromageries artisanales où les normes d'hygiène et de sécurité sont insuffisamment respectées. Cette bactérie pose un problème significatif, car elle est responsable de la listériose, une maladie pouvant entraîner une septicémie ou une infection du système nerveux central. Chez les femmes enceintes, elle peut provoquer des complications graves telles qu'un avortement, un accouchement prématuré ou une infection néonatale sévère. En France, cette maladie reste rare avec une incidence de 5 à 6 cas par million d'habitants, mais elle est mortelle dans 30 à 40 % des cas en dehors de la grossesse, et dans plus de 95 % des cas, elle nécessite une hospitalisation (Barría et al., 2020).

Les contaminations par *E. coli* O157:H7 sont étroitement surveillées en raison de sa forte association avec des cas d'intoxication alimentaire, particulièrement pour les fromages au lait cru ou en cas de mauvaise production. Cette souche spécifique d'*E. coli* est réputée pour sa pathogénicité et a la capacité de déclencher des infections graves, notamment des syndromes hémolytiques et urémiques, qui peuvent entraîner des dommages aux reins et d'autres complications sévères (Bryan et al., 2015). Ceci est dû à la production par cette souche d'une toxine redoutable, la Shiga toxine, qui est à l'origine de diverses affections telles que des colites hémorragiques et le syndrome hémolytique et urémique (Dos Santos Rosario et al., 2021).

Enfin, *S. enterica* dans le fromage est un problème de sécurité alimentaire sérieux (Bedassa et al., 2023; Gurtler et al., 2018). *S. enterica* est une bactérie qui peut provoquer des infections gastro-intestinales chez les humains, entraînant des symptômes tels que des nausées, des vomissements, des diarrhées, des crampes abdominales et de la fièvre. Les personnes âgées, les jeunes enfants, les femmes enceintes et les individus immunodéprimés sont particulièrement vulnérables aux infections à *Salmonella*. Cette bactérie est largement retrouvée dans les environnement laitier (Herrero-Fresno & Olsen, 2018).

D'autres espèces bactériennes peuvent être dangereuses pour la santé humaine lorsqu'elles se retrouvent en trop grande quantité sur un fromage. C'est le cas de *S. aureus* qui peut contaminer les fromages lors de la production, lorsque les travailleurs de l'industrie alimentaire manipulent le fromage avec des mains non lavées, entraînant le transfert de bactéries (Walcher et al., 2014). Les symptômes courants incluent des nausées, des vomissements, des crampes abdominales et de la diarrhée, se manifestant généralement quelques heures après la consommation du fromage contaminé (Cheung et al., 2021). Pour prévenir la contamination, il est essentiel de maintenir des normes d'hygiène strictes pendant la production et la manipulation du fromage (Al-Nabulsi et al., 2020).

Enfin *P. aeruginosa*, est une autre bactérie contaminante, elle peut proliférer dans les fromages à haute teneur en eau et causer une dégradation de la qualité du produit, notamment en produisant des odeurs et des saveurs indésirables (Al-Gamal et al., 2019). Les pratiques d'hygiène rigoureuses et le contrôle de l'humidité pendant la production sont essentiels pour prévenir la contamination. Les consommateurs doivent également surveiller les signes de détérioration du fromage comme une coloration anormale de la surface ou encore l'apparition d'une odeur de pourriture, synonyme d'une contamination par *P. aeruginosa* (de Araújo et al., 2017).

Le contrôle de ces différents pathogènes est un réel défi pour les industriels laitiers, mais également pour les agences gouvernementales qui publient régulièrement des études sur la prévalence de ces infections et essayent, par la mise en place de normes et de conseils, de réduire le nombre d'intoxications alimentaires (Cogan, 2011; Fox et al., 2017).

### 1.3. Contrôle des contaminants laitiers

#### 1.3.1. Stratégies de contrôle des contaminants du lait

Les efforts pour réduire l'altération des produits laitiers ont longtemps été axés sur la prévention de la contamination lors de la transformation des produits. La réduction de la contamination microbienne par le nettoyage et l'assainissement a un impact significatif sur la durée de conservation des produits laitiers (Gruetzmacher et Bradley, 1999). Cela implique notamment l'utilisation d'un détergent adapté et de produits assainissants efficaces contre les microorganismes problématiques afin de réduire et contrôler la formation de biofilms sur les équipements laitiers (Knight, 2015). Les biofilms constituent une source majeure de contamination des produits laitiers pendant la transformation, et leur élimination une fois établie s'avère difficile (Bremer et al., 2015). Bien que les procédures de nettoyage et d'assainissement aient progressé grâce à des avancées dans la conception sanitaire des équipements et à l'utilisation de nouveaux produits chimiques, d'autres stratégies sont explorées pour minimiser la contamination microbienne dès la production laitière à l'exploitation agricole ainsi qu'à l'usine de transformation.

Une des premières stratégies est de garantir la qualité du lait cru puisque celle-ci a un impact direct sur la conservation et l'altération du fromage. Les spores bactériennes et les bactéries sporulées sont responsables de la détérioration des produits laitiers, causant dans plusieurs variétés des défauts de gonflement des fromages par la production indésirée de gaz dans la masse fromagère (Qian et al., 2022). Les spores bactériennes proviennent majoritairement des exploitations laitières et survivent tout au long du processus de transformation étant donné la résistance intrinsèque à la chaleur des spores bactériennes (S. C. Murphy et al., 2016). Des études ont analysé les pratiques agricoles, notamment au niveau de l'entretien des litières, de l'alimentation et de la salle de traite, et ont montré que ce sont des environnements propices à la transmission des spores vers le lait cru (Murphy et al., 2019; Martin et al., 2019). Des méthodes visant à réduire la transmission de spores dans le lait cru, comme le nettoyage approprié des trayons avant la traite ou une meilleure gestion du transport de lait vers la fromagerie, se sont révélées efficaces pour réduire le nombre de spores présentes dans le lait cru (Martin et al., 2021).

Pour le contrôle des spores, des traitements physiques peuvent être aussi appliqués à l'usine de transformation, comme la bactofugation et la microfiltration du lait. La bactofugation, repose sur une centrifugation à grande vitesse pour séparer les composants du lait selon leur densité. Cette méthode peut éliminer jusqu'à 98 % des spores bactériennes et est utilisée en routine dans la grande majorité des procédés de transformation où les fromages produits sont sensible au défaut de gonflement tardif (Damerow, 1970). La microfiltration, quant à elle, utilise des membranes semi-perméables pour séparer les bactéries et les particules en fonction de leur taille, avec des taux d'élimination bactérienne allant jusqu'à 99,99 % (Gésan-Guiziou, 2010). Ces technologies permettent de prévenir les altérations et les défauts de qualité sans avoir recours à des conservateurs tels que les nitrates ou le lysozyme.

De plus, l'optimisation des procédés de transformation, tels que la pasteurisation à des températures spécifiques, peut également contrôler la prolifération des microorganismes d'altération (Johnson, 2017). Au cours des récentes années, la préoccupation croissante en matière de sécurité alimentaire et le désir de prolonger la durée de conservation du lait de consommation ont conduit de nombreux transformateurs laitiers à adopter des températures de pasteurisation HTST (Haute Température, Courte Durée) supérieures aux exigences minimales établies par *Pasteurized Milk Ordinance*, qui stipule une température de 72 °C pendant 15 secondes (Martin et al., 2012).

Ranieri et al. (2009) ont mis en évidence que le lait de consommation pasteurisé à 85,2 °C présentait une croissance bactérienne significativement plus élevée lors du stockage réfrigéré par rapport au lait pasteurisé à 72,9 °C. Une étude similaire réalisée dans une installation de transformation commerciale de lait de consommation a montré que la réduction de la température de pasteurisation de 79,4 à 76,1 °C avait pour résultat une diminution de la croissance bactérienne pendant la période de conservation au réfrigérateur (Martin et al., 2012). Cette optimisation de la température de pasteurisation ne présente pas seulement l'avantage de réduire la détérioration des produits laitiers et donc le gaspillage alimentaire, mais elle offre également des avantages économiques et environnementaux. En effet, abaisser la température de pasteurisation du lait de consommation est une mesure facile à mettre en œuvre qui nécessite moins d'énergie, ce qui permet d'économiser les ressources de l'entreprise de transformation laitière. Ainsi, en ajustant soigneusement les paramètres de pasteurisation, les fabricants peuvent

améliorer la qualité et la durée de conservation de leurs produits tout en contribuant à une gestion plus durable des ressources (Johnson, 2017).

### 1.3.2. Stratégies de contrôle des contaminants dans le fromage

La mise en place de normes d'hygiène et de sécurité lors de la fabrication permet de réduire les contaminations des fromages provenant de l'environnement immédiat de l'atelier de transformation. Une fois le produit terminé, l'utilisation de nouvelles techniques d'emballages permet également de réduire la post-contamination, par exemple, en utilisant l'emballage sous vide pour le Cheddar (Brown et al., 2018). Afin de faire le suivi des actions posées, des modèles mathématiques prédictifs ont également été développés, pour permettre de prédire la durée de conservation et d'altération des produits, ainsi que l'impact des stratégies d'intervention sur ces résultats (Buehler et al., 2018b).

Enfin, afin de limiter la croissance des contaminants bactériens et fongiques dans le fromage, l'emploi de conservateurs chimiques comme le sorbate de potassium et la natamycine ont largement été utilisés. Toutefois les consommateurs demandent des produits sans additifs chimiques, ayant des craintes plus ou moins fondées pour leur santé. C'est pourquoi l'industrie fromagère s'est tournée vers l'utilisation de culture bioprotectrices en remplacement de conservateurs chimiques (Irlinger et Mounier, 2009). Parmi les souches bioprotectrices, les bactéries lactiques, notamment *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* (anciennement *Lactobacillus paracasei* et *Lacticaseibacillus rhamnosus* (anciennement *Lactobacillus rhamnosus*), sont couramment utilisées dans les fromages pour cette fonction (Lačanin et al., 2017). Les bactéries lactiques sont les microorganismes les plus couramment utilisés comme agents bioprotecteurs et ont obtenu le statut de « généralement reconnu comme sûr » (GRAS, *generally recognised as safe*) ou de « présomption qualifiée de sécurité » (QPS) aux États-Unis et dans l'Union Européenne, respectivement. Elles ont été étudiées pour leurs capacités à inhiber efficacement les contaminants fongiques dans les produits laitiers, notamment grâce à leur activité de compétition pour les nutriments comme le manganèse (Siedler et al., 2020). D'autres études ont également démontré leur pouvoir antibactérien contre *L. monocytogenes* et sur *C. tyrobutyricum* (Millet et al., 2006). Toutefois la connaissance

de la composition du microbiote fromager et des interactions entre les membres de la communauté microbienne est une voie de plus en plus explorée afin de trouver de souches ayant des activités de biopréservation natives. Il a été montré que la diversité présente dans le lait cru a un pouvoir intrinsèque de protection du lait envers les contaminants (Wolfe et al., 2014). Cela s'explique par une saturation du milieu empêchant l'implantation d'autres microorganismes que ceux qui sont déjà présents, la diversité apportée par l'utilisation de lait cru diminue le développement de pathogènes ou d'agents d'altérations (André et al., 2008). Afin d'amplifier ce phénomène et de contrôler dans le temps l'évolution de l'écosystème fromager, les souches d'affinage sont de plus en plus utilisées. Elles sont d'autant plus employées dans les fromages au lait pasteurisé, dont l'écosystème laitier a été partiellement détruit par la pasteurisation (Irlinger et Mounier, 2009).

#### 1.4. Les techniques -OMIQUES pour la description des microbiotes

L'étude des microbiotes de tous les écosystèmes peut être réalisée de différentes manières, soit par des techniques dites phénotypiques, caractérisées par la mise en culture des microorganismes du produit étudié, soit à partir d'analyses moléculaires (Ceugniz, 2017). Les analyses moléculaires modernes se basent en particulier sur la métagénomique, définie par l'étude du matériel génétique des composés d'un écosystème. Elle a été utilisée au départ dans l'étude d'échantillons environnementaux, afin de déterminer les génomes de tous les microorganismes cultivables ou non cultivables présents (Handelsman et al., 1998). Les approches de la métagénomique permettent d'identifier les différents microorganismes (le plus souvent au niveau de la famille ou du genre) qui sont présents dans un écosystème donné en séquençant l'ADN total de l'échantillon et en déterminant l'abondance relative des membres de l'écosystème (cette approche est davantage détaillée dans la section 1.4.2 et 1.4.3).

En parallèle de l'étude de la composition, il est aussi souvent intéressant de déterminer l'activité des microorganismes présents dans un écosystème. Ainsi, les approches de métatranscriptomique permettent l'étude des ARNm transcrits qui sont présents dans un échantillon donné. Dans ce cas, il est possible de connaître les gènes transcrits à un niveau élevé et ceux qui le sont peu ou pas. Ce type d'approches permet de mettre en évidence

les relations entre les différents membres d'une communauté microbienne et de comparer les activités des microorganismes dans deux écosystèmes différents. À la suite de l'identification des gènes transcrits, il est possible d'établir les interactions biochimiques possibles dans des conditions données (Lessard, 2014; Alves et al., 2018; de Abreu et al., 2020).

Les approches métagénomiques et métatranscriptomiques permettent aujourd'hui de mettre en lumière la complexité des microbiotes et leurs dynamiques fonctionnelles. Ces approches sont donc utilisées dans divers domaines d'étude, incluant des aliments fermentés comme le fromage, le kéfir ou encore de la viande fumée, des écosystèmes environnementaux ou encore le microbiote humain (Almeida et al., 2019; Shikha et al., 2021). Enfin, depuis deux décennies, les approches de métabolomique ont également été développées afin de compléter la compréhension de l'activité des organismes identifiés par la métagénomique et la métatranscriptomique. La métabolomique, également appelée profilage des métabolites, vise à détecter les changements globaux des métabolites dans un système biologique. Ce concept puissant permet d'observer la régulation du réseau métabolique et a pour but d'améliorer la compréhension des réseaux biologiques (Weckwerth et Fiehn, 2002; Alawiye et Babalola, 2021). Ces métabolites, dans le cas d'un produit comme le fromage, peuvent être métabolisés à la suite de l'activité microbienne dans le produit (Afshari et al., 2020). Par exemple l'étude de Tzora et al., (2022) a permis de mettre en lumière l'impact de l'alimentation d'un troupeau de moutons sur le microbiote et le métabolome d'un fromage bien spécifique, à savoir le Kefalograviera, un fromage grec bénéficiant de l'Appellation d'Origine Contrôlée (AOC). Cette étude a identifié plus de 120 métabolites qui ont été minutieusement associés au profil métagénomique, dans le but d'évaluer l'influence du changement de régime alimentaire sur les caractéristiques des fromages produits. Cette approche foodomique a permis d'identifier des biomarqueurs métabolomiques tels que l'arabinose, le dulcitol, l'hypoxanthine, l'acide itaconique, la L-arginine, la L-glutamine et l'acide succinique, ainsi que des biomarqueurs métagénomiques tels que *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc falkenbergense* et *Levilactobacillus brevis*. Ces biomarqueurs offrent un potentiel considérable pour la prédiction, l'amélioration et le contrôle des caractéristiques des fromages, ouvrant ainsi la voie à des avancées significatives dans le domaine de la production fromagère.

Les approches -OMICS ont été utilisées pour explorer divers aspects de la biopréservation, tels que la sélection et la caractérisation des cultures protectrices, ainsi



que l'investigation des mécanismes sous-jacents à l'effet protecteur et à l'impact sur les communautés microbiennes dans les denrées alimentaires (Borges et al., 2022).

#### 1.4.1. Utilisation des technologies NGS « *Next Generation Sequencing* »

La première méthode de séquençage de l'ADN est apparue dans les années 70, avec la méthode de Sanger. Cette méthode était techniquement limitée, et se concentrait sur le séquençage des régions d'intérêts (Verma et al., 2017; Kumar et al., 2019). De nouvelles techniques de séquençage ont donc été mises au point. Au début du XX<sup>e</sup> siècle est apparu le « *Next Generation Sequencing* » (NGS) ou séquençage de nouvelle génération. Ces nouvelles méthodes ont permis de réaliser de grandes avancées dans le domaine du séquençage, notamment vis-à-vis de la vitesse d'obtention des séquences et la réduction globale des coûts de séquençage (Kumar et al., 2019). Les NGS sont capables de séquencer des milliers à des millions de molécules d'ADN ou d'ARN de manière simultanée à haut débit. C'est ainsi qu'aujourd'hui les NGS sont utilisées dans différentes applications, comme le séquençage du génome entier, pour de l'analyse de l'évolution moléculaire, des interactions d'un écosystème, la résolution d'affaire criminelle, dans l'étude d'échantillons de fossiles, etc. (Verma et al., 2017; Kumar et al., 2019; McCombie et al., 2019).

Au sein des NGS, il est possible d'identifier deux groupes, les méthodes de séquençage de deuxième génération basées sur le séquençage de « *short read* » et celle de troisième génération définie comme une méthode de séquençage de « *long read* » en temps réel (Kumar et al., 2019). Pour ces deux groupes, le protocole reste similaire et est basé sur trois étapes : la préparation des échantillons, le séquençage des acides nucléiques et l'analyse des données (Goodwin et al., 2016). Les « *reads* » sont des lectures acquises lors du séquençage de l'ADN (ou de l'ADNc) qui sont obtenues lors de la réaction de séquençage. En fonction de la technologie utilisée, cette lecture de la séquence de l'ADN sera plus ou moins longue variant de 100 à 600 paires de bases (pb) pour la technologie Illumina à plusieurs dizaines de milliers de pb pour la technologie nanopore (Chaitankar et al., 2016; Breitwieser et al., 2017; Pervez et al., 2022). La longueur des « *reads* » aura donc une incidence sur les informations qu'il est possible d'obtenir de cette lecture mais aussi dans l'assemblage de toutes les lectures obtenues lors du séquençage. Plus un

« *read* » est court, plus il sera difficile d’y associer une information taxonomique précise. Cependant, plus le nombre de séquences générées par l’appareil de séquençage est important, plus la méthode sera considérée comme sensible, c’est-à-dire qu’elle sera capable d’identifier la quasi-totalité des organismes présents, même ceux minoritaires (Pervez et al., 2022). C’est sur ces deux paramètres que les deux générations de séquençage diffèrent, et que le choix de la technologie repose. Dans le tableau 1 est résumé l’ensemble des technologies NGS actuellement disponible (Goodwin et al., 2016; Weirather et al., 2017; Kumar et al., 2019; McCombie et al., 2019; Fukasawa et al., 2020; Pei et al., 2020; Liu et al., 2021; Pervez et al., 2022).

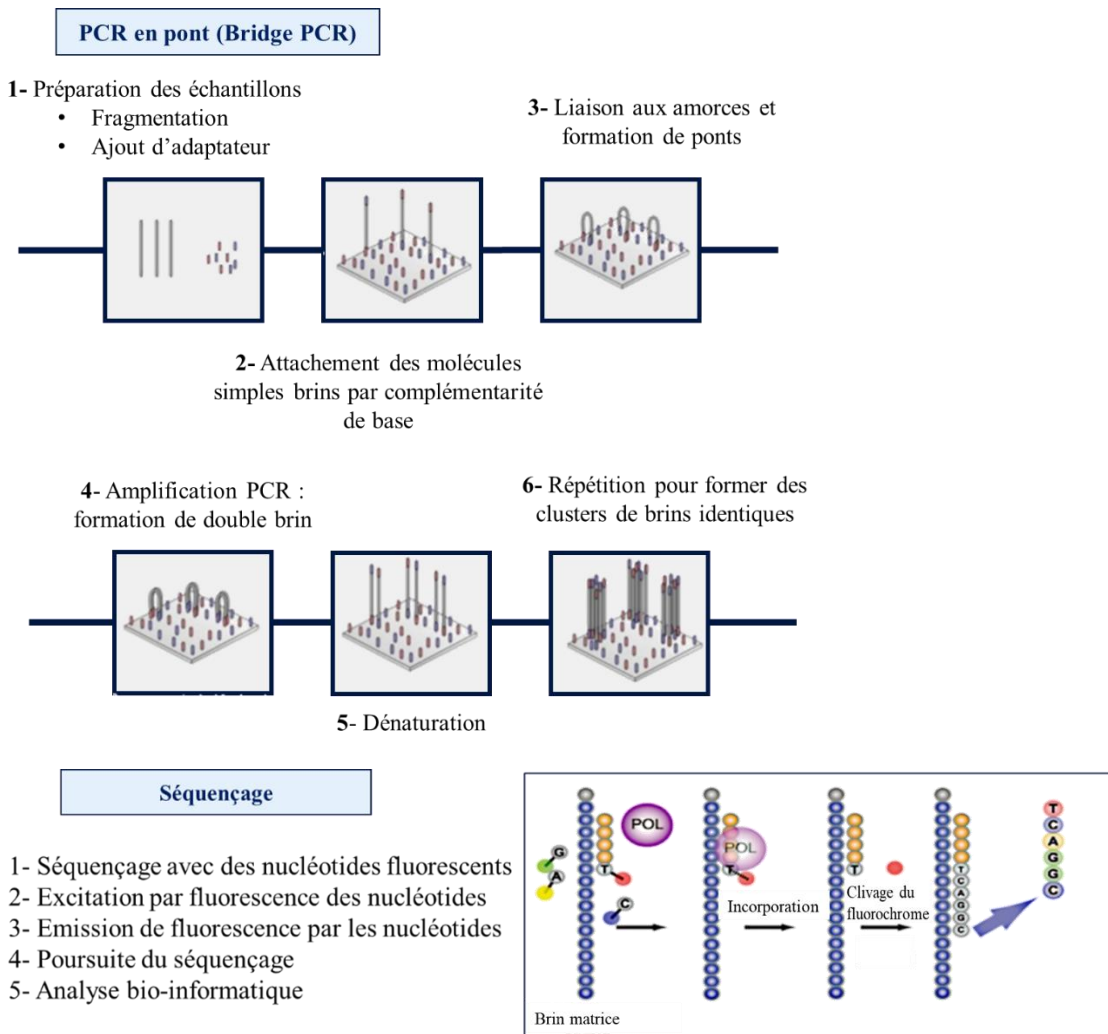
**Tableau 1** Récapitulatifs des avantages et des désavantages des technologies NGS actuellement disponibles (adapté de Pervez et al., 2022).

	Avantages / Inconvénients	Technologies	Méthodologies
NGS de 2 <sup>e</sup> génération	Séquençage de " <i>short read</i> ", haute fiabilité, peu cher, mais besoin d'une étape d'assemblage	454	Pyroséquençage (Fluorescence)
		Illumina	Incorporation de nucléotides fluorescents d'arrêt
		Ion Torrent	Mesure d'un courant électrique spécifique d'un nucléotide
		SoLiD	Séquençage par ligation
		Nanoball Sequencing	Pyroséquençage (Fluorescence) par réplication circulaire
NGS de 3 <sup>e</sup> génération	Séquençage de " <i>long read</i> ", obtention d'un transcrit entier, détection des modifications épigénétiques, mais cher, moins bonne fiabilité que les NGS 2 <sup>e</sup> génération	SMRT (Pac Bio)	Mesure de signaux lumineux émis lors de l'incorporation des nucléotides
		Nanopore Sequencing (MinIon, PromethION)	Mesure d'un courant électrique spécifique d'un nucléotide
	Séquençage <i>in situ</i> , en temps réel sans amplification, observation de la distribution spatiale des lectures d'ADN, plusieurs cellules analysées en même temps.		

La technologie utilisée la plus fréquemment pour le séquençage du microbiote fromager, est la technologie Illumina (MiSeq ou HiSeq). Cette méthode s'est imposée dans le monde par son faible coût et son haut rendement. Elle est basée sur le principe de « séquençage par synthèse » (Chaitankar et al., 2016). Le séquençage par Illumina est composé de trois grandes étapes, soit [i] la construction d'une librairie, [ii] l'amplification clonale de la librairie par PCR « bridge » en phase solide et [iii] le séquençage par synthèse.

La première étape du séquençage utilisant la technologie Illumina est la construction de la *librairie* qui est réalisée par la fragmentation de l'échantillon d'ADN et à la ligation d'adaptateurs à ces fragments nouvellement formés. Une fois la *librairie* créée, une amplification de chaque fragment a lieu, générant une multitude de *clusters*. Un *cluster*

étant le regroupement de copies d'un même fragment. Le *cluster* est conçu par l'hybridation des amplicons à une puce à ADN. Sur cette puce les brins complémentaires aux fragments de la librairie vont être synthétisés, et vont à leur tour s'hybrider à la puce ADN et servir de modèle à la synthèse de brins d'ADN. Cette opération va se répéter un certain nombre de fois (environ 24 fois), les brins antisens sont alors éliminés, le cluster est généré et est formé de brins d'ADN identiques. Le séquençage par synthèse peut commencer. Des amorces s'hybrident, permettant de débiter l'élongation en présence de nucléotides terminateurs réversibles fluorescents. Lorsque le nucléotide couplé à un fluorophore est ajouté, un signal lumineux est émis et pourra être interprété par une caméra. Sur toute la plaque, des nucléotides vont émettre un signal fluorescent, l'ensemble de ces signaux est compilé afin de connaître la séquence de chaque fragment (Fig. 2) (Hu et al., 2021; Pervez et al., 2022) .



**Figure 2.** Résumé des différentes étapes du séquençage Illumina (van Dijk et al., 2018)

#### 1.4.2. Métabarcoding et traitement bio-informatique

Dans les approches -OMIQUES utilisées pour obtenir le profil du microbiote des fromages, le métabarcoding est l'une des approches parmi les plus utilisées. Le métabarcoding permet d'associer les courtes séquences obtenues à des gènes marqueurs spécifiques permettant d'effectuer une association taxonomique. Le plus souvent les gènes marqueurs sont les gènes codants pour les sous-unités ribosomiques ou les régions variables entre ces gènes. Une fois les séquences obtenues, les identifications sont réalisées par la comparaison des séquences avec une banque de données (Alves et al., 2018). L'utilisation du métabarcoding permet ainsi l'identification des microorganismes présents dans des écosystèmes complexes et leur proportion relative, tel que le fromage (Staats et al., 2016).

La région d'ADN ciblée doit répondre à plusieurs critères pour être considérée comme un bon biomarqueur taxonomique. Elle doit être ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle doit être présente chez tous les microorganismes étudiés et posséder une haute interspécificité afin de discriminer les différentes espèces présentes (McCombie et al., 2019). Aussi, elle doit avoir une longueur adéquate (environ 500 pb) pour être amplifiée et séquencée correctement (Kress et Erickson, 2008). Il existe aujourd'hui des régions cibles reconnues dans la communauté scientifique. La région cible la plus utilisée pour les bactéries est la région de l'ADNr 16S, à l'intérieur de la petite sous-unité ribosomique (Câmara et al., 2019). Plus précisément, les régions variables V3-V4 et V6-V8 sont les plus utilisées (Raymond-Fleury et al., 2022). Pour les microorganismes eucaryotes, et notamment les *fungi*, les régions ciblées sont les régions transcrites entre les gènes codants pour les sous-unités ribosomales, soit les ITS1 et ITS2 (Geronikou et al., 2020). La région ITS2 est souvent sélectionnée pour la technologie Illumina, et a été utilisée pour ce projet. En effet grâce à sa proximité avec la grande sous-unité ribosomique, à sa haute variabilité interspécifique et à la présence d'un grand nombre de séquences de cette région dans les bases de données, elle permet une meilleure identification taxonomique (Raymond-Fleury et al., 2022).

L'analyse de toutes ces données de séquençage est permise par des logiciels bio-informatique qui sont utilisés en chaîne et qui sont souvent nommés *pipelines*. Afin d'arriver à un résultat final, les données subissent différentes étapes séquentielles de

nettoyage et d'assignation, pour identifier les séquences correctement. Il est possible de découper le traitement des données en grandes étapes (Bennett, 2004; Bik et al., 2012), soit [i] le nettoyage des séquences et contrôle de la qualité, par le retrait des amorces et la suppression du bruit de fond et [ii] l'identification, par regroupement en Unité Taxonomique Opérationnelle (OTU) ou en Variant de Séquence d'Amplicon (ASV) et comparaison à une banque de données.

### 1.4.3. Applications des études -OMIQUES pour les fromages

L'exploration approfondie de la dynamique et de l'évolution des consortiums microbiens complexes lors de la fabrication et de l'affinage du fromage est d'une importance capitale pour appréhender leur rôle dans les caractéristiques sensorielles du produit final. L'intégration de multiples approches méta-OMIQUES, associées à de puissantes méthodes d'analyse statistique, a permis une caractérisation fonctionnelle détaillée du microbiote fromager, ainsi que l'identification de sa contribution au développement de métabolites d'intérêts (Anastasiou et al., 2022).

#### 1.4.3.1. *Les approches métagénomiques et de métabarcoding dans l'analyse des fromages*

Pour ce qui est des fromages, les approches de métabarcoding ont permis d'identifier les écosystèmes fromagers typiques, participant à la stabilité de la qualité de certains fromages québécois de terroir (Raymond-Fleury et al., 2022). Les mêmes approches appliquées aux microbiotes fromagers ont également aidé à mettre en évidence la grande diversité microbienne composant les fromages et à montrer l'influence de l'environnement de fabrication et celui de la matière première (Quigley et al., 2012; Salazar et al., 2018). L'étude de fromages artisanaux représente une opportunité de découvrir de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques présentant un intérêt pour leurs contributions aux qualités organoleptiques du fromage ou pour son innocuité (Tilocca et al., 2020). L'étude des écosystèmes fromagers permet aussi de déterminer les signatures microbiennes propres à chaque fromage, responsable de leur typicité (Delcenserie et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2016).

Le séquençage par la technique Illumina a pu être utilisé dans divers projets de séquençage de microbiote, comme le séquençage de la Tomme d'Orchies, un fromage artisanal à croûte lavée et à pâte pressée, dont l'écosystème microbien a été séquencé dans le but d'en découvrir la diversité et de trouver des souches ayant un intérêt probiotique (Ceugniez, Taminiau, et al., 2017b). D'autres études ont été menées, comparant différents fromages (Cheddar, Provolone et le Swiss cheese) afin de mettre en évidence les différences de compositions microbiennes entre les fromages et leurs impact sur le développement des saveurs et la sécurité des fromages (Choi et al., 2020)

De plus, du point de vue des industriels, la compréhension de la composition microbiologique des fromages et du rôle de l'environnement, peut être un atout dans le désir de standardisation des fromages. Les cultures d'inoculation du lait peuvent être adaptées, mais aussi tout le procédé de fabrication (Bellassi et al., 2021). Certaines souches peuvent être sélectionnées et délibérément utilisées comme cultures d'appoint et améliorer le développement de la saveur et apporter des bénéfices pour la santé. Ces ferments d'affinages peuvent ainsi contribuer à l'obtention d'une saveur particulière et présenter des activités métaboliques importantes, telles que l'activité protéolytique, lipolytique et estérolytique, la dégradation des acides aminés et le catabolisme du citrate (Irlinger et al., 2015). En 2015, les génomes de plus de 200 souches de *Lactobacillus* ont été séquencés, mettant à jour des protéinases pouvant intervenir dans le clivage des caséines lors de la coagulation du lait et dans la production d'arôme (Sun et al., 2015). Ce genre d'étude ouvre la voie à la compréhension des activités d'affinage des fromages et à la commercialisation de nouveaux ferments d'affinage (Zotta et al., 2021).

#### 1.4.3.2. *Les approches métatranscriptomiques utilisées dans un contexte fromager*

Les approches métatranscriptomiques sont utilisées pour mieux comprendre les activités des microorganismes composant le fromage et pour connaître les gènes entrant en jeu au cours des différentes étapes de transformation du fromage. Des études utilisant les approches métatranscriptomiques ont été réalisées dans le but de comprendre le métabolisme des souches d'affinage et d'identifier les gènes fonctionnels associés aux activités d'affinage du fromage. Par ailleurs, ces études aident aussi à déterminer l'impact des conditions environnementales sur l'expression de ces gènes (Afshari et al., 2020). Il

a été montré sur *L. lactis* ssp *lactis* DSM20481 que lors de la fabrication de fromages, les changements de pH, et de teneur en humidité, ainsi que l'épuisement des nutriments modifient le profil transcriptomique de cette souche (Larsen et al., 2016). La fermentation provoque un stress oxydatif entraînant une importante activation des gènes impliqués dans la détoxification des composés réactifs à l'oxygène, les processus d'oxydoréduction et une régulation à la baisse des gènes impliqués dans le métabolisme des nucléotides puriques (Larsen et al., 2016; Ojala et al., 2017). La transcriptomique apporte une meilleure compréhension dynamique et fonctionnelle de l'expression des gènes des microorganismes des fromages (Rittmann et al., 2008).

#### 1.4.3.3. *Approches métabolomiques et applications à l'analyse des fromages*

Les métabolites, petites molécules biologiques produites lors du métabolisme, sont impliqués dans la conversion d'énergie, la biosynthèse et d'autres fonctions importantes telles que l'interaction avec l'environnement et la santé moléculaire (Chen et al., 2019; Di Minno et al., 2021; Anastasiou et al., 2022). La métabolomique couvre une vaste gamme de métabolites tels que lipides, acides nucléiques, acides aminés, peptides, glucides, acides organiques, cétones, aldéhydes, amines, stéroïdes, vitamines, molécules de signalisation et métabolites secondaires (Parida et al., 2018; Rinschen et al., 2019). Deux approches existent pour l'étude de ces métabolites, l'approche ciblée et non ciblée. Chacune utilise des techniques de séparation à haute résolution et de détection sensible dont le choix va dépendre de différents facteurs, tels que la connaissance préalable des voies métabolomiques, des microorganismes et des métabolites produits (Di Minno et al., 2021).

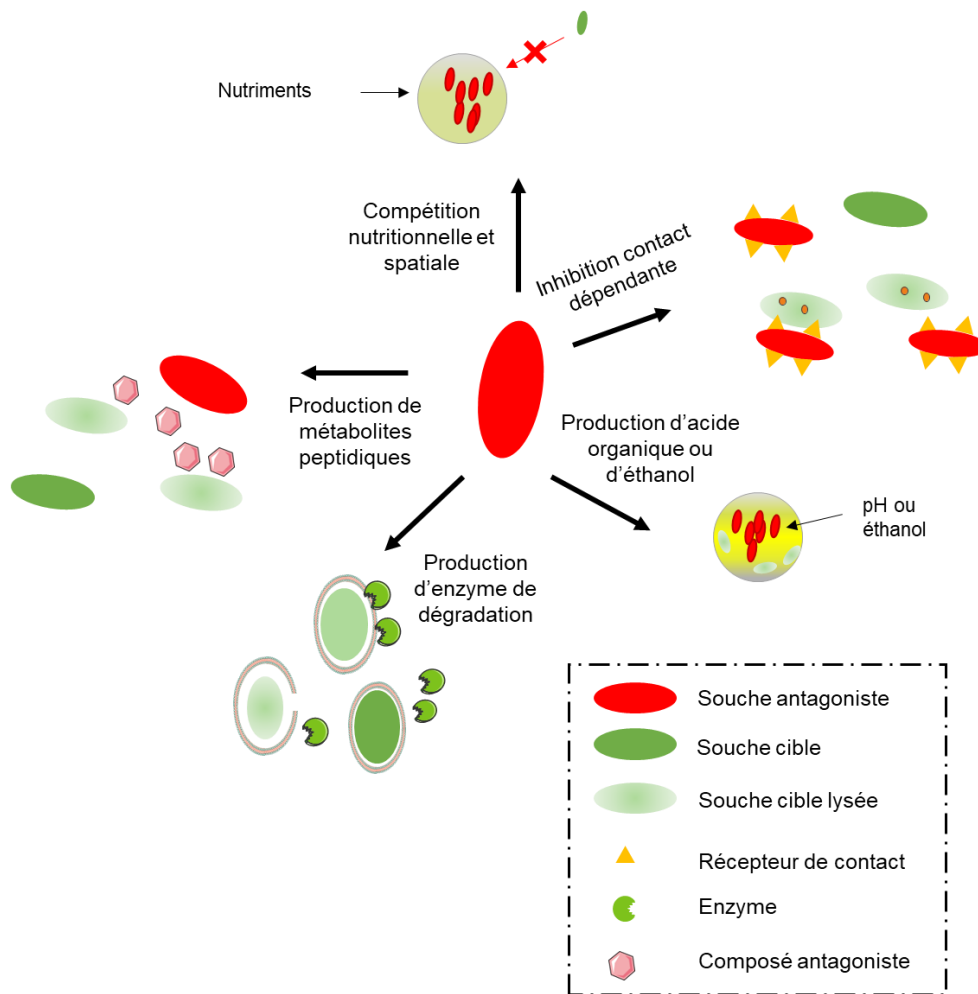
La métabolomique est devenue de plus utilisée dans le domaine des sciences laitières. Parmi les études utilisant la métabolomique on retrouve l'identification de métabolites essentiels et des indicateurs biologiques associés à la santé des animaux, à l'efficacité de la production laitière, à la certification d'authenticité de productions territorialisées, ainsi qu'à l'amélioration des propriétés technologiques et fonctionnelles des produits laitiers (Rocchetti et O'Callaghan, 2021).



Le microbiote présent dans les fromages ainsi que les produits de son métabolisme font l'objet d'une attention grandissante dans le cadre d'une approche globale axée sur l'alimentation. L'objectif des recherches de ce domaine est d'identifier des marqueurs métabolomiques et métagénomiques, permettant de suivre le processus de maturation des fromages et d'améliorer la prolifération de microorganismes spécifiques associés à la production de composés aromatiques souhaités (Anastasiou et al., 2022; Tzora et al., 2022). Ochi et al. (2012), ont déterminé l'empreinte GC/TOF-MS de composés à faible masse moléculaire hydrophiles, permettant d'établir un modèle de prédiction des saveurs (riche ou acide) dans le cheddar et le gouda affiné. Des composés volatils tels que l'acide hexanoïque, l'acide heptanoïque, l'acide octanoïque, le 2-décénal et l'acétoïne, ainsi que certains acides aminés spécifiques ont également été identifiés comme marqueurs d'affinages dans le Cheddar (Ochi et al., 2013; Gan et al., 2016). La métabolomique est aussi utilisée aujourd'hui pour découvrir de nouveaux antimicrobiens produits naturellement dans différents écosystèmes complexes comme les fruits ou celui des fonds marins (Zhang et al., 2020; Magangana et al., 2022; Millan et al., 2022).

### 1.5. Biopréservation et microorganismes inhibiteurs dans les aliments

La biopréservation est définie par Stiles comme « l'utilisation de microorganismes ou de leurs métabolites exerçant une activité antimicrobienne pour allonger la durée de vie des aliments ou augmenter leur innocuité » (Stiles, 1996). Dans les écosystèmes complexes, les microorganismes interagissent entre eux, majoritairement avec des comportements de compétition, bien que des interactions positives ou neutres peuvent aussi être observées. Les interactions de compétition peuvent être classées de deux manières, soit une compétition passive, soit une compétition basée sur la production de facteurs antagonistes (Stubbendieck et Straight, 2016) (Fig. 3).



**Figure 3.** Différents mécanismes d’inhibition des microorganismes (Ceugniz, 2017)

### 1.5.1. Mode d’action d’inhibition

#### 1.5.1.1. *Compétition nutritionnelle et spatiale*

La compétition nutritionnelle est basée sur la disponibilité des nutriments dans un milieu. Dans certains cas, un microorganisme a la capacité de métaboliser les ressources disponibles dans le milieu plus rapidement qu’un autre microorganisme présent dans l’écosystème. Cet avantage permettra au microorganisme le plus efficace de croître plus rapidement et ainsi d’occuper la majorité de l’espace disponible. En parallèle, cette efficacité privera les autres microorganismes de ressources nutritives essentielles limitant leur croissance ou même inhibant complètement celle-ci (Stubbenieck et al., 2016).

#### 1.5.1.2. *Inhibition par contact*

Une autre forme de compétition est l'inhibition de croissance par contact. Cette inhibition est obtenue à la suite d'un contact physique direct entre deux microorganismes, où l'un d'eux va libérer des toxines au moment du contact, entraînant des lésions à la cellule voisine sensible (Ikryannikova et al., 2020). Ce mécanisme a largement été décrit chez les bactéries, notamment chez *E. coli*, où ce phénomène a été discuté pour la première fois en 2005 (Aoki et al., 2005), et est retrouvé chez d'autres bactéries pathogènes, comme *Pseudomonas aeruginosa* (Allen et Hauser, 2019).

#### 1.5.1.3. *Inhibition par synthèse de métabolites secondaires*

En plus d'une colonisation rapide de l'environnement par compétition nutritionnelle, d'autres stratégies ont été développées par les microorganismes, notamment par la synthèse de métabolites secondaires. Les bactéries peuvent produire des toxines ou antibiotiques/antifongiques qui vont inhiber ou tuer des souches compétitrices. La production de ces composés peut aussi rendre le milieu environnant inhospitalier au développement de nouvelles bactéries ou levures (Stubbenieck et Straight, 2016). Il peut y avoir, par exemple, une production d'acide organique ou d'éthanol, liée au processus de fermentation des sources de carbone du milieu, permettant la croissance des souches acido-tolérantes ou tolérantes à l'éthanol au détriment de souches ayant une tolérance limitée à ces composés (Hatoum, 2013). Ces mécanismes sont retrouvés lors de la production du fromage puisque, lors de la coagulation du lait, les bactéries lactiques produiront de l'acide lactique, inhibant la croissance de certaines levures ou autres bactéries sensibles à un pH bas, et permettant de favoriser la croissance des bactéries lactiques et des microorganismes acido-tolérants (Broome et al., 2011).

#### 1.5.1.4. *Inhibition par synthèse d'enzymes inhibitrices*

Il est possible également d'observer un mécanisme d'antagonisme par la synthèse d'enzymes. Les enzymes possédant cette capacité d'inhibition, peuvent interagir directement avec un microorganisme cible, menant majoritairement à la mort de ce dernier. Par exemple, la synthèse de la  $\beta$ -1,3-glucanase par des bactéries, tel que

*Arthrobacter* montre une activité destructrice sur le biofilm de la levure *Candida*, pathogène retrouvé dans le fromage, limitant ainsi sa croissance (Tan et al., 2018).

#### 1.5.1.5. *Inhibition par synthèse de métabolites antagonistes*

Les métabolites antagonistes sont principalement des agents peptidiques, appelés peptides antimicrobiens ou PAM (Peptides antimicrobiens). Ce sont des agents solubles, diffusibles et produits par des espèces de tous les règnes des organismes vivants, que ce soit des bactéries, des cellules de mammifères ou des cellules végétales. Les PAM peuvent avoir une action à la fois contre les bactéries, les levures, les virus, mais également les parasites (Jenssen et al., 2006; Lo et al., 2020).

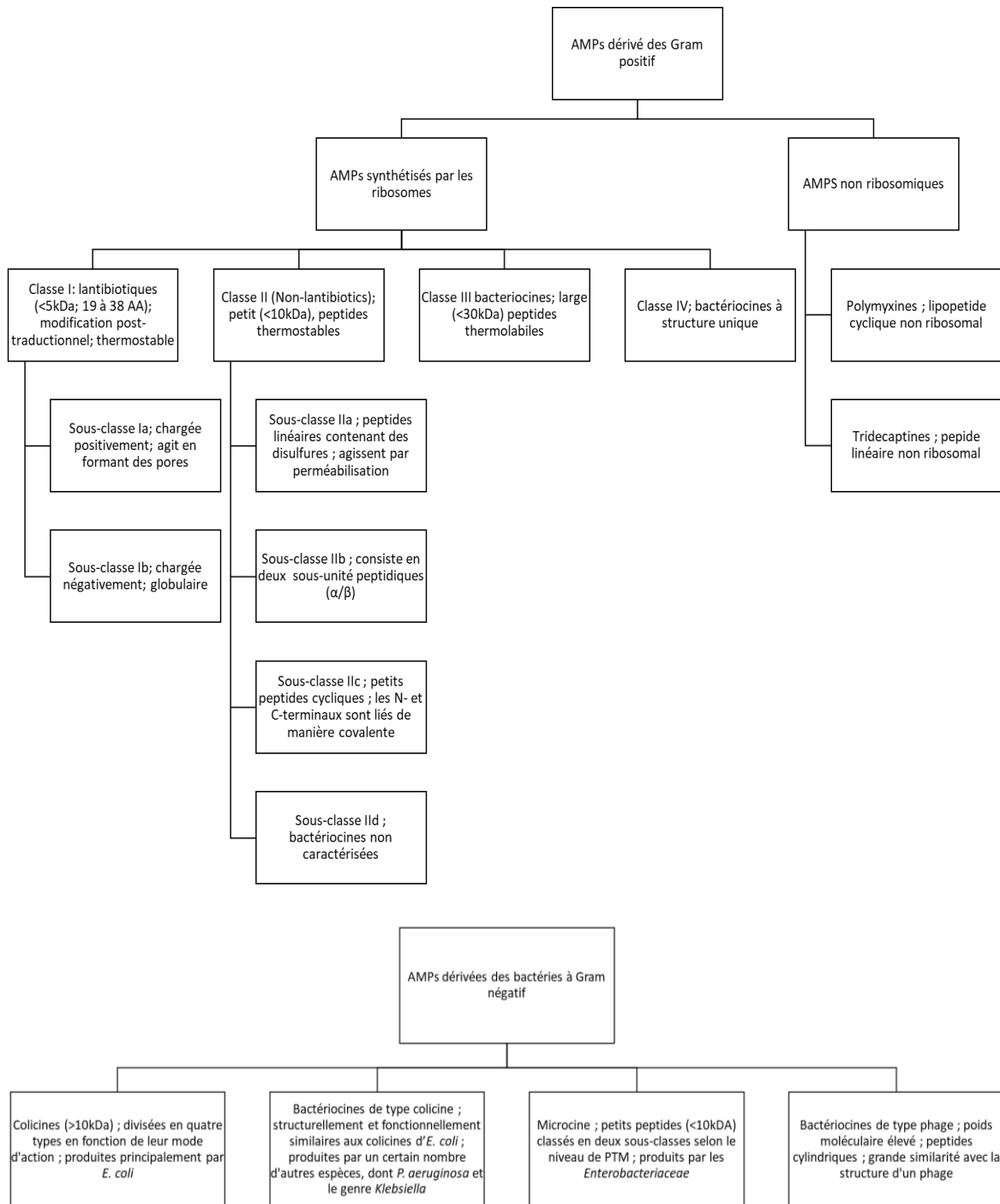
En fonction de leur composition en acides aminés et de leur nature hydrophile et hydrophobe, ils sont classés en groupes distincts. Ils comportent des motifs en hélice alpha, en feuillet bêta ou en tours bêta, et peuvent être linéaires ou cycliques (Patel et Akhtar, 2017). Les PAM alpha-hélicoïdaux, riches en cystéine, riches en proline et riches en glycine sont des catégories courantes des PAM, avec chacune des propriétés et des actions spécifiques. Ces peptides interagissent avec les bicouches membranaires des microorganismes, formant des pores qui endommagent les membranes et altèrent le potentiel transmembranaire. Les PAM peuvent également avoir un impact lors de la formation de la membrane cytoplasmique, inhiber la synthèse de la paroi cellulaire, bloquer la synthèse des acides nucléiques et perturber la synthèse des protéines et des enzymes (Malmsten, 2014).

La méthode de synthèse des PAM peut être ribosomique ou non ribosomique, avec une grande diversité d'assemblage, de modifications post-traductionnelles et de conjugaisons (McIntosh et al., 2009). Les lipopeptides antimicrobiens présentent une variété de structures et d'activités biologiques, leur permettant d'avoir un large spectre d'activités antimicrobiennes. Ces peptides sont largement étudiés afin de trouver de nouveaux outils de biopréservation des aliments (Meena et Kanwar, 2015). Au fil des années, de nombreuses bases de données ont été créées pour cataloguer les informations sur les PAM, recensant leurs séquences et leurs propriétés. *Antimicrobial Peptide Database* (APD3), ADAM et CAMPR3 sont des exemples de bases de données riches en informations sur

les PAM antibactériens, antiviraux, antifongiques et anticancéreux (Wang et al., 2016; Bin Hafeez et al., 2021).

Parmi les PAM ayant une activité antibactérienne, on retrouve les bactériocines. Les bactériocines sont des peptides sécrétés et synthétisés par les ribosomes et ont une longueur de 20 à 60 acides aminés, sont cationiques et hydrophobes. Également, plusieurs études mettent en évidence leur capacité d'inhiber ou lyser des bactéries pathogènes et d'altération dans les aliments (Kumariya et al., 2019). Les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif peuvent être classées en quatre classes (Fig. 4) : (I) les lantibiotiques (< 5 kDa, thermostables avec des acides aminés caractéristiques, comme la lanthionine; i.e., nisin, mersacidin), (II) les non-lantibiotiques (< 10 kDa, thermostable, sans lanthionine; i.e., pediocin, plantaricin), (III) les bactériocines de grande taille (> 30 kDa, thermolabile; i.e., helveticin) et (IV) les bactériocines à structure unique (Simons et al., 2020a). Du côté des bactéries à Gram positif, les bactéries lactiques sont considérées comme de bonnes productrices de bactériocines et ont été largement étudiées comme agents de bioconservation. (Kumariya et al., 2019). Une des bactériocines les plus connues est la nisine synthétisée par *L. lactis*. Elle est commercialisée comme additif alimentaire de conservation sous le code E234 depuis une cinquantaine d'années. Plus particulièrement, il a été démontré que la nisine a une action contre différents pathogènes du fromage dont *L. monocytogenes* et *C. botulinum* (Jenssen et al., 2006). Les bactériocines possèdent différents mécanismes d'action leur permettant d'inhiber les bactéries, notamment par la perméabilisation des membranes des cellules cibles et la formation de pores (And et Hoover, 2003).

Les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif sont majoritairement isolées d'*E. coli*, même si d'autres espèces comme *Klebsiella* spp. et *Pseudomonas* spp. produisent également des PAM (Bin Hafeez et al., 2021). Ces composés ont un spectre d'activité généralement étroit et peuvent être classés en quatre classes (Fig. 4) : colicines, colicin-like, microcines et bactériocines de type phage tail-like (Simons et al., 2020a).



**Figure 4.** Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Bin Hafeez et al., 2021)

Il existe également des PAM ayant une action antifongique et sont nommées des mycocines ou killer toxines. Ce sont des protéines ou des glycoprotéines sécrétées communément par les levures, présentant une grande stabilité thermique, au pH et un large spectre d'activité contre d'autres levures (Golubev et al., 2002). Les mycocines ont

été étudiées pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae*, puis dans de nombreuses autres levures notamment, pour leur action contre différents pathogènes incluant *Candida albicans* (Hatoum et al., 2012). Les mécanismes d'inhibition sont semblables à ceux présents chez les bactériocines, par l'induction de dommages à l'ADN, par une inhibition de la réplication de l'ADN, par une inhibition de la synthèse de peptidoglycanes ou par une perméabilisation de la membrane cellulaire (Al-Qaysi et al., 2017). Les mycocines peuvent avoir, en plus de leur action antifongique, une action antibactérienne. Cela représente un réel atout dans la recherche de nouveaux agents de biopréservation plus polyvalents (Hatoum et al., 2012). Plusieurs études ont proposé d'utiliser les levures productrices de mycocines comme ferment d'appoint, en particulier dans le domaine viticole, pour la production de vin, afin de lutter contre les contaminants fongiques (Comitini et Ciani, 2011; Mehlomakulu et al., 2014; Nascimento et al., 2020).

Il existe d'autres PAM, tel que les sophorolipides, les acides organiques, ou les polycétides. Les sophorolipides sont des glycolipides thermostables produits principalement par des levures. Leurs propriétés antagonistes seraient dues à leur capacité de former une substance surfactante induisant la perméabilisation des membranes, notamment à l'encontre d'autres souches fongiques (X. Ma et al., 2020). À l'inverse les peptides non-ribosomiques et les polycétides ont une action antibactérienne. En effet ces peptides, contenant une unité cétide, sont à l'origine de plusieurs antibiotiques utilisés aujourd'hui pour la santé humaine, tels que la vancomycine ou la daptomycine. Ces composés vont avoir une action antagoniste par l'inhibition de la synthèse de peptidoglycanes et par la perméabilisation de la membrane des souches cibles (Ceugniz, 2017; Han et al., 2018). Les PAM sont d'origine, structure et compositions très variées et démontrent des activités antimicrobiennes multiples, les rendant très pertinents dans la recherche de nouveaux outils de biopréservation.

#### 1.5.2. Application en industrie fromagère des agents de biopréservation

Les cultures d'affinages, inoculées au lait, en plus d'initier la fermentation et de contribuer à la production de certains composés responsables de la texture typique et des composés aromatiques, peuvent être utilisées pour réduire la survie et la croissance des microorganismes pathogènes et d'altération. Certaines souches de bactéries lactiques

possèdent cette double fonction, ce qui en fait une option particulièrement prometteuse pour remplacer les conservateurs chimiques dans l'industrie laitière (Trejo-González et al., 2022). Les bactéries lactiques (LAB) génèrent une variété de substances, comprenant des acides organiques tels que l'acide lactique, acétique, propionique, butyrique et formique, ainsi que du peroxyde d'hydrogène, du diacétyle, des composés antifongiques comme des acides gras et l'acide phényllactique, mais également des bactériocines (Trejo-González et al., 2022).

Elles sont capables de générer une compétition nutritionnelle induisant une inhibition fongique. Deux espèces du genre *Lactobacillus* ont montré une capacité à chélater le manganèse via un transporteur. Le piégeage de cet oligo-élément s'est révélé être un mécanisme d'inhibition des levures et des moisissures d'altérations des fromages (Siedler et al., 2020). L'utilisation de ces bactéries lactiques a été optimisée et elles sont aujourd'hui utilisées sous la forme de cultures bactériennes de biopréservation par la société Chr. Hansen, sous le nom FRESHQ®.

Trois méthodes sont envisageables pour exploiter les microorganismes produisant des antimicrobiens et des PAM afin de préserver les aliments dans l'industrie agroalimentaire. La première méthode implique l'ajout de microorganismes producteurs de PAM directement dans les aliments durant leur transformation, ce qui entraîne la production de composés antagonistes in situ. La deuxième méthode consiste à appliquer, directement sur les produits alimentaires, les PAM purifiés ou à l'état brut. Enfin, la troisième approche repose sur l'utilisation d'un produit alimentaire précédemment fermenté avec une souche productrice de PAM dans la fabrication d'un nouvel aliment (And et Hoover, 2003; Banjara et al., 2016).

Parmi les PAM, les bactériocines sont les composés les plus employés au niveau industriel. La bactériocine la plus connue est la nisine, déjà commercialisée dans l'industrie agroalimentaire et qui depuis quelques années est employée dans le domaine biomédical. Elle est principalement produite par *L. lactis*. Elle est reconnue pour son activité inhibitrice à l'égard de diverses bactéries pathogènes et bactéries responsables de la détérioration des aliments et de son absence d'effet sur les bactéries à Gram négatif, les levures ou les moisissures (And et Hoover, 2003). Son activité antimicrobienne a été



démontrée contre les bactéries à Gram positif, notamment vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, d'entérocoques, de staphylocoques et de streptocoques.

La nisine peut être désignée comme conservateur alimentaire par le code E-234, et est la seule bactériocine autorisée dans l'Union européenne pour une utilisation spécifique dans le domaine fromager (concentration maximale de 12,5 mg.kg<sup>-1</sup> dans les fromages affinés) (Nájera et al., 2021). La nisine agit en perturbant la membrane cellulaire des bactéries cibles, ce qui entraîne une perte de perméabilité et finalement leur mort (Field et al., 2023). Actuellement, il est possible d'améliorer à la fois la sécurité alimentaire et la valeur nutritionnelle par la synergie de l'introduction de nisine et de l'utilisation de méthodes de préservation à basse température. Dans ce contexte, des traitements à haute pression hydrostatique ont été combinés avec l'incorporation de bactériocines pour accomplir deux objectifs majeurs, renforcer l'innocuité des fromages et accélérer le processus d'affinage de ces produits laitiers (Nuñez et al., 2020). Un autre PAM utilisé comme additif alimentaire est la natamycine ou pimaricine, produite par *Streptococcus natalensis* et d'autres espèces similaires. La natamycine (E-235) est réglementée par les normes de l'Union européenne exclusivement pour le traitement en surface des fromages à pâte dure, semi-dure et semi-ferme, à une concentration maximale de 1 mg.dm<sup>-2</sup> de surface (sans détection à une profondeur de 5 mm). Ce conservateur s'avère très efficace contre le développement de moisissures et de levures (Marín et al., 2017).

Les bactériocines et par extension les mycocines étudiées pour la biopréservation des aliments, peuvent avoir une action dans la lutte contre les antibiorésistances, toujours plus fréquemment détectées (Shin et al., 2016). D'autres bactéries et levures sont à l'étude pour trouver de nouveaux microorganismes pertinents dans la biopréservation, et plusieurs études portent sur des écosystèmes complexes pouvant contenir des agents bioprotecteurs exploitables dans l'avenir en industrie pour maintenir la qualité et l'innocuité des aliments. Cependant, il est important de noter que l'utilisation de bactériocines et de mycocines nécessite une réglementation appropriée et une évaluation minutieuse de leur sécurité. Des recherches continuent d'être menées pour mieux comprendre leurs effets, leur mode d'action et leur application dans la biopréservation des produits alimentaires en général et dans les fromages en particulier.

## 1.6. Les levures dotées d'activités antimicrobiennes

Les levures mettent en place plusieurs mécanismes antagonistes, tel que la compétition nutritive (Sipiczki, 2020; Büyüksirt Bedir et Kuleaşan, 2021) la formation de biofilm (Freimoser et al., 2019) ou encore la production de mycocines (Muccilli et Restuccia, 2015; Comitini et al., 2023). La compétition nutritive se fait principalement pour les sucres comme le glucose, le fructose et le saccharose, ce qui limite la croissance des micro-organismes indésirables, une stratégie largement exploitée dans la fermentation alimentaire, notamment avec *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, la compétition pour le sucre a été mise en évidence chez d'autres levures, telles que *Sporobolomyces roseus* contre *Botrytis cinerea* et *Pichia guilliermondii* contre *Ceratocystis paradoxa* (Filonow et al., 1996; Reyes et al., 2004). La compétition pour les composés azotés, notamment dans les plaies des fruits riches en carbone, est également observée, par exemple avec *Candida sake* et *Candida guilliermondii* contre *P. expansum* (Liu et al., 2013; Hernández et al., 2022). La production de sidérophores, peut également être utilisés comme outils de biopréservation, la chélation du fer par *M. pulcherrima*, cette partie est développée dans la section 1.6.1.2. (Sipiczki, 2020; Büyüksirt Bedir et Kuleaşan, 2021; Mažeika et al., 2021; Millan et al., 2022). Un des autres mécanismes exploité est la formation de biofilm, *P. fermentans* est capable de produire un biofilm à la surface des pommes, les protégeant ainsi des maladies post-récoltes (Freimoser et al., 2019). Enfin plusieurs levures ont été identifiées comme produisant des « *killer toxins* » ou mycocines telles que *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Tetrapisispora phaffii*, *Torulopsis*, *Williopsis* et *Zygosaccharomyces* (Muccilli et Restuccia, 2015). Les modes d'action de ces protéines sont divers, elles peuvent par exemple perturber la membrane cellulaire, bloquer la division cellulaire, cliver l'ARNt, empêcher l'absorption du calcium et provoquer la fuite d'ions par la formation de canaux sur la membrane cytoplasmique (Comitini et al., 2023).

Dans le contexte de cette thèse, deux espèces de levure ont été isolées et analysées de façon plus approfondie pour leurs activités antimicrobiennes. Les sections suivantes résument plus spécifiquement les informations connues pour ces deux levures.

### 1.6.1. *Metschnikowia pulcherrima*

#### 1.6.1.1. Généralités

*Metschnikowia pulcherrima* est principalement isolée de la phyllosphère, comprenant fleurs, fruits, feuilles et nectars (Janakiev et al., 2022). Des souches de *Metschnikowia* sp. ont également été découvertes dans le mycobiote intestinal (Kregiel et al., 2023). Cette levure est de forme ovoïde, et se reproduit principalement par bourgeonnement, bien qu'une croissance pseudohyphale puisse survenir dans des conditions anaérobies. Au cours du temps, *M. pulcherrima* a été identifié sous divers noms en raison de modifications dans sa classification basée sur les méthodes classiques de taxonomie des levures (Vicente et al., 2020). Ces levures présentent un potentiel biotechnologique étendu dans divers processus industriels, notamment la fermentation du vin, la production de lipides et comme agents de biocontrôle grâce à leur pouvoir antimicrobien (Sipiczki, 2020).

#### 1.6.1.2. Propriétés inhibitrices

*Metschnikowia pulcherrima* s'est distinguée par son activité antifongique efficace contre plusieurs agents pathogènes tels qu'*Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. et *Fusarium* spp. (Sipiczki, 2006; Janakiev et al., 2022; Millan et al., 2022). Divers produits à base de *Metschnikowia* ont été introduits sur le marché viticole en tant qu'agents de lutte biologique pour contrer les maladies pré- et post-récolte, notamment contre *Botrytis* spp. et *Monilinia* spp. (Noli, Koppert Biological Systems), ainsi que comme agents de préservation contre les altérations microbiennes (Sipiczki, 2020). L'efficacité antagoniste de *M. pulcherrima* est attribuée à la sécrétion de divers composés (Türkel et Ener, 2009; Millan et al., 2022; Kregiel et al., 2023). Parmi les composés étudiés en profondeur pour leur activité antimicrobienne, le pigment rouge-brun, la pulcherrimine se démarque. Ce pigment complexe est synthétisé de manière non enzymatique à partir de l'acide pulcherriminique, sécrété par *M. pulcherrima*, et d'ions ferriques. Cet acide agit comme un chélateur de fer, se transformant en pulcherrimine une fois qu'il piège le fer, induisant ainsi une compétition entre les microorganismes pour le fer (Sipiczki, 2020). La limitation de la disponibilité du fer freine la croissance des agents pathogènes, un effet

particulièrement prononcé dans les fromages, un aliment pauvre en fer (Gaucheron et al., 1997). Initialement, la concentration en fer présente dans le lait est limitée, et il est à noter que la lactoferrine, une glycoprotéine possédant des propriétés de chélation du fer, et documentées pour son action antimicrobienne, se trouve dans le lait (Gruden et Poklar Ulrih, 2021). En outre, le processus d'oxydation du fer en son état oxydé  $Fe^{3+}$  à la surface contribue à son insolubilité. Enfin, la structure physique solide caractéristique du fromage entrave la mobilité du fer ainsi que des composés à base de fer dans la matrice (Monnet et al., 2012). Les mécanismes antagonistes des levures impliquent plusieurs modes d'action, dont la production de ces facteurs sont des protéines ou glycoprotéines aux poids moléculaires variant entre 5 -10 et 100 KDa (Buzzini et al., 2007; Manso et al., 2010). Ces mécanismes peuvent également être dus à l'émission de composés volatils. L'effet inhibiteur des composés volatils émis par les cellules de *M. pulcherrima* a été confirmé par des tests in vitro et des essais sur des raisins affectés par *Botrytis* spp. (Millan et al., 2022). Dans une étude, Millan et al. (2022) ont identifié neuf métabolites antifongiques (contre *B. cinerea*) sécrétés par deux souches de *M. pulcherrima*, dont trois (acide 3-amino-5-méthylhexanoïque, biphenyl-2,3-diol et sinapaldéhyde) ont présenté une activité in vivo sur des tomates, des raisins et des pommes. L'activité antifongique de *M. pulcherrima* peut découler de l'action synergique de plusieurs molécules actives, notamment des acides gras à longue chaîne, des alcaloïdes, des antibiotiques et même des acides biliaires.

## 1.6.2. *Trichosporon asahii*

### 1.6.2.1. Généralités

*Trichosporon asahii* est une levure naturellement présente dans le tractus gastro-intestinal humain, sur la peau et dans le microbiote vaginal (Guého, Smith, et al., 1992). *Trichosporon asahii* forme des blastoconidies, des hyphes, des pseudohyphes et des arthroconidies. Elles sont asexuées et produisent des spores individuelles qui se désarticulent des hyphes (Chagas-Neto et al., 2008). La présence de parois cellulaires multilamellaires et de dolipores, avec ou sans capuchons de pore septal (appelés parenthèses), est un autre trait important de *T. asahii* (Guého, de Hoog, et al., 1992). La

présence de structures morphologiques supplémentaires, telles qu'un appressorium ou des macroconidies, peut également être utile pour différencier certaines espèces.

*T. asahii* est un pathogène opportuniste, et est à l'origine de la majorité des trichosporonoses (Chagas-Neto et al., 2009). Elle fait donc l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne sa pathogénicité et sa résistance émergente aux médicaments antifongiques utilisés pour traiter les infections (Sugita et al., 2004; Li et al., 2020; Raju et al., 2020; Ramírez et al., 2020). Cependant, *T. asahii* a également d'importantes applications biotechnologiques, en particulier ses capacités de dépollution (Dutta et al., 2001; Morikawa, 2006; Awe et al., 2009) et sa production de composés aromatiques (par exemple, terpènes, C13-Norisoprenoids, composés en C6, hexanoate de méthyle et isovalérate d'éthyle) (Rakowska et al., 2017) et de molécules antioxydantes (Rai et al., 2016). *T. asahii* produit également des substances qui inhibent certains contaminants présents dans les produits laitiers, tels que *Kocuria rhizophila*, *Clostridium tyrobutyricum* et *Salmonella enterica* (Chen et Chou, 2017; Ider et al., 2020). Paradoxalement, cette espèce de levure a également été étudiée pour des applications probiotiques potentielles (Paserakung et al., 2015).

#### 1.6.2.2. Propriétés inhibitrices

Bien que *T. asahii* soit un pathogène opportuniste cette levure a démontré des activités antimicrobiennes intéressantes. *T. asahii* ICVY021, isolé du lait de chamelle en Algérie, synthétise un peptide antimicrobien extracellulaire nommé l'oranicine p16, d'une masse moléculaire de 4 607 Da et comportant deux séquences potentielles d'étiquettes PPFPK et CTHV(L/I)(K/Q) ou TCHV(L/I)(K/Q). Ce peptide a une action inhibitrice contre *Kocuria rhizophila*, un contaminant du lait de chamelle (Ider et al., 2019). D'autres investigations ont également signalé son activité antagoniste envers d'autres contaminants laitiers tels que *C. tyrobutyricum* ou *S. enterica* (Ider et al., 2020). L'oranicine P16, avec des similitudes caractéristiques aux bactériocines observées chez les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, semble cibler les mécanismes de division cellulaire de *K. rhizophila* (Cavera et al., 2015; Ider et al., 2020).

*T. asahii* présente également la capacité de produire des composés antagonistes à l'encontre de *Pseudozyma aphidis* et *Aureobasidium pullulans*, qui sont des levures

opportunistes pathogènes pour l'humain (Chen et Chou, 2017). Bien que la substance inhibitrice n'ait pas été identifiée de manière précise, les auteurs ont démontré que les caractéristiques de sécrétion de ces composés et leur sensibilité aux variations de température, de salinité et de pH environnementaux sont analogues aux toxines tueuses K1, K2 et K28 produites par *S. cerevisiae* (Schmitt et al., 2002; Chen et Chou, 2017). Ces antagonistes isolés pourraient également trouver des applications dans les industries alimentaires pour réduire la prolifération de levures ou de champignons indésirables.

## 2. Chapitre 2 : Contexte du projet

### 2.1. Problématique

Les écosystèmes fromagers présentent une grande diversité microbienne qui est à l'origine de la typicité de chaque variété de fromage ainsi qu'un potentiel réservoir de microorganismes d'intérêt technologiques, probiotiques et/ou antimicrobiens. L'utilisation de souches antimicrobiennes issues des fromages peut être une alternative aux conservateurs dans les fromages et permettre d'allonger leur durée de vie. Les bactéries lactiques ont largement été étudiées pour leur pouvoir de biopréservation mais les écosystèmes secondaires des fromages ont été peu analysés dans une optique de recherche d'agent de bioconservation. Pour pallier à ce manque de connaissance, la combinaison d'une approche culture-dépendante et d'une approche OMIQUE permettra de découvrir des microorganismes fromagers typiques présentant des activités antagonistes et de mieux appréhender les mécanismes inhibiteurs. Le but de cette thèse est donc de mettre en lumière le potentiel des microorganismes composant les fromages choisis comme agent de biopréservation, leur place et les interactions dans la composition microbiologique des produits. Une recherche dirigée sur les levures comme agent de biopréservation a été préconisée, car peu d'études mettent en valeur leur pouvoir de biopréservation. Pour cela, ce projet cible quatre fromages à base de lait thermisé : deux fromages québécois (Cheddar et pâte à croûte lavée) et deux fromages français (Bourle Roncquoise (BR) et Carré du Vinage (CV)). Chaque pays présente deux types de fromages différents, soit un fromage à pâte pressée non cuite (BR et Cheddar) et un fromage à croûte lavée (CV et une pâte à croûte lavée québécoise). Les fromages français proviennent de la Ferme du Vinage à Roncq, située dans le nord de la France. Cette ferme a été spécifiquement choisie en raison de l'utilisation de lait provenant de vaches Holstein élevées sur l'exploitation, qui sont principalement alimentées avec de l'herbe fraîche et sans traitements allopathiques préventifs. Cette approche assure une grande diversité du microbiote et maintient les caractéristiques typiques du lait. Les fromages québécois retenus proviennent de la coopérative Agropur et ont déjà fait l'objet d'études antérieures de la part de l'équipe de recherche.

## 2.2. Hypothèse de recherche

Les écosystèmes fromagers de fromages français et québécois renferment une diversité importante de microorganismes qui présentent un potentiel antimicrobien vis-à-vis du microbiote contaminant des fromages.

## 2.3. Objectifs spécifiques

Afin de vérifier l'hypothèse formulée et atteindre le but de ce projet, quatre objectifs ont été fixés.

**Objectif 1** : Caractériser de manière globale le microbiote de deux fromages français au lait thermisé.

**Objectif 2** : Cribler les souches de fromages ayant une activité de biopréservation vis-à-vis du microbiote contaminant.

**Objectif 3** : Valider l'activité des souches produisant des antimicrobiens dans un modèle caillé.

**Objectif 4** : Caractériser les composés antimicrobiens des souches montrant une activité de biopréservation dans les modèles caillés.



### 3. Chapitre 3 : Caractérisation moléculaire des communautés bactériennes et fongiques de deux fromages français et leur rôle potentiel en tant que réservoir pour l'isolement de cultures protectrices.

#### 3.1. Avant-propos

Ce chapitre présente les résultats répondant aux objectifs 1 et 2. Une approche par métabarcoding a permis d'obtenir une vue d'ensemble des différents écosystèmes (cœur et surface, bactérien et fongique) pour les deux fromages français, à savoir la Bourle Roncquoise et le Carré du Vinage. Cette étude a révélé la diversité et la dynamique microbienne au sein de ces écosystèmes. En parallèle, nous avons procédé à l'isolement de plusieurs souches en vue d'évaluer leur potentiel antimicrobien vis-à-vis des contaminants présents dans ces fromages. Nous avons également identifié des souches potentielles en vue de leur utilisation dans des processus de biopréservation. Ces résultats sont présentés sous la forme d'article. La majorité du travail a été réalisé par le premier auteur de cet article scientifique, Aude Commenges. Dr Françoise Coucheney, Dr Marie-Hélène Lessard, Pr Djamel Drider et Pr Steve Labrie ont co-supervisé le travail tout en participant activement à la rédaction du manuscrit, en plus d'obtenir le financement nécessaire à la réalisation du travail de recherche.

#### 3.2. Résumé

Les écosystèmes de fromage abritent une riche diversité microbienne qui contribue à leurs qualités distinctives et offre l'opportunité d'identifier de nouveaux candidats pour une utilisation dans l'approche de la biopréservation. Ce projet s'est concentré sur deux fromages artisanaux français, le Bourle Roncquoise (BR), un fromage pressé à pâte crue en forme de dôme, et le Carré du Vinage (CV), un fromage à croûte lavée molle. Des méthodes moléculaires ont été utilisées pour caractériser de manière exhaustive le microbiote et évaluer leur singularité et leur diversité microbienne. L'analyse par métabarcoding a révélé que le BR et le CV avaient chacun des écosystèmes bactériens et fongiques typiques de leurs types de fromage. Un total de 794 isolats bactériens, de levures et de moisissures ont été collectés à partir de ces fromages et évalués pour leurs

propriétés inhibitrices sur gélose à double couche. L'activité antifongique a été testée contre les trois levures *Candida parapsilosis* LMA-804, *Rhodotorula mucilaginosa* LMA-808 et *Yarrowia lipolytica* LMA-800, et les quatre moisissures indésirables *Cladosporium cladosporioides* LMA-31, *Cladosporium herbarum* LMA-929, *Mucor racemosus* LMA-722 et *Penicillium commune* LMA-72. L'activité antibactérienne a été évaluée contre neuf bactéries pathogènes ou de détérioration, dont *Clostridium tyrobutyricum* LMG 1285, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, et *Staphylococcus aureus* ATCC 13709. Trente-six (36) des 794 souches présentant des propriétés inhibitrices contre divers agents de détérioration et pathogènes ont été identifiées par séquençage de l'ARNr 16S ou de l'ITS2 pour les bactéries et les champignons, respectivement. Des travaux futurs pourraient valider le potentiel bioprotecteur de ces souches et leur perspective d'application en tant que conservateurs naturels.

### 3.3. Publication

Molecular characterization of the bacterial and fungal communities of two French cheeses and their potential role as a reservoir for the isolation of protective cultures.

Aude Commenges<sup>a,b</sup>, Marie-Hélène Lessard<sup>a</sup>, Djamel Drider<sup>b</sup>, Françoise Coucheney<sup>b</sup>, Steve Labrie<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) and Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Québec G1V 0A6, Canada.

<sup>b</sup> UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, Univ. Lille, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

### Highlights:

- The ecosystem of the Bourle Roncquoise is representative of the pressed raw cheese.
- Carré du Vinage is composed of the typical ecosystem found in soft washed-rind cheeses.
- Thirty-six cheese strains showed antibacterial and/or antifungal properties.
- Cheeses are a potential reservoir of protective cultures.

### 3.4. Abstract

Cheese ecosystems harbor a rich microbial diversity that contributes to their distinctive qualities and provides an opportunity to identify novel candidates for use in the biopreservation approach. This project focused on two French artisanal cheeses, Bourle Roncquoise (BR), a dome-shaped pressed raw cheese, and Carré du Vinage (CV), a soft washed rind cheese. Molecular methods were used to comprehensively characterize the microbiota and assess their uniqueness and microbial diversity. Metabarcoding analysis revealed that BR and CV each had bacterial and fungal ecosystems typical of their cheese types. A total of 794 bacterial, yeast, and mold isolates were collected from these cheeses and evaluated for inhibitory properties on double layer agar. Antifungal activity was tested against the 3 yeasts *Candida parapsilosis* LMA-804, *Rhodotorula mucilaginosa* LMA-808 and *Yarrowia lipolytica* LMA-800, and the 4 undesirable molds *Cladosporium cladosporioides* LMA-31, *Cladosporium herbarum* LMA-929, *Mucor racemosus* LMA-722 and *Penicillium commune* LMA-72. The antibacterial activity was evaluated against 9 pathogenic or spoilage bacteria, including *Clostridium tyrobutyricum* LMG 1285, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, and *Staphylococcus aureus* ATCC 13709. The thirty-six (36) out of 794 strains with inhibitory properties against various spoilage agents and pathogens were identified by 16S rRNA or ITS2 sequencing for bacteria and fungi, respectively. Future work could validate the bioprotective potential of these strains and their prospective of application as natural preservatives.

### 3.5. Introduction

Cheeses harbor intricate communities of microorganisms that play a critical role in converting milk into cheese and shaping essential characteristics related to texture, color, and sensory attributes. Describing the composition, specificity, and activity of cheese ecosystems deepens our understanding of their diversity and typicity. (Banjara et al., 2015; Ceugniez, Taminiau, et al., 2017b, 2017a; Duru et al., 2018). This information can be invaluable in improving cheese quality. In fact, food safety is widely recognized as a major challenge for the food industry and consumers. One-third of the world's food production is wasted, primarily due to spoilage microorganisms. It provides invaluable data for improving cheese quality (Ross et al., 2002). Several methods have been used to preserve food. These include safety standards, packaging innovations, and the use of preservatives (Brul & Coote, 1999). Preservatives such as sorbates, sulfites, acetic acid, propionates, benzoates, hexamethylenetetramines, butylated hydroxytoluene (BHT), and butylated hydroxyanisole (BHA) have been commonly used in cheese production (Park et al., 2016). Another method of food preservation that is becoming increasingly popular is based on the use of natural strains as biopreservatives. According to Stiles (1996), biopreservation is the use of natural or controlled microbiota or antimicrobials as a way to preserve food and extend its shelf life. Lactic acid bacteria (LAB) have historically been studied as bioconservation agents in the cheese industry. Currently, complex ecosystems such as cheese are increasingly considered as reservoirs of microorganisms of interest due to their high microbial diversity and complex interactions (Angiolillo et al., 2014; Ceugniez et al., 2017a, Al-Qaysi et al., 2017). This observation stems from the fact that cheese is a complex food matrix that harbors a variety of beneficial microorganisms whose interactions and metabolic pathways play an essential role (Al-Qaysi et al., 2017; Angiolillo et al., 2014; Ceugniez, 2017).

Understanding the bacterial and fungal ecosystems associated with cheeses could lead to promising applications of autochthonous strains as biopreservatives, to establish microbiological profiles for different cheese varieties, and to improve ripening control (Montel et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2015; Ceugniez et al., 2017b). Yeasts initially colonize the cheese surface during the early days of ripening and bacterial growth is observed around the mid-ripening stage (Ceugniez et al., 2017a, 2017b; Mounier et al., 2017). In this perspective, bacterial and fungal microbiota not previously identified in

cheese can be monitored using a metabarcoding approach, highlighting the importance of the autochthonous microbiota, which includes non-inoculated microorganisms that therefore appear during ripening (Raymond-Fleury et al., 2022).

The present study focused on the microbial diversity and antimicrobial properties in two types of cheeses, Bourle Roncquoise (BR) and Carré du Vinage (CV), produced by Ferme du Vinage (Roncq, 59223, Nord department, France). BR is a dome-shaped, pressed uncooked cheese, made from thermized cow's milk (15 seconds at 60°C). During production, starter cultures *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus* are added, alongside annatto in order to ensure a uniform orange color (Giuliano et al., 2003). BR is matured for 3 days at 12.5°C and then aged for 3 to 8 weeks. The cheese rind is covered with a fine white down that gradually changes from light gray to dark brown, with yellow to purple touches during the maturing process. CV is a soft washed-rind cheese, also made from thermized cow's milk, similar to Maroilles with an orange rind. LAB starters *L. lactis* subsp. *Lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* are used for its production. During the washing steps, a saline solution supplemented with the ripening bacteria *Brevibacterium linens* is manually applied to the cheese. CV is then matured for 95 h at 13°C, and ripened for 1 month at 12.5°C. In this study, high-throughput amplicon sequencing (metabarcoding) targeting universal ribosomal regions was used to determine the composition of the bacterial (V3-V4 region of the 16S rRNA) and fungal (ITS2) communities in BR and CV (Klindworth et al., 2013; Dugat-Bony et al., 2016; Raymond-Fleury et al., 2022). In addition, systematic microbiological isolation of cheese microorganisms was performed to specifically identify strains with antimicrobial activities. Together, these data highlight the potential of cheese as a natural source of antagonistic strains that can be used in cheese production to enhance safety and reduce reliance on chemical additives.

## 3.6. Materials and Methods

### 3.6.1. Cheese sampling

The core (10 g) and rind (25 cm<sup>2</sup>) of Bourle Ronquoise (BR) and Carré du Vinage (CV) cheeses were sampled separately using sterile scalpels. Cryogenic grinding of samples was performed using liquid nitrogen, a mortar and pestle to obtain frozen fine cheese powder (Lessard, 2014). Fresh samples were stored for microbial enumeration and strain isolation.

### 3.6.2. DNA extraction and metabarcoding

DNA extraction was performed using the PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions with minor modifications (Raymond-Fleury et al., 2022). Ground cheese samples of 30-40 mg were homogenized in 200 µL of 0.9% w/w NaCl solution. Proteinase K and lysis buffer were then added according to the Purelink protocol. DNA concentration and quality were determined using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Wilmington, NC, USA). Genomic DNA was sent to the Institut de Biologie Intégrative et des Systèmes (IBIS, Université Laval, Quebec City, QC, Canada) for library preparation, equimolar pooling, and paired-end (2 x 300 bp) MiSeq sequencing (Illumina, San Diego, CA, USA). Read demultiplexing was also performed at IBIS.

Bacterial and fungal ecosystem composition of the core and rind was determined by targeting the 16S rDNA region V3-V4 (Forward primer S-D-Bact-0341-b-S-17 (341F), 5'-CCT ACG GGN GGC WGC AG-3'; Reverse primer S-D-Bact-0787-a-A-19 (805R), 5'-GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC-3') (Klindworth et al., 2013, Raymond-Fleury et al., 2022) and the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) (Forward primer ITS3tagmix1-5 5'-TAG ACT CGT CAH CGA TGA AGA ACG YRG-3'; Reverse primer ITS4ngs 5'-TTC CTS CGC TTA TTG ATA TGC-3'), respectively (Tedersoo et al., 2016; Raymond-Fleury et al., 2022). Bioinformatics analysis was performed as previously described by Raymond-Fleury et al., (2022) using FROGS (Escudié et al., 2018), with minor modifications. After quality control, the paired-end sequences were clustered using

Swarm (Mahé et al., 2014), with a maximum of 1 difference ( $d=1$ ) allowed between amplicons. All clusters were then filtered to identify and remove chimeras using VSEARCH (Rognes et al., 2016). Operational Taxonomic Units (OTUs) with an abundance lower than 0.005% were eliminated (Bokulich et al., 2013). Taxonomic affiliation of OTUs was performed based on sequence similarity using BLASTN (Altschul et al., 1990) against the reference databases EZBioCloud\_52018 for bacteria and UNITE Fungi v8.3 for fungi (Yoon et al., 2017; Nilsson et al., 2019). The remaining chimeras were manually filtered by OTU membership. Alpha diversity was calculated using the Chao1 index (Chao, 1984) to describe diversity within samples.

### 3.6.3. Microbial enumeration and isolation

Fresh core (10 g) and rind (25 cm<sup>2</sup>) samples were suspended in physiological water (0.9% NaCl (w/v)) to reach a concentration of 100 g.L<sup>-1</sup> cheese and homogenized for 90s at 250 rpm using a BagMixer® (Stomacher, Interscience, St-Nom, France). Cheese suspensions were plated on specific culture media. Fungal enumeration and isolation were performed on YEGC (yeast extract 5.0 g.L<sup>-1</sup>; glucose 20.0 g.L<sup>-1</sup>; agar 15.0 g.L<sup>-1</sup>; chloramphenicol 50 µg.mL<sup>-1</sup>; Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). Tryptic soy agar (TSA; Sigma Aldrich Co.) supplemented with 4.5% NaCl was used for halotolerant bacteria, while M17 supplemented with 0.5% glucose (GM17; Sigma Aldrich Co.) was used for lactic acid bacteria (LAB).

All colonies with different morphologies observed were isolated based on pigmentation, size, shape, rim, opacity (translucent, opaque, transparent), surface (smooth, rough), and height. They were stored at -80°C in YEG (fungi), GM17, or TSA medium supplemented with 4.5% NaCl (bacteria) in a liquid culture medium containing 15% glycerol (v/v). The systematic isolation of 794 cheese strains included 239 bacteria, 75 yeasts and 16 molds isolated from BR, while 343 bacteria and 121 yeasts were isolated from CV.

### 3.6.4. Abundance calculation

The abundance of each OTU was calculated by multiplying the relative abundance (expressed in %) obtained from the metabarcoding analysis by the total concentration in

CFU/g in cheese samples (microbiological enumeration) (adapted from Dannemiller et al., 2014)

### 3.6.5. Culture of cheese isolates and screening their antimicrobial activities

Screening for antifungal and antibacterial activity against common cheese spoilage agents and pathogens was performed using the overlay method (Hatoum, 2013; Russo et al., 2017). Briefly, a contaminating strain was inoculated on soft agar at a concentration of  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup>. This soft agar was brought into contact with cheese strains to evaluate their biopreservation capacity. The 794 fungal and bacterial cheese isolates were cultured from glycerol stock for 24h at 30°C in 96-well plates containing 200 mL of YEG medium or Brain Heart Infusion medium (BHI; Sigma-Aldrich), respectively. These cheese strains were spot inoculated using a 96-pin microplate replicator (Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA) and incubated at 25°C or 30°C for 24-72 hours, which are the optimal temperatures for fungal and bacterial contaminants, respectively (Inglin et al., 2015; Fernandez et al., 2017; Ceugniz et al., 2017a). The antifungal food additive natamycin (2.5 mg.L<sup>-1</sup>), used for cheese preservation, and the antibacterial chloramphenicol (10 mg.L<sup>-1</sup>) were selected as positive controls. Antimicrobial activity was observed by clear halos around cheese isolates. The experiments were performed in triplicate.

Antifungal activity was performed against *Candida parapsilosis* LMA-804, *Rhodotorula mucilaginosa* LMA-808, and *Yarrowia lipolytica* LMA-800, and the molds *Cl. cladosporioides* LMA-31, *Cl. herbarum* LMA-929, *Mucor racemosus* LMA-722 and *Penicillium commune* LMA-72 (Garnier et al., 2017a, Garnier et al., 2017b, Boor et al., 2017). Yeasts and molds were respectively grown 48 h and 10 days in YEG broth at 25°C (Lavoie et al., 2012). Screening of antibacterial activity was performed against *C. tyrobutyricum* LMG 1285, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, and *Staphylococcus aureus* ATCC 13709 (Stiles, 1996, Johnson, 2017, Silva et al., 2018). All these bacteria were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI; Sigma-Aldrich Co.) at 37°C for 24 h without agitation.



Bacterial and fungal cultures were enumerated using a hemocytometer (Malassez, Preciss, Paris, France) and Countess™ II automated cell counter, respectively (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Targets concentration was adjusted to  $10^6$  cells.mL<sup>-1</sup> in soft agar (0.75%) preferential media, poured over 1.5% agar BHI for bacteria or YEG for fungi.

#### 3.6.6. Molecular identification using rDNA sequencing of cheese isolates with antimicrobial activities.

Genomic DNA was obtained from potential antimicrobial bacteria and fungi by heating one colony in 20 µL of sterile deionized water for 15 min at 98°C. DNA templates were PCR-amplified using the following program: initial denaturation of 1 min at 94 C, followed by 33 cycles of (denaturation for 30 s, 94°C, annealing for 30 s, 53°C, and extension of 1 min 30 s, 72°C), and a final extension of 5 min at 72°C.

For bacterial identification, the universal 16S rDNA primer set 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') was used (Barry et al., 1991). Primers flanking the ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal DNA (rDNA) region, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), were chosen for yeast identification (White et al., 1990). The 50 µL PCR-reaction mixture contained 2 U of Taq DNA polymerase (New England Biolab, Ipswich, MA, USA), 2.5 µM dNTP (Thermo Scientific), 1X Taq buffer (New England Biolabs), 50 µM of each primer, and 1 µL of DNA sample. PCR amplicons were sequenced at the Plate-forme de séquençage et de génotypage des génomes (Centre de recherche du CHU de Québec, Université Laval, QC, Canada). The sequences were aligned by MEGAX v10.1.8 (S. Kumar et al., 2018) and Clustal Omega (Thompson et al., 1994). Molecular identification was performed using ITS database for BlastN in NCBI (Altschul et al., 1990) for yeasts identification and EzBioCloud 16S-based ID database for bacteria identification (Yoon et al., 2017).

## 3.7. Results and Discussion

### 3.7.1. Sequencing data and the diversity of cheese microbiota

High-quality sequencing data were obtained using the Illumina MiSeq sequencing platform for the cheeses Bourle Roncquoise (BR) and Carré du Vinage (CV). Rind (-R) and core (-C) ecosystems were studied separately. Bacterial ecosystems (-B) were described using V3-V4 16S rDNA, while fungi (-F) were identified using ITS2 (White et al., 1990) (Fig. 5). A total of 1,376,361 reads were sequenced for these 8 cheese ecosystems. For the bacterial profiles, 731,714 paired-end reads were sequenced, among which 564,812 non-chimeric sequences were assigned to 94 OTUs with an abundance >0.005%. For the fungal profiles, over the 675,260 paired-end reads sequenced, 644,644 non-chimeric sequences were retrieved and assigned to 68 OTUs (abundance >0.005%).

The  $\alpha$ -diversity calculated for CV showed lower fungal diversity compared to BR, with a Chao1 index of 15.75 on the surface and 11.00 in the core. In contrast, the bacterial Chao1 index was higher, with values of 37.10 in the core and 47.25 on the surface. These results are consistent with those observed for similar French cheeses, such as Saint-Nectaire (pressed uncooked cheese) or Maroilles (soft washed rind cheese) (Dugat-Bony et al., 2016), as well as similar terroir cheeses from the province of Quebec (Raymond-Fleury et al., 2022).

### 3.7.2. The ecosystem of Bourle Roncquoise

In the pressed uncooked cheese made from thermized cow's milk Bourle Roncquoise (BR), microbial enumeration of the microbiota showed that BR-R contained  $1.74 \pm 0.32 \times 10^{10}$  fungal CFU/g and  $2.21 \pm 0.25 \times 10^{10}$  bacterial CFU/g. In comparison, BR-C displayed lower microbial concentrations of  $1.68 \pm 0.24 \times 10^7$  fungal CFU/g and  $3.81 \pm 0.2 \times 10^9$  bacterial CFU/g. In this cheese ecosystem, 162 bacterial and 46 fungal OTUs on the rind, and 104 bacterial and 57 fungal OTUs in the core were identified.

Metabarcoding allowed the identification of 5 and 14 bacterial genera in BR cheese core and rind, respectively. The starter culture *S. thermophilus* ( $3.8 \times 10^9$  CFU/g) was the highest bacteria found in BR-C and BR-R ( $9.33 \times 10^9$  CFU/g) (Fig. 5). *Streptococcus*

*thermophilus* is generally used by cheesemakers for its aptitude for galactose fermentation, accumulation of essential amino acids, biosynthesis of some vitamins, and production of exopolysaccharides (Zha et al., 2015; Markakiou et al., 2020). This LAB plays a central role in dairy products by producing formic acid through lactose metabolism, which subsequently stimulates the growth of other LAB starter cultures, such as lactobacilli and lactococci (Carr et al., 2002; Markakiou et al., 2020). Moreover, lactobacilli contribute to increase proteolysis and supply an assortment of amino acids and peptides, enabling the streptococci to proliferate more rapidly. Regardless of the other LAB strain employed, *S. thermophilus* remains the major acid producer during the soft cheese production process (Tidona et al., 2020), and would play an important role in the maturation of cheese such as the BR. This specie should play a pivotal role in the maturation of cheeses such as BR.

The starter LAB *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* were not detected in BR ecosystems, most likely because they were not abundant enough and the secondary microbiota took over during maturation. (Ramírez-Nuñez et al., 2011) (Fig. 5). The coryneform bacteria *Brevibacterium* ( $5.55 \times 10^9$  CFU/g), *Brachybacterium* ( $3.93 \times 10^9$  CFU/g) and *Corynebacterium* ( $1.69 \times 10^9$  CFU/g) were most abundant on BR-R, probably favored by the presence of molds that contribute to the alkalization of the cheese surface. *Coryneform* bacteria colonize the surface of cheese during ripening and play an important role in shaping the texture, flavor and color of cheese (Quijada et al., 2018). These coryneform bacteria have also been detected ( $<1 \times 10^7$  CFU/g) in BR-C, despite their oxygen demand (Denis & Irlinger, 2008), which could be explained by their mobility towards the center of BR (Fig. 5).

On the rind, halotolerant bacteria *Halomonas* ( $8.87 \times 10^8$  CFU/g), *Psychrobacter* ( $4.95 \times 10^8$  CFU/g) were very abundant, while *Acinobacter*, *Cobetia*, *Pseudoalteromonas*, *Ralstonia*, *Salinicola*, *Haemophilus* and *Staphylococcus* were detected in relative abundances  $<5 \times 10^7$  CFU/g, (Fig. 5). Microorganisms from the production environment (milk, wash solution, brine, air and ripening room conditions) (Brennan et al., 2002; Ceugniz, Taminiau, et al., 2017b) can be transferred from production surfaces to the outer surface of cheese (Choi et al., 2020), which could have influenced the microbial composition of the BR-R secondary microbiota. In addition, at the end of the ripening process, a gradient of water content is generally observed between the cheese core and surface, mainly because of water evaporation, which reduces the

water activity ( $A_w$ ) and enhances NaCl concentration (Monnet et al., 2015), thus favoring the establishment of halotolerant bacteria, highly abundant in the dairy environment (Stellato et al., 2015).

Highly abundant yeasts and molds were identified in BR (Fig. 5). Although not intentionally inoculated during the cheesemaking process, these fungi can impart distinct sensory, flavor and visual attributes to the cheese (Banjara et al., 2015). BR-R showed significant surface fungal microbiota ( $1.74 \times 10^{10}$  CFU/g) where the mold *Penicillium* was the dominant fungi present ( $1.34 \times 10^{10}$  CFU/g). *Penicillium* species are known for their ability to raise the pH and provide the white, fluffy appearance of molds and washed-ripened cheeses, including BR (Jurado & Vicente, 2020). This mold inhabits the surfaces of ripened cheeses worldwide, either as intentionally added starter cultures during cheesemaking (Ropars et al., 2012), or, as in this case, as an indigenous fungal population from the environment of cheese facilities (Bodinaku et al., 2019). *Penicillium* is rarely found in cheese cores ( $2.2 \times 10^6$  CFU/g in BR-C) because of its high oxygen requirements (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Moreover, its natural development on the cheese surface is favored by high relative humidity content of the ripening room (Bodinaku et al., 2019), and by the presence of older cheeses where the mold has already developed (Jurado and Vicente, 2020).

On BR-R, the second most abundant filamentous fungi was *Mucor racemosus* ( $1.11 \times 10^9$  CFU/g) (Fig. 5). This mold can be considered as a spoilage agent for uncooked pressed cheese, when its presence becomes chronic and persistent (De Respinis et al., 2023). However, certain *Mucor* species (*M. racemosus*, *M. lanceolatus*) are now used as ripening cultures in semi-soft cheeses such as Saint-Nectaire, Tomme de Savoie or Taleggio (Marcellino and Benson, 2013; De Respinis et al., 2023). Their lipolytic and proteolytic activities contribute to the typical organoleptic attributes of cheeses (semi-soft cheese, Irish cheese, Eastern cheese or Brazilian cheese) (Hermet et al., 2012; Ozturkoglu-Budak et al., 2016; Kamilari et al., 2022).

In the cheese matrix, the high salt content, low pH, low temperature and the presence of lactate, which can be metabolized as a carbon source, may facilitate the colonization of the yeast *Debaryomyces hansenii* ( $2.12 \times 10^9$  CFU/g on BR-R; Fig. 1) (Bintsis, 2021). Raw milk, ripening room and farm environment could be a reservoir of *D. hansenii* (Van

den Tempel and Jakobsen, 2000; Huang et al., 2021). In particular, *D. hansenii* is the predominant yeast species in many types of cheeses, especially surface-ripened cheeses (Gori et al., 2012). Its growth contributes to an increase in cheese surface pH through the assimilation of lactate and the production of alkaline metabolites such as ammonia (Huang et al., 2021), which facilitates the proliferation of less acid-tolerant smear bacteria (Bintsis, 2021).

In BR-C, *Candida* sp. ( $1.26 \times 10^7$  CFU/g; Fig. 5), *Penicillium* sp. ( $2.2 \times 10^6$  CFU/g), *D. hansenii* ( $1.64 \times 10^6$  CFU/g) and *Mucor* sp. ( $2.5 \times 10^5$  CFU/g), along with less abundant genera such as *Fusarium*, *Malassezia*, *Pichia*, and *Cladosporium* ( $>1 \times 10^5$  CFU/g) were identified (Fig. 5). They are most likely present because of environmental contamination during cheesemaking, and from the indigenous microbiota of milk (Fleet, 1990; Delavenne et al., 2011; Irlinger et al., 2015; Polke et al., 2015; Bintsis, 2021). Yeasts such as *Candida* sp. can originate from a variety of sources, including the milk-producing animal, milking equipment, or the broader agricultural environment (Quigley et al., 2013). Although not universally desirable in all types of cheese, this yeast, which is often found in soft cheeses such as Stilton or Feta, can contribute to the ripening process by aiding in its alkalization (Gkatzionis et al., 2014; Papadimitriou et al., 2022).

The lower concentration of fungi in the core compared to the rind could be attributed to its dense, oxygen-depleted composition, and these yeasts, *Candida* sp., *Penicillium* sp., *D. hansenii* and *Mucor* sp. were also found in the pressed uncooked cheese (Bintsis, 2021; Delgado et al., 2023).

### 3.7.3. The ecosystem of Carré du Vinage

Carré du Vinage (CV) is a soft washed rind cheese made from thermized cow's milk. The CV ecosystem described in this work was representative of washed-rind farmhouse cheeses. (Dalcenserie et al., 2014; Schmitz-Esser et al., 2018; Saak et al., 2023). Microbial enumeration of the microbiota showed that CV-R contained  $1.20 \pm 0.31 \times 10^9$  fungal CFU/g and  $1.41 \pm 0.23 \times 10^{10}$  bacterial CFU/g (Fig. 5). In comparison, CV-C displayed lower microbial concentrations with  $5.49 \pm 0.21 \times 10^6$  fungal CFU/g and

$1.35 \pm 0.2 \times 10^{10}$  bacterial CFU/g. In CV ecosystem, 126 bacterial and 17 fungal OTUs were identified on the rind, and 140 bacterial and 21 fungal OTUs in the core. Bacterial metabarcoding for CV allowed the identification of 19 and 17 genera in the cheese core and rind, respectively (Fig.5). The abundance and diversity of these bacteria varies throughout the ripening process (Anastasiou et al., 2022).

The cheeses sampled were dominated by the three phyla *Actinomycetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The surface of the CV provides an optimal environment for these microorganisms (Feurer et al., 2004; Irlinger and Monnet, 2021), because these three phyla have similar physiological characteristics, share requirements for oxygen and temperature, and exhibit tolerance to alkalinity and high salt concentrations. (Brennan et al., 2002; Denis and Irlinger, 2008; Montel et al., 2014; Ceugniez et al., 2017b).

*Actinomycetes*, including *Corynebacterium* spp. ( $2.70 \times 10^9$  CFU/g in CV-C and  $1.29 \times 10^9$  CFU/g on CV-R), *Glutamicibacter* ( $2.69 \times 10^8$  CFU/g in CV-C and  $1.24 \times 10^9$  CFU/g on CV-R), *Brevibacterium* ( $8.90 \times 10^7$  CFU/g in CV-C and  $1.70 \times 10^8$  CFU/g on CV-R), and *Microbacterium* ( $1.74 \times 10^7$  CFU/g in CV-C and  $4.58 \times 10^7$  CFU/g on CV-R) may contribute to the sensory properties of these cheeses with their extracellular proteinases, lipases, and aromatic compounds. Their production of the carotenoids isorenieratene, 3-hydroxy-isorenieratene, and 3,3'-di-hydroxy-isorenieratene (Dufossé and de Echanove, 2005; Giuffrida et al., 2020) confer the distinctive orange-brown surface of washed-rind cheeses (Brennan et al., 2002; Irlinger and Monnet, 2021; Korena et al., 2023).

The *Firmicutes* bacteria *Staphylococcus* ( $1.06 \times 10^6$  CFU/g in CV-R) and *Streptococcus* ( $8.69 \times 10^8$  CFU/g in CV-C and  $3.46 \times 10^6$  CFU/g on CV-R) were also identified in CV (Fig. 5). These bacteria, which are common in milk, contribute to the cheese ripening process. The 2.4 log difference observed between rind and core for *Streptococcus* concentration could be attributed to the NaCl concentration, which generally inhibits its growth when it exceeds 2% (Carr et al., 2002). The Firmicutes phylum consists of microorganisms that influence the development of cheese flavor and texture throughout the ripening process (Mounier et al., 2017; Li et al., 2021). In fact, these bacteria can produce enzymes that are essential for the synthesis of linear alkanes and alcohols. (Yang et al., 2020). Linear alkanes and alcohols contribute to the overall flavor and aroma profile

of cheese and, depending on their specific structures and concentrations, can impart a range of sensory characteristics, from fruity and floral notes to earthy or fatty nuances (Gómez-Torres et al., 2016).

The *Proteobacteria Halomonas* ( $9.87 \times 10^7$  CFU/g in CV-C, and  $2.95 \times 10^8$  CFU/g on CV-R), *Marinomonas* ( $6.77 \times 10^7$  CFU/g in CV-C, and  $3.89 \times 10^7$  CFU/g on CV-R), *Vibrio* ( $4.45 \times 10^8$  CFU/g in CV-C, and  $6.93 \times 10^8$  CFU/g on CV-R), *Psychrobacter* sp. ( $8.71 \times 10^8$  CFU/g in CV-C, and  $2.90 \times 10^9$  CFU/g on CV-R), *Raoultella* ( $5.38 \times 10^8$  CFU/g on CV-C) and *Klebsiella* ( $1.99 \times 10^8$  CFU/g on CV-C) (Fig. 5) generally originate from marine environments (Monnet et al., 2015; Mounier et al., 2017). The presence of marine bacteria in ripened cheese is influenced by factors such as salt concentration, pH, and low temperatures (Mounier et al., 2017). Halotolerant psychrophilic bacteria are introduced via brine, tools, and surfaces rather than being inherent to raw milk (Brennan et al., 2002). The dynamics of these bacteria fluctuate with environmental conditions during ripening, particularly in response to salt concentration, highlighting the importance of hygiene practices and management of external factors in shaping the microbial composition of ripened cheeses (Monnet et al., 2015; Mounier et al., 2017; Raymond-Fleury et al., 2022). Yeasts and molds contribute to the alkalinization of the cheese surface through lactate metabolism and proteolytic activity, resulting in the release of alkaline metabolites (NH<sub>3</sub>) (Irlinger & Mounier, 2009). These mechanisms have allowed the growth of acid-sensitive microorganisms that are more proteolytic and salt-tolerant (Bintsis, 2021). *Fusarium domesticum* and *D. hansenii* thrive in the high humidity environment of the ripening room and in the cheese environment (Bachmann et al., 2005; Ropars et al., 2012; Montel et al., 2014). The species *F. domesticum* ( $4.43 \times 10^6$  CFU/g in CV-C, and  $1.06 \times 10^9$  CFU/g on CV-R; Fig. 5), commonly referred to as 'Anticollanti', is known to facilitate the drying process of cheese surfaces, which reduces stickiness (Bachmann et al., 2005; Ropars et al., 2012; Irlinger et al., 2015). It is responsible for the typical moldy rinds of Saint-Nectaire and Reblochon (Mounier et al., 2017; Savary et al., 2023). The second most dominant species, *D. hansenii* ( $1.04 \times 10^6$  CFU/g in CV-C, and  $1.33 \times 10^8$  CFU/g on CV-R; Fig. 5), is commonly found in milk even after pasteurization, and in cheese-making environments (Gori et al., 2012). *Debaryomyces hansenii* can be part of both the native cheese microbiota (from milk) and the microbiota that develops during cheese ripening (from the environment of cheese ripening). It can use lactate as its primary carbon source and produces both proteolytic and lipolytic enzymes, enabling the

breakdown of milk proteins and fats (Gori et al., 2012). Moreover, this microorganism can grow in cold temperatures with low water activity (Fröhlich-Wyder et al., 2019). In cheeses, this yeasts species generates desirable nutty and malty flavors through the production of branched chain aldehydes (Gori et al., 2012) and highly participates to the establishment of the secondary microbiota, such as *Coryneform* bacteria (Huang et al., 2021).

Other fungal genera were identified only in the core (*Aspergillus*, *Malassezia*) or in both rind and core ecosystems (*Candida*, *Penicillium*) in lower proportions (>0.5%), confirming that the CV ecosystem is representative of a washed rind farmhouse cheese (Delcenserie et al., 2014; Schmitz-Esser et al., 2018; Saak et al., 2023).

#### 3.7.4. Screening the antimicrobial activities of cheese isolates

Microbial interactions within cheese ecosystems are essential to ensure consistent quality, flavor profiles, and sustainability (Corsetti et al., 2001; Nájera et al., 2021). In this study, metabarcoding was used to provide an overview of the microbial ecosystems of two French cheeses, Bourle Roncquoise and Carré du Vinage. The systematic screening of BR and CV isolates against pathogens and spoilage agents specific to these cheeses allows us to identify the potential of cheese as a reservoir for biopreserved strains. Biopreservation is defined as the use of beneficial microorganisms or their metabolites to control the growth of undesirable microorganisms responsible for food spoilage and contamination (Stiles, 1996).

All 794 strains isolated from the core and surface of BR and CV cheeses were tested against the 10 spoilage or pathogen bacteria *C. tyrobutyricum* LMG 1285, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, and *S. aureus* ATCC 13709, and the 7 spoilage fungi *C. parapsilosis* LMA-804, *R. mucilaginosa* LMA-808, and *Y. lipolytica* LMA-800, and the molds *Cl. cladosporioides* LMA-31, *Cl. herbarum* LMA-929, *M. racemosus* LMA-722 and



*P. commune* LMA-72. In total, 34 antifungal strains (Table 2) and 15 antibacterial strains (Table 3) were isolated from the two cheeses.

Of the 794 microorganisms screened from French cheeses, 5.8% showed antifungal activity, while only 1.9% showed antibacterial activity. Considering that some of them are opportunistic pathogens (Lee and Anjum, 2023, Ramirez and Giron, 2023), they were discarded as potential biopreservatives. This highlights the presence of microbial strains with potential applications in biopreservation in ecosystems as diverse and complex as those found in cheese. The screening method used in this study is one technique for identifying potentially antimicrobial strains, but alternative approaches such as metagenomics and metabolomics can also be used for this purpose (Borges et al., 2022). In addition, omics techniques are being used to uncover the potential of food ecosystems in the search for bioprotective microorganisms. For example, genome exploration through functional gene annotation analysis using databases such as antiSMASH (Blin et al., 2023) and BAGEL (Suárez et al., 2020) allow the identification of gene clusters involved in the biosynthesis of antimicrobial compounds (Borges et al., 2022).

Interestingly, two species belonging to the *Enterobacteriaceae* family, *Klebsiella* sp. LMA-2004 and ICVB520, and *Raoultella* sp. LMA-2002 found in CV-C showed multiple antifungal activities (Table 2). *Klebsiella* sp. LMA-2004 and ICVB520 showed inhibitory activity against *R. mucilaginosa*, *P. commune*, *M. racemosus* and *L. monocytogenes*, while *Raoultella* sp. LMA-2002 showed exclusively antifungal activities against *Y. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*, *Cl. cladosporioides*, *Cl. herbarum* and *P. commune*. These bacteria generally originate from soil and plants, and they also serve as essential components of the farm ecosystem (soil, water troughs, feces, and rumen contents), the presence of these bacterial genera is typical of washed-rind cheeses (Sękowska, 2017; Alampoondi Venkataramanan et al., 2021; Dong et al., 2022). While these two bacteria, previously associated with farm cheeses, possess inhibitory properties against bacteria and fungi, their potential as biopreservation agents is limited due to their involvement in bovine mastitis (Zadoks et al., 2011; Irlinger et al., 2015; Salazar et al., 2018). These two bacteria are also considered opportunistic human pathogens and, as such, are primarily studied to assess their antibiotic resistance rather than their potential as biopreservation strains. (Dong et al., 2022). One hypothesis that could explain their antimicrobial activity could be related to the production of microcins, low molecular

weight molecules synthesized by ribosomes, highly stable and of bacterial origin (Denkovskienė et al., 2019). These microcins are involved in antagonistic interactions and function as virulence factors (Baquero et al., 2019). Microcins interact with multiple cellular targets, resulting in diverse modes of action. These include membrane disruption, as exemplified by microcin E492, and inhibition of vital enzymatic functions such as the ATP synthase complex (e.g., microcins M, H47), RNA polymerase (e.g., microcin J25), DNA gyrase (e.g., microcin B17), or aspartyl-tRNA synthetase (e.g., microcin C) (Simons et al., 2020b).

*Enterococcus faecalis* is typically found in artisanal cheeses. In this study, six *E. faecalis* isolates from CV-C and CV-R showed anti-*Listeria* and anti-*C. tyrobutyricum* activities (Table 3). This heat-resistant non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) species is part of the dairy microbiota and farm environment, which explains its presence in many pasteurized, thermized and raw milk cheeses, where it can contribute to desirable flavor development during cheese ripening. (Giraffa et al., 1997, 2003; Foulquié Moreno et al., 2006; Hanchi et al., 2018). However, high concentration ( $>10^7$  CFU/g) of *E. faecalis* could indicate poor hygiene practices (Giraffa, 2002; Khan et al., 2010). In CV, its concentration was probably too low to be detected by metabarcoding (Fig. 5). This species has already demonstrated antimicrobial activity through the production of enterocins. (Khan et al., 2010; Kasimin et al., 2022), a class of bacteriocins consisting of small molecular peptides that exhibit antimicrobial activity against Gram-positive bacteria such as *L. monocytogenes* (Hanchi et al., 2018). Thus, bacteriocinogenic *Enterococcus* strains can be used as protective starter cultures, while bacteriocins could be used in the form of purified preparations, paving the way for promising opportunities in various sectors of the food industry (Grande Burgos et al., 2014; Garmasheva and Oleschenko, 2023).

There are several types of bacteriocins (A, AS-48, B, P, Q, L50, L50A/DD14A, and L50B/DD14B) produced by *E. faecalis*, each with its own spectrum of activity and different targets (Wu et al., 2022; Ladjouzi et al., 2023). For instance, enterocins A/B exhibit inhibitory activity against a broad spectrum of pathogenic bacteria, including certain strains of *Staphylococcus* and *Listeria* (Coburn and Gilmore, 2003; Wu et al., 2022). Another variant, Enterocin P, is recognized for its effectiveness against *L. monocytogenes*, making it particularly valuable in preventing food contamination. (Rouhani et al., 2022). Enterocins L50A/B exhibit broad-spectrum antibacterial activity

against multiple pathogens, including *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Cintas et al., 1998; Wu et al., 2022). Enterocin Q, on the other hand, is active against several *Clostridia*, making it relevant for the prevention of intestinal infections (Giraffa, 2002; Criado et al., 2006). Finally, Enterocin AS-48 has a broad spectrum of antimicrobial activity, including activity against Gram-negative bacteria such as *E. coli*, making it a potentially useful agent in a variety of applications. (Grande Burgos et al., 2014; Garmasheva and Oleschenko, 2023). These diverse enterocins serve as a natural defense mechanism against pathogens and have significant potential in areas such as food preservation and the development of novel antimicrobial therapies (Kasimin et al., 2022).

The two halotolerant bacteria *Marinomonas* sp. ( $3.89 \times 10^7$  CFU/g in CV-C; Fig. 5) and *Halomonas* sp. ( $2.95 \times 10^8$  CFU/g in CV-C), typical of washed-rind cheeses (Mounier et al., 2017) exhibited antifungal activities (Table 2). The isolate ICVB510 from *Marinomonas* sp. displayed antimicrobial activity against *S. enterica* serovar Typhimurium, consistent with previous findings regarding the inhibitory potential of *Marinomonas* species against a range of bacteria including Gram-negative and Gram-positive through the production of Marinocin (Lucas-Elio et al., 2005; 2006) or production of indole-3-carboxaldehyde, an antibiofilm compound (Rajalaxmi et al., 2016). *Halomonas* sp. LMA-2041 showed antifungal activity against *C. cladosporioides* and *P. commune* (Table 2), which is consistent with another *Halomonas* strain, obtained from shallow salt lakes, which showed antifungal activity against *Botrytis cinerea* (Essghaier et al., 2009).

Our search for antagonistic activities revealed that several yeasts could be used for cheese biopreservation. Due to its ability to survive in cheese environments with high NaCl concentration, low pH, and the presence of lactate as carbon source, *D. hansenii* is commonly found on cheese surfaces (Sørensen et al., 2011; Ceugniet et al., 2015; Bintsis, 2021). In both BR-C and BR-R ( $2.12 \times 10^9$  CFU/g on BR-R and  $1.64 \times 10^6$  CFU/g in BR-C; Fig. 5), seventeen *D. hansenii* isolates showed antagonistic activity against contaminant yeasts and pathogenic bacteria (Table 2). Other *D. hansenii* isolates from dairy products have previously shown inhibition of *Listeria* (Hatoum et al., 2013), *Penicillium camemberti*, and *P. roqueforti* (Van Den Tempel and Jakobsen, 2000; Medina-Córdova et al., 2018). *D. hansenii* have demonstrated a wide range of antimicrobial activities (Al-Qaysi et al., 2017), and has Qualified Presumption of Safety

(QPS) status, which could make it a potential biopreservative yeast in cheese production (Koutsoumanis et al., 2020).

The most promising yeast isolated from CV-C, *Metschnikowia pulcherrima* LMA-2038, showed multiple activities. Indeed, its antibacterial and antifungal activities were observed against the bacteria *C. tyrobutyricum*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, and *S. aureus*, and the fungi *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica*, *Cl. cladosporoides*, *Cl. herbarum*, and *P. commune*, respectively. This strain is usually present in wine ecosystems or on fruit surfaces (Pawlikowska et al., 2019; Vicente et al., 2020). Its absence from our metabarcoding analysis (Fig. 5) could be explained by a too low abundance in cheese ecosystems, or a challenge to recover its DNA (Shikha et al., 2021). The yeast *M. pulcherrima* LMA-2038 is known to produce antifungal compounds that inhibit yeasts and molds associated with food spoilage and potential pathogenicity, such as on *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* (Sipiczki 2006; Janakiev et al., 2022; Fernandez-San Millan et al. 2022). *Metschnikowia pulcherrima* produces various extracellular antimicrobial compounds including pulcherrimin, a reddish-brown pigment that acts such as a siderophore (Mažeika et al., 2021), killer toxins (Büyüksırt-Bedir and Kuleaşan, 2022), and volatile compounds (Millan et al., 2022). Its multifaceted antifungal activities are likely due to the synergistic action of multiple molecules, including long-chain fatty acids, alkaloids, antibiotics, and bile acids (Sipiczki, 2020; Büyüksırt Bedir and Kuleaşan, 2021; Fernandez-San Millan et al., 2022). Further research is necessary to understand the mechanisms of its antibacterial activity and target specificity.

### 3.8. Conclusion

The application of the metabarcoding approach provided insightful data into the intrinsic microbial ecosystems of BR and CV cheeses. Indeed, the taxonomic diversity inherent in these artisanal cheeses contributes to their specificity, including a reduced susceptibility to pathogenic contamination and a wider range of flavor nuances. The ecosystems found are typical of their cheese type, soft washed rind (CV) and pressed uncooked (BR). The presence of certain microorganisms, but also the abundance of each species and the interactions between them, can influence the flavor profile by producing

certain aromatic compounds in varying amounts, thus playing a crucial role in the development of distinct organoleptic characteristics specific to each type of cheese, contributing to its unique flavor. The analysis of microbial diversity through metabarcoding of Bourle Roncquoise (BR) and Carré du Vinage (CV) cheeses enhances our understanding of these particular artisanal cheeses. In addition, our systematic screening of BR and CV isolates against pathogens and spoilage agents of these cheeses revealed the potential of cheese as a reservoir for biopreserved strains. Metagenomic studies and screening approaches have identified microorganisms with antimicrobial properties against common cheese contaminants, 1.9% of antibacterial strains and 5.8% antifungal strains. In particular, certain strains, such as *M. pulcherrima* LMA-2038 and *Marinomonas* sp. ICVB510, appear promising due to their multiple antagonistic activities without posing a risk as opportunistic pathogens. However, it is crucial to further investigate the underlying mechanisms responsible for the antagonistic activities and to ensure that these microorganisms maintain their activity under *in vivo* conditions. In addition, the impact of introducing these beneficial microorganisms during the cheese making process on the overall microbial development of the cheese requires careful consideration. The study of antagonistic microbial interactions in cheese ecosystems, enabled by metabarcoding techniques and metagenomic screening, provides a general perspective on cheese quality, safety and typicality. This research not only contributes to our understanding of cheese microbiota, but also holds promise for the development of biopreservation strategies that enhance both the safety and flavor profile of artisanal cheeses such as Bourle Roncquoise and Carré du Vinage.

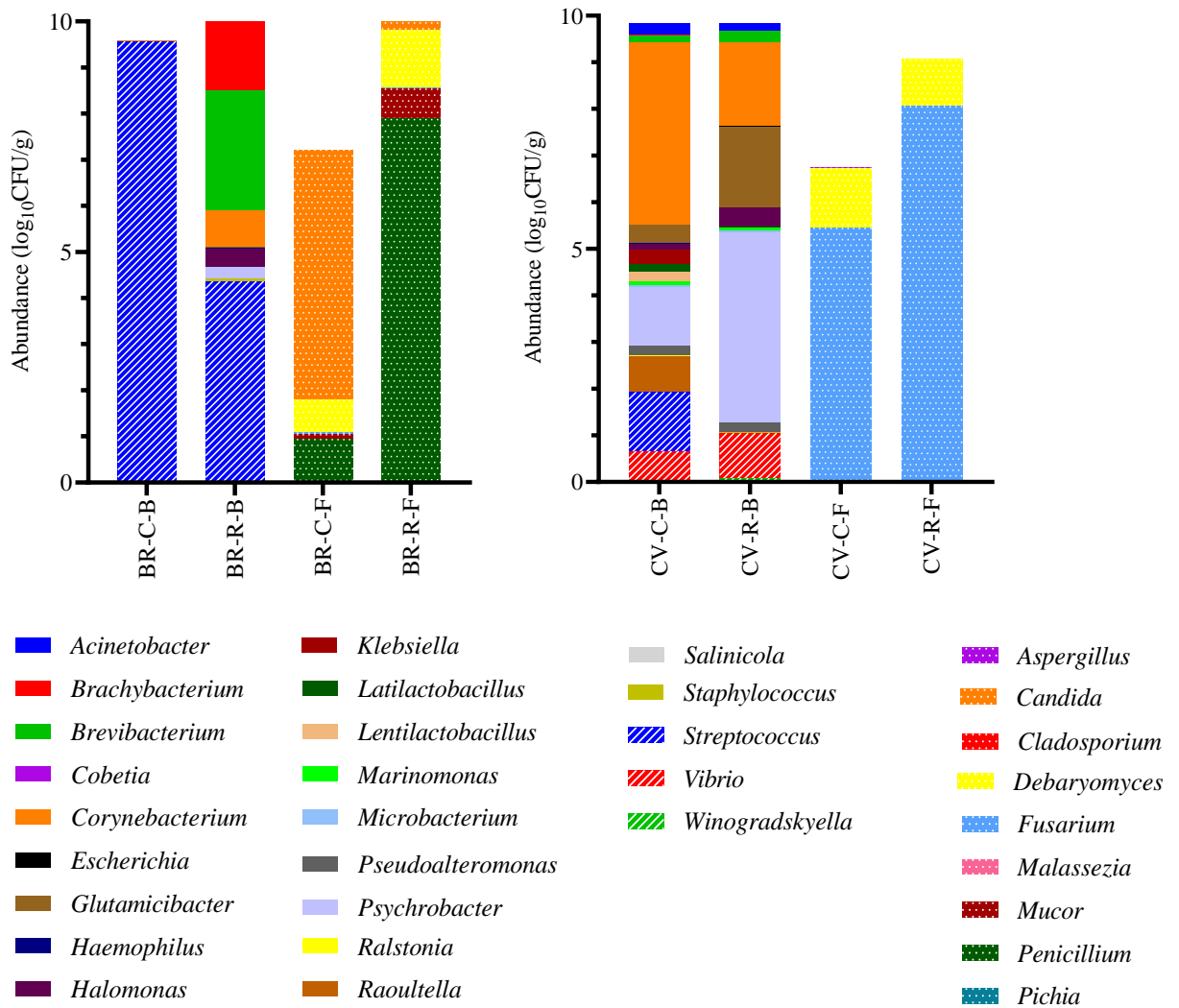
Conflict of interest:

The authors confirm that they do not have any conflict of interest with respect to the work described in this manuscript.

Acknowledgements

Aude Commenges was the recipient of a scholar fellowship from Université de Lille (France) and Université Laval (Québec, Canada). The authors acknowledge the Hauts-de-France region, through BiHauts de France CPER FEDER program 2022-2027. This

work was also funded by the NSERC Discovery grant program (S. Labrie, RGPIN-2023-04878).



**Figure 5.** Abundance of bacteria (-B) and Fungi (-F) in both the core (-C) and the rind (-R) of Bourle Roncquoise (BR) (left) and Carré du Vinage (CV) (right) french cheeses

**Table 2.** Antifungal activities of cheese strains

Genus, species	Strains	Sample	<i>Yarrowia lipolytica</i> LMA-800	<i>Candida parapsilosis</i> LMA-804	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> LMA-808	<i>Cladosporium cladosporioides</i> LMA-31	<i>Penicillium commune</i> LMA-72	<i>Mucor racemosus</i> LMA-722	<i>Cladosporium herbarum</i> LMA-929
<i>Corynebacterium casei</i>	LMA-2003	CV-C	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsellia</i> sp.	LMA-2004, ICVB520	CV-C	-	-	+	-	+	+	-
<i>Marinomonas</i> sp.	ICVB510, LMA-2007	CV-C	-	-	+	-	-	-	+
<i>Marinomonas</i> sp.	LMA-2039, LMA-2040	CV-C	-	-	-	+	+	-	-
<i>Marinomonas</i> sp.	LMA-2042	CV-C	-	-	-	+	-	-	-
<i>Halomonas</i> sp.	LMA-2041	CV-C	-	-	-	+	+	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	ICVY045	CV-C	+	+	+	+	+	-	+
<i>Raoultella planticola</i>	LMA-2002	CV-C	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	LMA-2008	CV-R	+	+	+	-	+	-	-
	LMA-2009, LMA-2010, LMA-2011, LMA-2012, LMA-2018, LMA-2019	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-1999	BR-R	+	-	-	-	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2035	BR-C	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2043, LMA-1997	BR-C	-	-	-	-	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2025, LMA-2028, LMA-2032	BR-C	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida atlantica</i>	LMA-2014, LMA-2013, LMA-2015, LMA-2016,	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-2017, LMA-2000, LMA-1998, LMA-2020	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-2021, LMA-2022,	BR-C	+	-	-	-	-	-	-



---

LMA-2023,  
LMA-2033,  
LMA-2034,  
LMA-2037,  
LMA-2024,  
LMA-2026,  
LMA-2027,  
LMA-2029,  
LMA-2030,  
LMA-2031,  
LMA-2036

---

LMA: Laboratoire de Mycologie Alimentaire (U. Laval); ICV : Institut Charles Viollette (U. Lille)

+: inhibition

-: no inhibition

**Table 3** Antibacterial activities of cheese strains

Genus, species	Strains	Sample	<i>Clostridium tyrobutiricum</i> LMG 1285	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 105459	<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 82.110T	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> ATCC 53648	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13709
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ICVB515,	CV-C	+	-	-	-	-	-
	ICVB519							
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB516,	CV-C	+	-	-	-	-	-
	ICVB517, ICVB518							
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	ICVY046	CV-C	+	+	+	+	-	+
<i>Marinomonas</i> sp.	ICVB510	CV-C	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i> sp.	ICVB520	CV-C	-	-	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB521	CV-R	+	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB522	CV-R	+	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB523	CV-R	-	+	+	+	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	ICVY047,	BR-C	-	-	+	-	-	-
	ICVY048,							
	ICVY049							
<i>Debaryomyces hansenii</i>	ICVY050	BR-C	-	-	+	-	-	-

LMA: Laboratoire de Mycologie Alimentaire (U. Laval); ICV : Institut Charles Viollette (U. Lille)

+ : inhibition

-: no inhibition

### 3.9. References

- Alampoondi Venkataramanan, S.V., George, L., Sahu, K.K., Abraham, G.M., (2021). A 5-year retrospective analysis of *Raoultella planticola* bacteriuria. *Infect Drug Resist* 14, 1989–2001.
- Al-Qaysi, S.A.S., Al-Haideri, H., Thabit, Z.A., Al-Kubaisy, W.H.A.A.-R., Ibrahim, J.A.A.-R., (2017). production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *Int. J. Microbiol.* 2017, 2605382
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol* 215, 403–410.
- Anastasiou, R., Kazou, M., Georgalaki, M., Aktypis, A., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., (2022). Omics approaches to assess flavor development in cheese. *Foods* 11, 188.
- Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A.V., Nobile, M.A.D., (2014). Biopreservation of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science* 97, 5345–5355.
- Bachmann, H.P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M.G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M.T., Fürst, M., (2005). Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias Anticollanti on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* 38, 399–407.
- Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adams, H.E., (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr Microbiol* 70, 792–800.
- Baquero, F., Lanza, V.F., Baquero, M.-R., Del Campo, R., Bravo-Vázquez, D.A., (2019). Microcins in *Enterobacteriaceae*: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Front Microbiol* 10, 2261.
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L.K., Gannon, F., (1991). The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Res.* 1, 51–56.
- Bintsis, T., (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiol* 7, 447–470.
- Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H.E., Reitz, Z.L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B.R., Metcalf, W.W., Helfrich, E.J.N., van Wezel, G.P., Medema, M.H., Weber, T., (2023). antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Res.* 51, W46–W50.
- Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A.B., Steenwyk, J.L., Biango-Daniels, M.N., Kastman, E.K., Rokas, A., Robbat, A., Wolfe, B.E., (2019). Rapid phenotypic and metabolomic domestication of wild *Penicillium* molds on cheese. *mBio* 10, e02445-19.
- Boor, K.J., Wiedmann, M., Murphy, S., Alcaine, S., (2017). A 100-year review: microbiology and safety of milk handling. *J Dairy Sci* 100, 9933–9951.

Borges, F., Briandet, R., Callon, C., Champomier-Vergès, M.-C., Christieans, S., Chuzeville, S., Denis, C., Desmasures, N., Desmonts, M.-H., Feurer, C., Leroi, F., Leroy, S., Mounier, J., Passerini, D., Pilet, M.-F., Schlusshuber, M., Stahl, V., Strub, C., Talon, R., Zagorec, M., (2022). Contribution of omics to biopreservation: toward food microbiome engineering. *Front Microbiol* 13, 951182.

Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M., Cogan, T.M., (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 68, 820–830.

Brul, S., Coote, P., (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1–17.

Büyüksırt Bedir, T., Kuleaşan, H., (2021). A natural approach, the use of killer toxin produced by *Metschnikowia pulcherrima* in fresh ground beef patties for shelf life extension. *Int J Food Microbiol* 345, 109154.

Büyüksırt-Bedir, T., Kuleaşan, H., (2022). Purification and characterization of a *Metschnikowia pulcherrima* killer toxin with antagonistic activity against pathogenic microorganisms. *Arch Microbiol* 204, 337.

Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28, 281–370.

Ceugniez, A., (2017). Recherche de levures antagonistes, à potentiel probiotique, dans les produits du terroir du Nord-Pas-de-Calais : étude de *Kluyveromyces marxianus* et *K. lactis*, isolées d'un fromage artisanal, la Tomme d'Orchies (These de doctorat). Lille 1.

Ceugniez, A., Coucheney, F., Jacques, P., Daube, G., Delcenserie, V., Drider, D., (2017a). Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Res. Microbiol.* 168, 575–582.

Ceugniez, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F., (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol.* 52, 177–184.

Ceugniez, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., Drider, D., (2017b). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 65–69.

Ceugniez, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., Drider, D., (2017c). Fungal diversity of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *Int. J. Food Microbiol.* 258, 89–93.

Chao, A., (1984). Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand. Stat. Theory Appl.* 11, 265–270.

Choi, J., Lee, S.I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Ha, S.-D., Kim, J.H., Park, S.H., (2020). Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *J. Dairy Sci.* 103, 4026–4042.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S., (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to *Staphylococcal hemolysins*. *J. Bacteriol* 180, 1988–1994.

Coburn, P.S., Gilmore, M.S., (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cell Microbiol* 5, 661–669.

Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M., (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 1–10.

Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P.E., Cintas, L.M., (2006). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7634–7643.

Dannemiller, K.C., Mendell, M.J., Macher, J.M., Kumagai, K., Bradman, A., Holland, N., Harley, K., Eskenazi, B., Peccia, J., (2014). Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air* 24, 236–247.

De Respini, S., Caminada, A., Pianta, E., Buetti-Dinh, A., Riva Scettrini, P., Petrini, L., Tonolla, M., Petrini, O., (2023). Fungal communities on alpine cheese rinds in Southern Switzerland. *Bot. Stud.* 64, 6.

Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., Le Blay, G., (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 247–251.

Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G., (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J. Dairy Sci.* 97, 6046–6056.

Delgado, J., Álvarez, M., Cebrián, E., Martín, I., Roncero, E., Rodríguez, M., (2023). Biocontrol of pathogen microorganisms in ripened foods of animal origin. *Microorganisms* 11, 1578.

Denis, C., Irlinger, F., (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 311–315.

Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Misiūnas, A., Stočkūnaitė, B., Starkevič, U., Vitkauskienė, A., Hahn-Löbmann, S., Schulz, S., Giritch, A., Gleba, Y., Ražanskienė, A., (2019). Broad and efficient control of *Klebsiella* pathogens by peptidoglycan-degrading and pore-forming bacteriocins klebicins. *Sci Rep* 9, 15422.

Dong, N., Yang, X., Chan, E.W.-C., Zhang, R., Chen, S., (2022). *Klebsiella* species: taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine* 79, 103998.

Dufossé, L., de Echanove, M.C., (2005). The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Res. Int.* 38, 967–973.

Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarne, P., Irlinger, F., (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol* 238, 265–273.

Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarne, P., (2015). Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PLoS ONE* 10, e0124360.

Duru, I.C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., Smolander, O.-P., (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 10–22.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., (2018). FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *bioinformatics* 34, 1287–1294.

Essghaier, B., Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Hajlaoui, M.R., Boudabous, A., Jijakli, H., Sadfi-Zouaoui, N., (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *J Appl Microbiol* 106, 833–846.

Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., Fliss, I., (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control.* 78, 350–356.

Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. e., Glaser, P., Vallaey, T., (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 97, 546–556.

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 1–24.

Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., Jakob, E., (2019). Cheese yeasts. *Yeast* 36, 129–141.

Garmasheva, I.L., Oleschenko, L.T., (2023). Screening of bacteriocin-producing dairy *Enterococcus* strains using low-cost culture media. *Front. Microbiol.* 14, 1168835.

Garnier, L., Valence, F., Mounier, J., (2017a). Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* 5.

Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., Mounier, J., (2017b). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, 191–197.

Giraffa, G., (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88,

Giraffa, G., (2002). *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 163–171.

Giraffa, G., Carminati, D., Neviani, E., (1997). *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *J. Food Prot.* 60, 732–737.

Giuffrida, D., Monnet, C., Laurent, F., Cacciola, F., Oteri, M., Le Piver, M., Caro, Y., Donato, P., Mondello, L., Roueyre, D., Dufossé, L., (2020). Carotenoids from the ripening bacterium *Brevibacterium linens* impart color to the rind of the French cheese, Fourme de Montbrison (PDO). *Nat. Prod. Res.* 34, 10–15.

Giuliano, G., Rosati, C., Bramley, P.M., (2003). To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends Biotechnol.* 21, 513–516.

Gkatzionis, K., Yunita, D., Linforth, R.S.T., Dickinson, M., Dodd, C.E.R., (2014). Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 109–116.

Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., Garde, S., (2016). Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *Int J Food Microbiol* 232, 103–110.

Gori, K., Sørensen, L.M., Petersen, M.A., Jespersen, L., Arneborg, N., (2012). *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *Microbiology open* 1, 161–168.

Grande Burgos, M.J., Pulido, R.P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., Lucas, R., (2014). The cyclic antibacterial peptide Enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22706–22727.

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R., (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front. Microbiol.* 9.

Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I., (2013). Identification and partial characterization of anti-*Listerial* compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 5, 8–17.

Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.-L., (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biol* 116, 692–705.

Huang, C., Zhang, L., Johansen, P.G., Petersen, M.A., Arneborg, N., Jespersen, L., (2021). *Debaryomyces hansenii* strains isolated from Danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. *Front. Microbiol.* 12, 662785.

Inglin, R.C., Stevens, M.J.A., Meile, Lukas, Lacroix, C., Meile, Leo, (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114, 26–29.

Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., Dugat-Bony, E., (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–11.

Irlinger, F., Monnet, C., (2021). Temporal differences in microbial composition of Époisses cheese rinds during ripening and storage. *J. Dairy Sci.* 104, 7500–7508.

Irlinger, F., Mounier, J., (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 142–148.

Janakiev, T., Berić, T., Stević, T., Stanković, S., Bačić, J., Majstorović, H., Fira, D., Dimkić, I., (2022). The microbiome of the ‘Williams’ pear variety grown in the organic orchard and antifungal activity by the autochthonous bacterial and yeast isolates. *Microorganisms* 10, 1282.

Johnson, M.E., (2017). A 100-year review: cheese production and quality. *J. Dairy Sci.* 100, 9952–9965.

Jurado, M., Vicente, C.J., (2020). *Penicillium commune* affects textural properties and water distribution of hard and extra-hard cheeses. *J. Dairy Res.* 87, 117–122.

Kamilari, E., Tsaltas, D., Stanton, C., Ross, R.P., (2022). Metataxonomic mapping of the microbial diversity of Irish and eastern mediterranean cheeses. *Foods* 11, 2483.

Kasimin, M.E., Shamsuddin, S., Molujin, A.M., Sabullah, M.K., Gansau, J.A., Jawan, R., (2022). Enterocin: promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp. *Microorganisms* 10, 684.

Khan, H., Flint, S., Yu, P.-L., (2010). Enterocins in food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 1–10.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O., (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids. Res.* 41, e1.

Korena, K., Krzyzankova, M., Florianova, M., Karasova, D., Babak, V., Strakova, N., Juricova, H., (2023). Microbial succession in the cheese ripening process-competition of the starter cultures and the microbiota of the cheese plant environment. *Microorganisms* 11, 1735.

Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P.S., Fernández Escámez, P.S., Maradona, M.P., Querol, A., Suarez, J.E., Sundh, I., Vlak, J., Barizzzone, F., Hempen, M., Herman, L., (2020). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March (2020). *EFSA J* 18, e06174.



Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549.

Ladjouzi R, Dussert E, Teiar R, Belguesmia Y, Drider D., (2023) A review on enterocin DD14, the leaderless two-peptide bacteriocin with multiple biological functions and unusual transport pathway. *Antibiotics (Basel)*;12(7):1188.

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. & Technol.* 92, 455–468.

Lee, E., Anjum, F., (2023). *Staphylococcus epidermidis*, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D., Labrie, S., (2012). The composition of camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1813–1819.

Li, S., Li, Yandie, Du, Z., Li, B., Liu, Y., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, K., Wang, Q., Lu, S., Dong, J., Ji, H., Li, Yuhui, (2021). Impact of NSLAB on Kazakh cheese flavor. *Food Res. Int.* 144, 110315.

Lucas-Elío, P., Gómez, D., Solano, F., Sanchez-Amat, A., (2006). The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. *J. Bacteriol.* 188, 2493–2501.

Lucas-Elío, P., Hernandez, P., Sanchez-Amat, A., Solano, F., (2005). Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1721, 193–203.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, Dunthorn, M., (2014). Swarm: robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ* 2, e593.

Marcellino O S B, S.N., Benson, D.R., 2013. The good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese. *Microbiol. Spectr.* 1.

Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A.A., Neves, A.R., (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 61, 142–152.

Mažeika, K., Šiliauskas, L., Skridlaitė, G., Matelis, A., Garjonytė, R., Paškevičius, A., Melvydas, V., (2021). Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. *J. Biol. Inorg. Chem.* 26, 299–311.

Medina-Córdova, N., Rosales-Mendoza, S., Hernández-Montiel, L.G., Angulo, C., (2018). The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biol. Control.* 121, 216–222.

Millan, A.F.-S., Gamir, J., Farran, I., Larraya, L., Veramendi, J., (2022). Identification of new antifungal metabolites produced by the yeast *Metschnikowia pulcherrima* involved in the biocontrol of postharvest plant pathogenic fungi. *Postharvest Biol. Technol.* 192, 111995.

Monnet, C., Landaud, S., Bonnarme, P., Swennen, D., (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9.

Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–154.

Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., Bonnarme, P., (2017). Chapter 38 - smear-ripened cheeses, in: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W. (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 955–996.

Nájera, A.I., Nieto, S., Barron, L.J.R., Albisu, M., (2021). A Review of the preservation of hard and semi-hard cheeses: quality and safety. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 9789.

Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Res.* 47, D259–D264.

Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P.A., de Vries, R.P., (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 17–27.

Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki, A., Charmpi, C., Alexandraki, V., Kazou, M., Tsakalidou, E., (2022). Comparison of the microbiome of artisanal homemade and industrial feta cheese through amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Microorganisms* 10, 1073.

Park, S.-Y., Han, N., Kim, S.-Y., Yoo, M.-Y., Paik, H.-D., Lim, S.-D., (2016.) Evaluation of natural food preservatives in domestic and imported cheese. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36, 531–537.

Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C., (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *Int. J. Food Microbiol.* 79, 3–16.

Pawlikowska, E., James, S.A., Breierova, E., Antolak, H., Kregiel, D., (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 112, 1425–1445.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698.

Rajalaxmi, M., Beema Shafreen, R., Iyer, P.M., Sahaya Vino, R., Balamurugan, K., Pandian, S.K., (2016). An in silico, in vitro and in vivo investigation of indole-3-

carboxaldehyde identified from the seawater bacterium *Marinomonas* sp. as an anti-biofilm agent against *Vibrio cholerae* O1. *Biofouling* 32, 1–12.

Ramirez, D., Giron, M., (2023). *Enterobacter* Infections, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Ramírez-Nuñez, J., Romero-Medrano, R., Nevárez-Moorillón, G.V., Gutiérrez-Méndez, N., (2011). Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains. *Braz. J. Microbiol.* 42, 1495–1499.

Raymond-Fleury, A., Lessard, M.-H., Chamberland, J., Pouliot, Y., Dugat-Bony, E., Turgeon, S.L., St-Gelais, D., Labrie, S., (2022). Analysis of microbiota persistence in Quebec's terroir cheese using a metabarcoding approach. *Microorganisms* 10, 1381.

Ritschard, J.S., Amato, L., Kumar, Y., Müller, B., Meile, L., Schuppler, M., (2018). The role of the surface smear microbiome in the development of defective smear on surface-ripened red-smear cheese. *AIMS Microbiol.* 4, 622–641.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., (2016). VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 4, e2584.

Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., Dupont, J., (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 199–210.

Rouhani, A., Javadzadeh, A., Tanhaeian, A., Navabi, S., (2022). A comparison of antibacterial properties of Tachyplesin, Thanatin, and Enterocin P on *Enterococcus faecalis*. *Eur. Endod. J.* 7, 67–72.

Russo, P., Arena, M.P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., Spano, G., (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Food Microbiol. Special Issue: CBL 20th edition: New challenges for research and industry* 247, 48–54.

Salazar, J.K., Carstens, C.K., Ramachandran, P., Shazer, A.G., Narula, S.S., Reed, E., Ottesen, A., Schill, K.M., (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol.* 18.

Savary, O., Coton, E., Maillard, M.-B., Gaucheron, F., Le Meur, C., Frisvad, J., Thierry, A., Jany, J.-L., Coton, M., (2023). Functional diversity of *Bisifusarium domesticum* and the newly described Nectriaceae cheese-associated species. *Food Res. Int.* 112691.

Schmitz-Esser, S., Dzieciol, M., Nischler, E., Schornsteiner, E., Bereuter, O., Mann, E., Wagner, M., (2018). Abundance and potential contribution of Gram-negative cheese rind bacteria from Austrian artisanal hard cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 266, 95–103.

Sękowska, A., (2017). *Raoultella* spp.—clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiol* 62, 221–227.

Shikha, Singh, S., Shankar, S., (2021). Chapter 8 - Microbial metagenomics: potential and challenges, in: Mondal, S., Singh, R.L. (Eds.), *Advances in Animal Genomics*. Academic Press, pp. 109–122.

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M., Ribeiro, S.C., (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Front. Microbiol.* 9.

Simons, A., Alhanout, K., Duval, R.E., (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms* 8, 639.

Sipiczki, M., (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms* 8, E1029.

Sipiczki, M., (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6716–6724.

Sørensen, L., Gori, K., Petersen, M., Jespersen, L., Arneborg, N., (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *Int. Dairy J.* 21, 970–978.

Stellato, G., De Filippis, F., La Stora, A., Ercolini, D., (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 7893–7904.

Stiles, M.E., (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70, 331–345.

Suárez, N., Weckx, S., Minahk, C., Hebert, E.M., Saavedra, L., (2020). Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. *Int J Food Microbiol* 335, 108894.

Tedersoo, L., Bahram, M., Cajthaml, T., Põlme, S., Hiiesalu, I., Anslan, S., Harend, H., Buegger, F., Pritsch, K., Koricheva, J., Abarenkov, K., (2016). Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *ISME J* 10, 346–362.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.

Tidona, F., Francolino, S., Ghiglietti, R., Locci, F., Carminati, D., Laforce, P., Giraffa, G., (2020). Characterization and pre-industrial validation of *Streptococcus thermophilus* strains to be used as starter cultures for Crescenza, an Italian soft cheese. *Food Microbiol.* 92, 103599.

Van den Tempel, T., Jakobsen, M., (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.* 10, 263–270.

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., Benito, S., (2020). The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms* 8, 1038.

White TJ., Bruns T. , Lee S., TaylorJ., (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Pakjas*, vol. 56 577–585.

Wu, Yajing, Pang, X., Wu, Yansha, Liu, X., Zhang, X., (2022). Enterocins: classification, synthesis, antibacterial mechanisms and food applications. *Molecules* 27, 2258.

Yang, C., Zhao, F., Hou, Q., Wang, J., Li, M., Sun, Z., (2020). PacBio sequencing reveals bacterial community diversity in cheeses collected from different regions. *J.Dairy Sci.* 103, 1238–1249.

Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *IJSEM* 67, 1613–1617.

Zadoks, R.N., Griffiths, H.M., Munoz, M.A., Ahlstrom, C., Bennett, G.J., Thomas, E., Schukken, Y.H., (2011). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: be careful where you walk. *J. Dairy Sci.* 94, 1045–1051.

Zha, M., Yu, J., Zhang, Y., Wang, H., Bai, N., Qin, Y., Liangliang, D., Liu, W., Zhang, H., Bilige, M., (2015). Study on *Streptococcus thermophilus* isolated from Qula and associated characteristic of acetaldehyde and diacetyl in their fermented milk. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 61, 50–56.

## 4. Chapitre 4 : Les propriétés biopréservatives de *Metschnikowia pulcherrima* LMA 2038 et de *Trichosporon asahii* LMA 810 dans un fromage frais modèle

### 4.1. Avant-propos

À la suite du criblage des activités antagonistes des souches de fromages, nous avons effectué une sélection parmi les 36 souches inhibitrices. Dans le cadre des objectifs 3 et 4 de notre étude, nous avons choisi deux levures pour approfondir notre compréhension des activités antagonistes et évaluer leur étendue. Le potentiel antagoniste de ces levures a été testé dans des milieux de culture plus complexes, soit un caillé modèle. Parallèlement, nous avons entrepris de premiers tests de caractérisation sur les surnageants de ces levures. Ces résultats nous ont permis d'établir un profil préliminaire des composés antimicrobiens produits. Les détails de ces objectifs sont présentés sous forme d'article. La majorité du travail a été réalisé par le premier auteur de cet article scientifique, Aude Commenges. Dr Françoise Coucheney, Dr Marie-Hélène Lessard, Pr Djamel Drider et Pr Steve Labrie ont co-supervisé le travail tout en participant activement à la rédaction du manuscrit, en plus d'obtenir le financement nécessaire à la réalisation du travail de recherche.

### 4.2. Résumé

La diversité des microorganismes présents dans les fromages contribue à leur typicité et à leurs propriétés organoleptiques. Les souches inhibitrices trouvées dans ces écosystèmes pourraient être utilisées comme agents bioprotecteurs afin de remplacer les produits chimiques, de plus en plus critiqués par les consommateurs. Dans cette étude, nous avons isolé à partir de fromages deux levures nommées *Metschnikowia pulcherrima* LMA 2038 et *Trichosporon asahii* LMA 810, qui sont actives contre des champignons tels que *Yarrowia lipolytica* LMA 800, *Rhodotorula mucilaginosa* LMA 808, *Cladosporium cladosporioides* LMA 31, et *Penicillium commune* LMA 72, ainsi que contre des bactéries telles que *Listeria innocua* ATCC 33090 et *Clostridium tyrobutyricum* LMG 1285. Lorsqu'elles ont été cultivées sur un modèle de fromage frais,

ces levures antagonistes ont significativement réduit le nombre de *Y. lipolytica* LMA 800 et *R. mucilaginosa* LMA 808.

Des données préliminaires nous ont permis d'établir une vue d'ensemble des molécules responsables de ces inhibitions antifongiques et antibactériennes. Les molécules présumées présentes dans le surnageant de culture ont été soumises à divers traitements, notamment la chaleur, des variations de pH et des traitements enzymatiques. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que différents composés antimicrobiens ont été produits par les levures antagonistes mentionnées, et que ces molécules agissent de manière spécifique à la souche cible. En résumé, nos résultats démontrent que les fromages possèdent une offre innombrable de souches microbiennes antagonistes, qui peuvent être exploitées dans le domaine de la biopréservation pour remplacer les produits chimiques et prolonger la durée de conservation des produits alimentaires, y compris le fromage.

#### 4.3. Publication

Biopreservative properties of *Metschnikowia pulcherrima* LMA 2038 and *Trichosporon asahii* LMA 810 in a model fresh cheese, are presented

Aude Commenges<sup>a,b</sup>, Marie-Hélène Lessard<sup>a</sup>, Françoise Coucheney<sup>b</sup>, Steve Labrie<sup>a</sup>  
Djamel Drider<sup>b</sup>,

<sup>a</sup> Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) and Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Québec G1V 0A6, Canada.

<sup>b</sup> UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, Univ. Lille, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

#### Highlights

- *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810, both from cheese origin, inhibit spoilage microorganisms *in vitro*.
- *In-situ* activities in cheese only allowed to observe antifungal activities.
- A significant inhibition of *Y. lipolytica* and *R. mucilaginosa* on the curd model was observed
- The preliminary tests enabled the identification extracellular antifungal molecules
- *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 are promising agents for biopreservation

#### 4.4. Abstract

The diversity of microorganisms present in cheeses contributes to their typicity and organoleptic properties. Inhibitory strains found in these ecosystems could be used as biopreservative agents in order to replace chemicals, which are increasingly decried by consumers. Here, we isolated from cheese two yeasts named, *Metschnikowia pulcherrima* LMA 2038 and *Trichosporon asahii* LMA 810, which are active against fungi, such as *Yarrowia lipolytica* LMA 800, *Rhodotorula mucilaginosa* LMA 808, *Cladosporium cladosporioides* LMA 31, and *Penicillium commune* LMA 72, as well as against bacteria, such as *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Clostridium tyrobutyricum* LMG 1285. When cultivated on model fresh cheese, these antagonistic yeasts significantly reduced the number of *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808. Preliminary data enabled us to establish a snapshot of the molecules responsible for these antifungal and antibacterial inhibitions. The molecules presumed to be present in the culture supernatant were subjected to various treatments, including heat, pH variations and enzymatic treatments. Thus, we hypothesize that different antimicrobial compounds were produced by the aforementioned antagonistic yeasts, and these molecules act in a target strain-specific manner. In summary, our findings demonstrate that cheeses possess an innumerable supply of antagonistic microbial strains, which can be exploited in the field of biopreservation to substitute chemicals and extend the shelf-life of food products, including cheese.

#### 4.5. Introduction

Cheese has been characterized as a complex food matrix that contains yeasts with inhibitory properties (Hatoum et al., 2013; Trejo-González et al., 2022), and playing a role in diverse interactions and metabolic pathways, alongside other microorganisms (Angiolillo et al., 2014; Ceugniet et al., 2017, Al-Qaysi et al., 2017). Biopreservation is an emerging technique that aims to replace chemicals with natural and safe microorganisms and/or their metabolites. According to Sing (2018), these microorganisms typically comprise lactic acid bacteria (LAB) or their metabolites, such as bacteriocins, to manage adverse microorganisms such as spoilage or pathogens (V. P. Singh, 2018). In addition to enhancing the shelf life of food products, this technique



presents a limited number of nutritional and organoleptic drawbacks (Stiles, 1996; Sundh and Melin, 2011), enabling it to conjugate safety standards with consumer demands (V. P. Singh, 2018). The “Clean Label” (CL) is a new approach that has recently emerged and adopted by the food industry in response to the consumer desire for healthier food items. Chemical-free refers to products that have undergone natural or limited processing, and are free of additives (Asioli et al., 2017; Vargas and Simsek, 2021). Microorganisms with inhibitory properties, such as antagonistic yeasts, represent a novel class of natural biopreservative agents that could be employed in the context of biopreservation technique and CL.

The fungal inhibitory properties may be attributed to the activity of cell wall- degrading enzymes, nutrient solubilization, biofilm formation, the release of chelating agents, and the production of killer toxins (Sundh and Melin, 2011; Freimoser et al., 2019). According to Mukherjee et al. (2020), these inhibitory activities are tightly dependent on the medium composition. For cheese production, it is important to use complex media that mimic the final cheese matrix (Rouxel et al., 2020). Milk is a nutrient-rich liquid that comprises lactose, organic and inorganic salts, vitamins, lipids, and caseins, which constitute the predominant proteins, as previously reported (Haug et al., 2007). Fermentation decreases the pH of milk pH, leading to protein coagulation and gel formation (Fox, 2011). Recent studies reported the presence of antifungal compounds in various dairy products, such as milk, sour cream, yogurt, cheese models, and semi-hard cheeses, which are likely produced by dairy-related yeasts (Leyva Salas et al., 2017; Rouxel et al., 2020). Understanding the antifungal metabolites spectrum of activity, their cytotoxicity levels and how they affect cheese microbiota is essential in determining how yeast strains, and/or their antifungal metabolites, can contribute to CL or biopreservation techniques.

Antifungal compounds can be identified in two stages. The first consists to establish a preliminary profile by evaluating the impact of pH, temperature, and various enzymes, including proteases and lipases on their inhibitory activity (Lin and Pan, 2019). The second is based on strong methods, such as DNA sequencing or metabolomics tools, allowing to identify various inhibitory compounds (Afshari et al., 2020 , Zhang et al., 2020; Magangana et al., 2022; Millan et al., 2022). Besides to these molecular methods, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy could be

employed to accurately identify and quantify these metabolites (Rocchetti and O'Callaghan, 2021).

Recently, we isolated two antagonistic yeast strains, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii*, LMA 810 from the cheeses “Carré du Vinage” and “Rose Blanche”; two traditional varieties made and sold respectively in the north of France and Québec (Canada). Besides, their safety aspects, such as absence of hemolytic activity and sensitivity to commonly used antifungal drugs, we established their inhibitory properties in curd cheese models against *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808, *C. cladosporioides* LMA 31, *P. commune* LMA 72, *L. innocua* ATCC 33090 and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285. Moreover, we performed a preliminary characterization of extracellular and antifungal compounds produced by *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810.

## 4.6. Materials and methods

### 4.6.1. Microorganisms and growth conditions

*M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 belong to the Food Mycology Laboratory collection (Laval University at Québec, Canada). These strains were cultivated at 30°C for 24 h on Yeast Extract Glucose (YEG; Yeast Extract 5.0 g/L (Bio Basic, Ontario, Canada); Glucose 20.0 g/L (EMD Chemicals, Ontario, Canada); Agar 15.0 g/L (BD Diagnostics, Québec, Canada). Antimicrobial assays were done against various microbial strains. The fungi targets are spoilage microorganisms from the cheeses “Carré du Vinage” and “Rose Blanche” (Garnier et al., 2017; Leyva Salas et al., 2017; Correa et al., 2019; Jurado and Vicente, 2020). Next, target yeasts used were *C. parapsilosis* LMA 804, *R. mucilaginosa* LMA 808, and *Y. lipolytica* LMA 800, and target molds were *C. cladosporioides* LMA 31, *C. herbarum* LMA 929, *Mucor racemosus* LMA 722, and *P. commune* LMA 72. They were grown in YEG broth at 25°C for 48 h, with stirring (160 rpm) for yeasts, and 10 days without stirring for molds. The bacteria used as targets are pathogenic strains commonly found in the agri-food industry (Ganz et al., 2020; Dos Santos Rosario et al., 2021). However, two of them namely *L. innocua* ATCC 33090, unlike *L. monocytogenes*, is a non-pathogenic strain,

and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, which causes gas bubbles in cheeses, and none of them is preferred in cheese (Podrzaj et al., 2020).

Pathogenic and spoilage bacteria, *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *Escherichia coli* ATCC 8739, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, and *S. aureus* ATCC 13709, were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), at 37°C for 24 h with agitation (160 rpm). By using a hemacytometer (Malassez, Preciss, Paris, France), and the Countess™ II Automated Cell Counter (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), it was possible to determine bacterial and fungal bacterial counts.

#### 4.6.2. Screening inhibitory activities

The antifungal and antibacterial activities were performed using the overlay method (Hatoum, Labrie, Fliss, 2013); and Russo et al. (2017). After inoculating a contaminant strain into soft agar at  $10^6$  cells/mL, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 were spotted on a 96-pin microplate replicator (Boekel Scientific, Feasterville, PA, USA). Both *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 were spot-inoculated and incubated at 25°C (antifungal tests) or 30°C (antibacterial tests) for 24-72 h (Fernandez et al., 2017). Natamycin (antifungal) and chloramphenicol (antibiotic) were used as positive controls at concentrations of 2.5 mg/L and 10 mg/L, respectively. Experiments were performed in triplicate. To evaluate antimicrobial activity, each contaminant concentration was adjusted to  $10^6$  cells/mL (bacteria) or spores/mL (fungi) in 0.75% soft agar, poured over 1.5% BHI agar for bacteria or YEG for fungi.

#### 4.6.3. Preparation of a soft cheese model

The dry cheese powder was prepared as described (Lessard et al., 2012). To replicate the composition of Camembert-type cheese under controlled conditions, a model fresh cheese was produced through the rehydrating of cheese powder. Initial processing did not include the addition of salt or ripening culture. When the cheese powder was dried and

resuspended in a sterile solution of 2% (w/v) NaCl, the resulting hydrated curds had a moisture content of 57% and a salt-in-moisture (S/M) ratio of 3.5%.

*M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 were inoculated separately at  $10^6$  CFU/g on the model fresh cheese. The target strains, viz *R. mucilaginosa* LMA 808, *Y. lipolytica* LMA 800, *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, and *L. innocua* ATCC 33090 were added to the curd at  $10^4$  CFU/g. For the mold contamination, 10  $\mu$ L of a spore solution at  $10^6$  spores/g was prepared from *C. cladosporioides* LMA 31 and *P. commune* LMA 72 and incorporated onto the curd model. Each microorganism was individually inoculated into a curd model to control its growth. Subsequently, 10 g aliquots of hydrated and inoculated curds were distributed into six-well plates and incubated for seven days in a ripening chamber maintained at a temperature of 14°C and a relative humidity of 90%. Experiments were done in triplicate.

#### 4.6.4. Fungi counting and enumeration of bacteria

After seven days of incubation, the number of target and antagonistic yeasts, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 were determined under different growth conditions in curd. Next, 5 g of curd samples were taken, weighed, and serially diluted 10-fold in a saline solution (w/v) (0.9%, NaCl), then homogenized for 90 seconds at 250 rpm using a Stomacher 400 stomacher instrument (Seward, Bohemia NY, USA). Dilutions ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  were realized, and 100  $\mu$ L of each dilution were spread on BHI agar medium supplemented with natamycin 0.1 g/L to enumerate *L. innocua* ATCC 33090 and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, grown aerobically and anaerobically, respectively. The same dilutions were spread on YEG medium to enumerate, *R. mucilaginosa* LMA 808 and *Y. lipolytica* LMA 800. After 48 h of incubation, yeast colonies grown on YEG plates were examined macroscopically and microscopically. The morphology of the target yeasts was expected to be different from the two antagonistic yeasts.

The antifungal activity was determined by measuring the mold diameters formed on the curd models, either in the presence or absence of *M. pulcherrima* LMA 2038 or *T. asahii* LMA 810. Experiments were performed in triplicate.

#### 4.6.5. Evidence on inhibitory properties of antimicrobial compounds

The growth of *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 was monitored in YEG broth for 24 h at 30°C with agitation (160 rpm). After this period of incubation, the cultures were centrifuged (8,000 g, 4°C, 20 min), and the CS was recovered and concentrated 10-fold with a centrifugal evaporation system (MiVac Centrifugal Vacuum Concentrator, Gene Vac, Ipswich, UK).

Antimicrobial activity was assessed using the agar well-diffusion method (Lin and Pan 2019). The target microorganisms were grown at 37°C for 24 h in BHI (bacteria), 25°C in YEG (fungi) or 30°C in YEG (yeasts). Then, target microorganisms were inoculated at a concentration of  $5 \cdot 10^5$  CFU/mL in YEG soft agar (0.75%), and transferred into wells of 5 mm diameter using a sterile 5 mL micropipette tip. Each well was filled with 60 µL of the concentrated CS (10 X) from *M. pulcherrima* LMA 2038 or *T. asahii* LMA 810. After that, plates were left at 4°C for 1 h to allow antimicrobial compounds to diffuse into the agar before being incubated at 30°C for 48 h. The antimicrobial activity was determined by measuring the diameters of the halos formed around the wells. Experiments were performed in triplicate.

#### 4.6.6. Impacts of heat treatment, pH modification and enzymatic treatment on antimicrobial activities of *M. pulcherrima* LMA-2038 and *T. asahii* LMA-810

Different treatments were performed on the CS prepared from *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 to determine their impacts on antifungal and antibacterial activities. Each CS was exposed for 15 min at 45, 65, and 85°C. Similarly, each CS pH was modified by adding 1 M HCl or 1 M NaOH to adjust pH values between 4.0 and 8.0. Next, each CS was also enzymatically treated by addition of proteinase K (1 mg/mL), trypsin (5 mg/mL), pepsin (5 mg/mL), or lipase (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Following these treatments, the antimicrobial activities were determined using the agar well diffusion method, (Batdorj et al., 2006).

#### 4.6.7. Hemolysis and resistance to antifungals

The hemolytic activity of *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 was measured by streaking fresh colonies on blood agar plates (Tryptic Soy Agar with 5% sheep blood, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). The plates were incubated at 37°C and 39°C, respectively, for 24 to 48 h, and the development of a clear zone surrounding the colonies was considered a positive result. The sensitivity to classical antifungals such as amphotericin B (Polyene), 5-fluorocytosin (Pyrimidin), fluconazol, voriconazol, posaconazol (Azoles), caspofungin, and anidulafungin (Echinocandines) (bioMérieux) was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) according to the Clinical Laboratory Standards Institute reference protocol M27-A3 S4 for yeasts. The interpretation of MIC value was performed using the breakpoints assigned to *Candida albicans*, and aligned with the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<https://www.eucast.org/astoffungi/clinicalbreakpointsforantifungals>).

#### 4.6.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Student's t-tests. Differences with p values less than 0.05 were considered statistically significant. All graphs and statistical studies were performed using Graph pad Prism version 6.0 (GraphPad Software Inc.).

### 4.7. Results

#### 4.7.1. The different antimicrobial activities of *M. pulcherrima* LMA 2038, screening and curd model tests

*M. pulcherrima* LMA 2038 was tested against 10 spoilage or pathogenic bacteria, among which were: *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648 and *S. aureus* ATCC 13709. The strains were also tested against seven spoilage fungi: *C. parapsilosis* LMA 804,

*R. mucilaginosa* LMA 808, *Y. lipolytica* LMA 800, *C. cladosporioides* LMA 31, *C. herbarum* LMA 929, *M. racemosus* LMA 722, and *P. commune* LMA 72 (Table 4). Next, *M. pulcherrima* LMA 2038 showed antibacterial activity against *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 105459 and *S. aureus* ATCC 13709, and antifungal activity against *C. parapsilosis*, LMA 804 *R. mucilaginosa* LMA 808, *Y. lipolytica* LMA 800, *C. cladosporioides* LMA 31, *C. herbarum* LMA 929, and *P. commune* LMA 72 (Table 4). Furthermore, assays performed on model fresh cheeses enabled the growth of pathogenic and spoilage strains. Incorporation of *M. pulcherrima* LMA 2038 has significantly reduced the growth of *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808 in the curd cheese model by about 1.11 log CFU/mL and 1.55 log CFU/mL, respectively ( $p < 0.05$ , Student's t-test) (Fig. 6). Nonetheless, no significant growth differences were observed for *Cl. cladosporioides* LMA 31 or *P. commune* LMA 72 (data not shown). Similar results were obtained for *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285 and *L. innocua* ATCC 33090, for which no significant reduction in growth has been registered.

#### 4.7.2. Effects of pH, heat, and enzymes on antifungal activity of *M. pulcherrima* LMA 2038

The CS from *M. pulcherrima* LMA 2038 was found to be active against *Y. lipolytica* LMA 800, *R. mucilaginosa* LMA 808, *Cl. cladosporioides* LMA 31, and *P. commune* LMA 72, but not against *L. innocua* ATCC 33090 (Table 5). The impact of pH, heat, and enzymatic treatments was examined. Thus, the activity exerted by *M. pulcherrima* LMA 2038 against *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808 remained stable at pH 5, 6, and 7, but decreased at pH 4 and pH 8, particularly for *R. mucilaginosa* LMA 808 (Table 5). However, the pH change did not affect its activity against *C. cladosporioides* LMA 31 or *P. commune* LMA 72 (Table 5). It should be noted that there was no antibacterial activity detected against *L. innocua* ATCC 33090 or *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285 following the pH changes (Table 5). Incubation of the CS of *M. pulcherrima* LMA 2038 at 65°C or 85°C for 15 min abolished its inhibitory activities against *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808, delineating a thermosensitive nature of the putative extracellular antifungal compounds produced by *M. pulcherrima* LMA 2038. When *C. cladosporioides* LMA 31 and *P. commune* LMA 72 were used as target strains, however, the effects of heat treatment appeared less pronounced. In the case of molds, the

inhibition was completely disappeared following treatment of the CS at 85°C (Table 5). It should be noted that there are no inhibitory activities against *L. innocua* ATCC 33090 and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, upon any heat treatment (Table 5). The antimicrobial compounds produced by *M. pulcherrima* LMA 2038 were sensitive to lipase and pepsin, but not to K-proteinase and trypsin (Table 5). However, enzymatic treatment did not have any effect on *L. innocua* ATCC 33090 or *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285 (Table 5).

#### 4.7.3. The different antimicrobial activities of *T. asahii* LMA 810, screening and curd model tests

*T. asahii* LMA 810 was tested against the same target as *M. pucherimma*, pathogen and spoilage agents of cheese, on agar medium, with spot tests. The antimicrobial activity of *T. asahii* LMA 810 was observed against *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica* LMA 800, and *P. commune* LMA 72 (Table 4). The addition of *T. asahii* LMA 810 to a curd model inhibited growth of both *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808 (Table 6). The reductions were 1.17 log CFU/mL and 1.52 log CFU/mL, respectively with a p value < 0.05, as determined by the student's t-test) (Fig. 7). However, other adverse strains, namely *L. innocua* ATCC 33090 and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, were not affected by this antagonistic yeast when grown pairwise on a model fresh cheese.

#### 4.7.4. Antifungal activity of *T. asahii* LMA 810 and the preliminary characteristics of its antifungal compounds

The CS from *T. asahii* LMA 810 inhibited the growth of *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808 (Table 6). However, no inhibitory action was detected for *C. cladosporioides* LMA 31 and *P. commune* LMA 72, nor against *L. innocua* ATCC 33090 and *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285 (Table 6). Therefore, changing the pH, temperature, or enzymatic treatment did not affect the molds or bacterial strains (Table 6). Nonetheless, an approximate reduction in growth of 52% and 31% was observed for *R. mucilaginosa* LMA 808 subsequent to enzymatic treatment of *T. asahii* LMA 810 CS with K-protease and pepsin, respectively, as depicted in Table 6.



#### 4.7.5. Safety of the antagonistic yeasts, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810

The hemolytic capacity of the two non-*Saccharomyces* yeast strains, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810, was evaluated. None of them displayed any discernible hemolytic activity, thus indicating that they were deemed non-hemolytic microorganisms (data not shown). *T. asahii* LMA 810 was resistant to all the drugs tested, except the itraconazole, and *M. pulcherrima* LMA 2038 was resistant to micafungin and anidulafungin. The resistance cut-off values utilized were those designed for pathogenic *C. albicans* (Table 7).

#### 4.8. Discussion

To avoid infectious disease outbreaks and food spoilage, various strategies could be employed, including biopreservation, which requires the use of safe and antagonistic microorganisms, particularly LAB and/or their metabolites. Other microorganisms, like antagonistic yeasts, may also be useful for similar applications. Here, we show that *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 are good natural food biopreservatives. The *M. pulcherrima* LMA 2038 strain was observed to inhibit the following bacteria: *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 105459 and *S. aureus* ATCC 13709, as well as the following fungi: *C. parapsilosis* LMA 804, *R. mucilaginosa* LMA 808, *Y. lipolytica* LMA 800, *C. cladosporioides* LMA 31, *C. herbarum* LMA 929, and *P. commune* LMA 72. Furthermore, we demonstrated that *T. asahii* LMA 810 was only active against *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285, *R. mucilaginosa* LMA 808, *Y. lipolytica* LMA 800 and *P. commune* LMA 72 (Table 4). Both yeast strains were able to inhibit *Y. lipolytica* (previously known as *Candida lipolytica*) on a fresh cheese model, as shown in Figure 1. *Y. lipolytica* is a non-pathogenic species that can become a spoilage agent for meat and dairy products (Garnier et al., 2017). This species produces multiple extracellular enzymes, such as lipases and proteases, which can help it modify its environment and facilitate its growth (Garnier et al., 2017). Both of them inhibited *R. mucilaginosa* LMA 808 (Table 6), but not *L. innocua* ATCC 33090 or *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285. The safety of two-strains and their effectiveness were determined using a food-matrix model, which allowed us to suggest them as biopreservatives. These strains did not exhibit

hemolytic activity and their antifungal resistance is not critical, since these drugs are instead used to treat *C. albicans* infections. Extracellular antifungal compounds are responsible for the inhibition of spoilage microorganisms, according to Lin and Pan (2019). The antimicrobial compounds produced by each antagonistic yeast were not active against *L. innocua* ATCC 33090 or *Cl. tyrobutyricum* LMG 1285. Thus, the compounds produced by *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 were particularly sensitive exceeding 85°C. Similarly, the pH variation of the CS impacted the target yeasts in a strain-dependent manner. As indicated in Table 4, inhibition of *R. mucilaginosa* LMA 808 has significantly decreased, at pH 4 and pH 8. The addition of pepsin had an impact on the activities of *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 (Table 4). The effects of temperature and enzymatic treatments on CS, led us to think that different antifungal compounds could be synthesized by *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810. Additional experiments are needed to complete their characterization.

*M. pulcherrima* LMA 2038 was isolated from a French cheese, named “Carré du Vinage”, but this species has also been isolated from other sources, including the phyllosphere of fruits, flowers and leaves (Vicente et al., 2020). It is suggested that the presence of this species in the cheese microbiota infrequent, however, this may be attributed to genetic variability in the ITS regions and D1/D2 domains, which may be influenced by fluctuations in DNA sequences. (Kregiel et al., 2023). Upon this, *M. pulcherrima* LMA 2038 produced extracellular antifungal compounds that proved effective against spoilage and pathogenic yeasts, as suggested by Sipiczki (2006); Janakiev et al. (2022); Millan et al. (2022), which revealed the inhibition of *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., and *Fusarium* spp. by antifungal compounds produced by *M. pulcherrima* strains. This particular species was introduced into winemaking in order to combat *B. cinerea* (Sipiczki, 2020). Noteworthy, that *M. pulcherrima* species was shown to produce extracellular antimicrobial compounds (Türkel and Ener, 2009; Millan et al., 2022; Kregiel et al., 2023), including a red-brown pigment called pulcherrimin (Mažeika et al., 2021), and killer toxins (Büyüksırtı-Bedir and Kuleaşan, 2022). Pulcherrimin is a non-enzymatically complex molecule derived from pulcherriminic acid, a dibasic acid secreted by *M. pulcherrima* (Mažeika et al., 2021). This acid acts as an iron chelator, transforming into pulcherrimin upon trapping iron, which then initiates nutrient competition for iron (Sipiczki, 2020). Pathogens can thrive in environments where iron

is not readily available, especially in cheese, as iron sequestration prevent them from growing (Monnet et al., 2012). Low iron availability in milk, along with the presence of lactoferrin, a well-documented antimicrobial glycoprotein diminish iron levels (Gruden and Poklar Ulrih, 2021). Subsequently, the surface oxidation of iron to  $Fe^{3+}$  results in insolubility. Furthermore, the solid matrix of cheese inhibits the diffusion of iron and ferric compounds (Monnet et al., 2012). The presence of the red-brown pigment could pose a challenge when considering the use of this strain as a biopreservative agent in cheese production. Indeed, there is a possibility that alterations in the cheeses coloration could occur if the inhibitory mechanism, which is attributed to the presence of pulcherrimin (Mažeika et al., 2021).

*M. pulcherrima* also produces volatile compounds, such as 3-amino-5-methylhexanoic acid, biphenyl-2,3-diol, and sinapaldehyde, which have been shown to be active *in vivo* (Millan et al., 2022). *T. asahii* LMA 810 strains used here was isolated from cheese, and this species was yet reported in cheese prepared from milks of cow, sheep, goat, or camel, and it was also reported in the microbiota of the raw milk (Lavoie et al., 2012; Rezki et al., 2013; Ceugniez et al., 2015; Paserakung et al., 2015; Marín et al., 2015; Ceugniez et al., 2017; Garnier et al., 2017; Moubasher et al., 2018; Ider et al., 2019; Jingkai et al., 2020). Notably, most of studies have focused on the pathogenicity aspects of *T. asahii* and its increasing resistance to key antifungals used in trichosporonosis treatment. Next, this yeast is responsible for most acute or invasive trichosporonosis, and often is associated to fatal infections, with a mortality rate of about 64% (H. Li et al., 2020). Even *T. asahii* is closely related to fungal infections, it was also reported as a promising biotechnological agent (Chagas-Neto et al., 2008). Indeed, different studies underpinned its ability to inhibit the growth of human pathogens, such as *Pseudozyma aphidis* and *Aureobasidium pullulans* (Chen and Chou., 2017), and that of microorganisms responsible of dairy product spoilage, such as *Kocuria rhizophila* (Ider et al., 2020). The inhibition of *K. rhizophila* CIP 53.45 by *T. asahii* was attributed to a 4,607 Da extracellular peptide, designed as oranicin (Ider et al., 2019). Further, *T. asahii* JYC1040 was reported to produce inhibitory compounds endowed with activity against human opportunistic and pathogenic yeasts, such as *Pseudozyma aphidis* JYC1050 and *Aureobasidium pullulans* JYC1003 (Chen and Chou., 2017). Even these antimicrobials have not fully been characterized, they were shown to display similarities with *S. cerevisiae* killer toxins, K1, K2, and K28 (Chen and Chou, 2017).

The application of *T. asahii* LMA 810 as a biopreservative agent would present inherent difficulties because of its bivalent status, which encompasses its inhibitory properties and pathogenicity. In the food industry, there are three ways to use microorganisms and antimicrobial peptides (AMPs) to preserve foods. These techniques involve the utilization of microorganisms that produce AMPs during food processing, the direct application of purified or raw inhibitory compounds to the food product, and the utilization of a previously fermented product derived from an AMPs-producing strain (And and Hoover, 2003; Hatoum et al., 2012; Banjara et al., 2016). The use of *T. asahii* LMA 810 as a biopreservative agent will require purification and identification of its inhibitory substance(s).

#### 4.9. Conclusion

*M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 are non-*Saccharomyces* yeast isolated from cheese. By employing a curd model, we have demonstrated their inhibitory capabilities against spoilage yeasts, including *Y. lipolytica* LMA 800 and *R. mucilaginosa* LMA 808, thus paving the way for their potential utilization as biopreservative agents in cheese production and storage. This inhibition was attributed to extracellular compounds; whose complete identification is our next goal.

#### **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

#### **Acknowledgements**

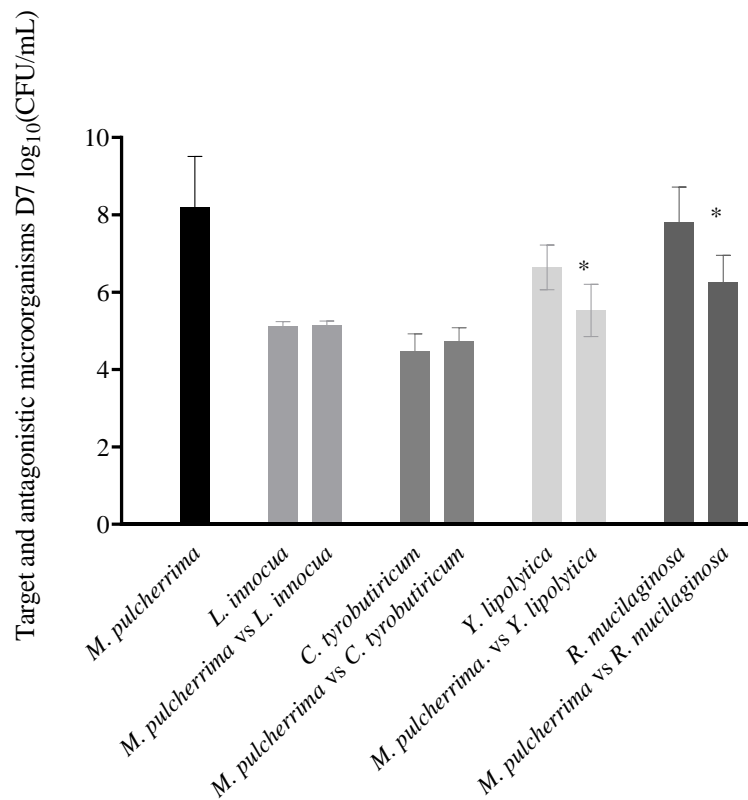
Aude Commenges received a scholar fellowship from Lille university (France) and Laval university (Québec, Canada). The authors acknowledge the Hauts-de-France region, through BiHauts de France CPER FEDER 2022-2027. This work was also funded by the NSERC Discovery grant program (S. Labrie, RGPIN-2023-04878). The authors are also indebted to Célia Costa Gomes da Silva for critical reading of the manuscript.

**Table 4** Antimicrobial activities of cheese yeast strains, *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810

Cheese yeasts	Target microorganisms	
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> LMA 2038	<i>Trichosporon asahii</i> LMA 810
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> LMG 1285	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	-
<i>Listeria monocytogenes</i> CIP 105459 and CIP 82.110t	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar kentucky CIP 105623	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar newport ATCC 6962	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium ATCC 53648	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13709	+	-
<i>Yarrowia lipolytica</i> LMA 800	+	+
<i>Candida parapsilosis</i> LMA 804	+	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> LMA 808	+	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i> LMA 31	+	-
<i>Penicillium commune</i> LMA 72	+	+
<i>Mucor racemosus</i> LMA 722	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i> LMA 929	+	-

- : no inhibition

+ : inhibition activity



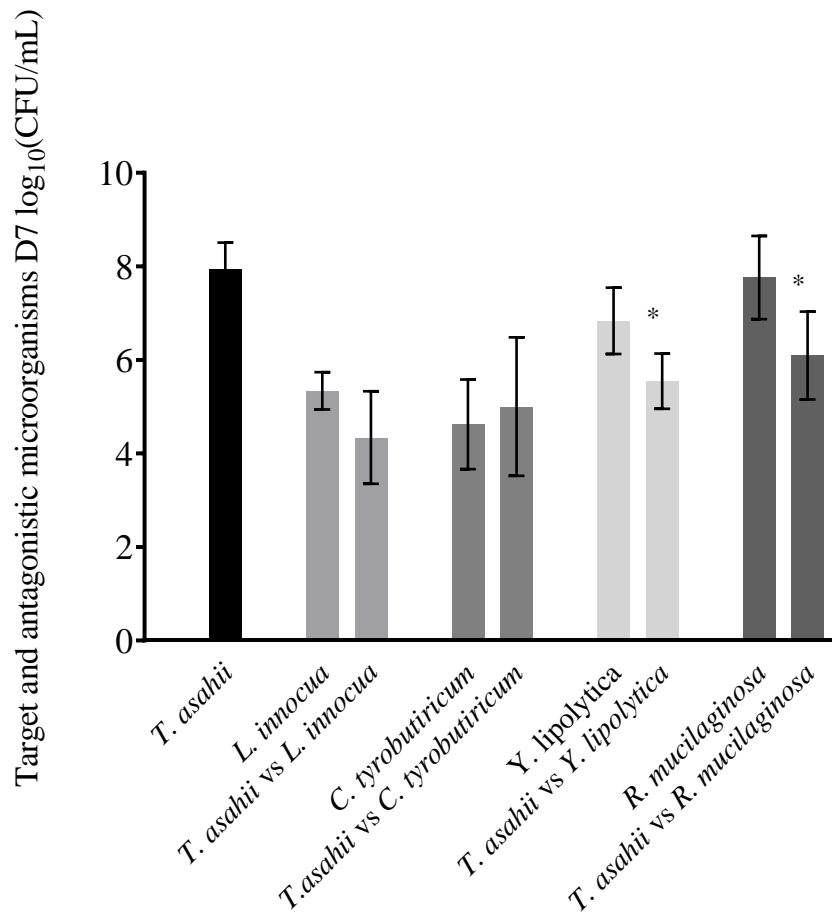
**Figure 6.** Growth of target strains on the curd cheese model. Counts were performed after 7 days in the presence and absence of *M. pulcherrima* LMA 2038

1 **Table 5** Effects of pH, heat, and enzymes on the antimicrobial compounds produced by  
 2 *Mestchnikowia pulcherrima* LMA2038

3

Target microorganisms			<i>Yarrowia lipolytica</i> LMA 800	<i>Rhodotomucilaginosa</i> LMA 808	<i>Cladosporium cladosporioides</i> LMA 31	<i>Penicillium commune</i> LMA 72	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> LMG 1285
Treatments								
Mean inhibition diameter <i>Metschnikowia pulcherrima</i> LMA 2038	pH	4	+++	++	++++	+++	-	-
		5	++++	++++	++++	+++	-	-
		6	++++	++++	+++	+++	-	-
		7	++++	++++	+++	+++	-	-
		8	++++	++	+++	+++	-	-
	Temperature (°C)	45	++++	++++	++++	+++	-	-
		65	-	-	+++	+	-	-
		85	-	-	-	-	-	-
	Enzymatic digestion	Proteinase K 1 mg/mL	+++	++++	++++	++++	-	-
		Pepsin 5 mg/mL	++	++	++++	++++	-	-
		Trypsin 5 mg/mL	+++	++++	++++	++++	-	-
		Lipase 5 mg/mL	+++	++	++++	++++	-	-
	No treatment		++++	++++	++++	++++	-	-
Mean ø inhibition (%)			0 - 20%	21 - 40%	41 - 60%	61 - 80%	81 - 100%	
Symbols			-	+	++	+++	++++	

4



5

6

7 **Figure 7.** Growth of cheese contaminants after 7 days in the presence or absence of  
 8 *T. asahii* LMA 810



**Table 6** Characteristics of the antimicrobial compounds of *Trichosporon asahii* LMA 810

Target microorganisms		<i>Y. lipolytica</i> LMA 800	<i>R. mucilaginosa</i> LMA 808	<i>C. cladosporioides</i> LMA 31	<i>P. commune</i> LMA 72	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	<i>C. butyricum</i> LMG 1285	
Treatments								
Mean inhibition diameter <i>T. asahii</i> LMA 810	pH	4	++++	++++	-	-	-	-
		5	++++	++++	-	-	-	-
		6	++++	++++	-	-	-	-
		7	+++	++++	-	-	-	-
		8	-	++	-	-	-	-
	Temperature (°C)	45	++++	++++	-	-	-	-
		65	+	-	-	-	-	-
		85	-	-	-	-	-	-
	Enzymatic digestion	Proteinase K 1 mg/mL	++++	++	-	-	-	-
		Pepsin 5 mg/mL	++++	+++	-	-	-	-
		Trypsin 5 mg/mL	++++	++++	-	-	-	-
		Lipase 5 mg/mL	++++	++++	-	-	-	-
	No treatment		++++	++++	-	-	-	-
Means of inhibition (%)		0 - 20%	21 - 40%	41 - 60%	61 - 80%	81 - 100%		
Symbols		-	+	++	+++	++++		

**Table 7** Susceptibility of non-Saccharomyces *M. pulcherrima* LMA 2038 and *T. asahii* LMA 810 to clinical antifungal drugs

Antifungals	Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) (mg/L)			
	<i>M. pulcherrima</i> LMA 2038		<i>T. asahii</i> LMA 810	
5-Flucytosin	< 0.06		4	
Amphotericin B	0.5	S	1	I
Anidulafungin	0.12	R	> 8	R
Caspofungin	0.25		> 8	
Fuconazole	0.5	S	4	I
Itraconazole	0.06	I	0.025	S
Micafungin	0.6	R	> 8	R
Posaconazole	0.03	S	0.25	R
Voriconazole	<0.008	S	0.12	R

Clinical breakpoints for fungi v.10.0 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). MIC values in bold indicate resistance to antifungals compared to *Candida albicans*. No breakpoints are available against 5-flucytosin.

#### 4.10. References

Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020). Cheesomics: The future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 33–47. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>

Al-Qaysi, S. A. S., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A.-R., & Ibrahim, J. A. A.-R. (2017). Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2605382. <https://doi.org/10.1155/2017/2605382>

And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82–100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>

Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A. V., & Nobile, M. A. D. (2014). Biopreservation of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5345–5355. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8022>

Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>

Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 222, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>

Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.-M., & Haertlé, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837–848. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02966.x>

Büyüksırt-Bedir, T., & Kuleşan, H. (2022). Purification and characterization of a *Metschnikowia pulcherrima* killer toxin with antagonistic activity against pathogenic microorganisms. *Archives of Microbiology*, 204(6), 337. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02940-8>

Ceugniez, A., Coucheney, F., Jacques, P., Daube, G., Delcenserie, V., & Drider, D. (2017). Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d’Orchies. *Research in Microbiology*, 168(6), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.004>

Ceugniez, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, 52, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>

Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., & Colombo, A. L. (2008). Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*, 166(3), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9136-x>

Chen, P.-H., & Chou, J.-Y. (2017). Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1). <https://doi.org/10.5604/17331331.1234997>

Correa, F. T., de Souza, A. C., de Souza Júnior, E. A., Isidoro, S. R., Piccoli, R. H., Dias, D. R., & de Abreu, L. R. (2019). Effect of Brazilian green propolis on microorganism contaminants of surface of Gorgonzola-type cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 1978–1987. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03664-2>

Dos Santos Rosario, A. I. L., da Silva Mutz, Y., Castro, V. S., da Silva, M. C. A., Conte-Junior, C. A., & da Costa, M. P. (2021). Everybody loves cheese: Crosslink between persistence and virulence of Shiga-toxin *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(11), 1877–1899. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767033>

Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., & Fliss, I. (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, 78, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.007>

Fox, P. F. (2011). Introduction | History of dairy products and processes. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition) (pp. 12–17). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00541-0>

Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>

Ganz, K., Yamamoto, E., Hardie, K., Hum, C., Hussein, H., Locas, A., & Steele, M. (2020). Microbial safety of cheese in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 321, 108521. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108521>

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>

Gruden, Š., & Poklar Ulrih, N. (2021). Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11264. <https://doi.org/10.3390/ijms222011264>

Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, 3, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>

Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2013). Identification and partial characterization of anti-*Listerial* compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 5(1), 8–17. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9109-8>

Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>

Ider, S., Belguesmia, Y., Cazals, G., Boukherroub, R., Coucheney, F., Kihal, M., Enjalbal, C., & Drider, D. (2020). The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*. *Food Bioscience*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100670>

Ider, S., Belguesmia, Y., Coucheney, F., Kihal, M., & Drider, D. (2019). Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria. *Archives of Microbiology*, 201(3), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01626-y>

Janakiev, T., Berić, T., Stević, T., Stanković, S., Bačić, J., Majstorović, H., Fira, D., & Dimkić, I. (2022). The microbiome of the 'Williams' pear variety grown in the organic orchard and antifungal activity by the autochthonous bacterial and yeast isolates. *Microorganisms*, 10(7), 1282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071282>

Jingkai, J., Jianming, Z., Zhenmin, L., & Huaxi, Y. (2020). Dynamic changes of microbiota and texture properties during the ripening of traditionally prepared cheese of China. *Archives of Microbiology*, 202(8), 2059–2069. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01921-z>

Jurado, M., & Vicente, C. J. (2020). *Penicillium commune* affects textural properties and water distribution of hard and extra-hard cheeses. *The Journal of Dairy Research*, 87(1), 117–122. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000906>

Kregiel, D., Czarnecka-Chrebelska, K. H., Schusterová, H., Vadkertiová, R., & Nowak, A. (2023). The *Metschnikowia pulcherrima* clade as a model for assessing inhibition of *Candida* spp. and the toxicity of its metabolite, pulcherrimin. *Molecules* (Basel, Switzerland), 28(13), 5064. <https://doi.org/10.3390/molecules28135064>

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>

Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.06645-11>

Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation-a review. *Microorganisms*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>

Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A. M., Ferraro, T. N., Yang, R., & Chen, Y. (2020). Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past

23 years. *Epidemiology and Infection*, 148, e169.  
<https://doi.org/10.1017/S0950268820001624>

Lin, T.-H., & Pan, T.-M. (2019). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(3), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.003>

Magangana, T. P., Makunga, N. P., Fawole, O. A., Stander, M. A., & Opara, U. L. (2022). Antioxidant, antimicrobial, and metabolomic characterization of blanched pomegranate peel extracts: effect of cultivar. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(9), 2979. <https://doi.org/10.3390/molecules27092979>

Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, 68(4), 565–572. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12208>

Mažeika, K., Šiliauskas, L., Skridlaitė, G., Matelis, A., Garjonytė, R., Paškevičius, A., & Melvydas, V. (2021). Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 26(2–3), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01853-z>

Millan, A. F.-S., Gamir, J., Farran, I., Larraya, L., & Veramendi, J. (2022). Identification of new antifungal metabolites produced by the yeast *Metschnikowia pulcherrima* involved in the biocontrol of postharvest plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology*, 192, 111995. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111995>

Monnet, C., Back, A., & Irlinger, F. (2012). Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/AEM.00085-12>

Moubasher, A.-A. H., Abdel-Sater, M. A., & Soliman, Z. S. M. (2018). Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003>

Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., & Hesham, A. E.-L. (2020). Yeast a potential bio-agent: Future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>

Paserakung, A., Pattarajinda, V., Vichitphan, K., & Froetschel, M. a. (2015). Selection and identification of oleaginous yeast isolated from soil, animal feed and ruminal fluid for use as feed supplement in dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 61(4), 325–332. <https://doi.org/10.1111/lam.12475>

Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K. J. (2020). Strain-dependent cheese spoilage potential of *Clostridium tyrobutyricum*. *Microorganisms*, 8(11), 1836. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111836>

Rezki, M. A., Benbadis, L., DeBillerbeck, G., Benbayer, Z., Franccedil, J. M., & ois. (2013). Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some

Algerian agricultural and dairy products. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(6), 75–83. <https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0117>

Rocchetti, G., & O’Callaghan, T. F. (2021). Application of metabolomics to assess milk quality and traceability. *Current Opinion in Food Science*, 40, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.04.005>

Rouxel, M., Barthe, M., Marchand, P., Juin, C., Mondamert, L., Berges, T., Blanc, P., Verdon, J., Berjeaud, J.-M., & Aucher, W. (2020). Characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacilli* in cheese-mimicking matrix: Comparison between active and inactive strains. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108798. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108798>

Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104–111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>

Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>

Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 8(7), E1029. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071029>

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2–4), 331–345. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>

Sundh, I., & Melin, P. (2011). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9528-z>

Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A.-E., Rodríguez-Hernández, A.-I., Del Rocio López-Cuellar, M., & Chavarría-Hernández, N. (2022). Bacteriocins produced by LAB isolated from cheeses within the period 2009-2021: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(2), 238–251. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09825-0>

Türkel, S., & Ener, B. (2009). Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 64(5–6), 405–410. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-5-618>

Vargas, M. C. A., & Simsek, S. (2021). Clean Label in bread. *Foods*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods10092054>

Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, 8(7), 1038. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071038>

Zhang, F., Zhao, M., Braun, D. R., Ericksen, S. S., Piotrowski, J. S., Nelson, J., Peng, J., Ananiev, G. E., Chanana, S., Barns, K., Fossen, J., Sanchez, H., Chevrette, M. G., Guzei, I. A., Zhao, C., Guo, L., Tang, W., Currie, C. R., Rajska, S. R., Bugni, T. S.

(2020). A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. *Science* (New York, N.Y.), 370(6519), 974–978. <https://doi.org/10.1126/science.abd6919>



## 5. Chapitre 5 : *Trichosporon asahii* : Taxonomie, risques pour la santé, et applications biotechnologiques

### 5.1. Avant-propos

Les travaux menés dans les chapitres 3 et 4 ont mis en lumière le potentiel de la levure *Trichosporon asahii* en tant que levure bioprotectrice. Toutefois, il convient de noter que cette levure présente une ambivalence, car elle est considérée à la fois comme un agent pathogène opportuniste et possède de nombreuses applications biotechnologiques. Cette revue de littérature a pour objectif de présenter de manière exhaustive l'espèce *T. asahii*, en mettant en évidence à la fois son potentiel et ses limites. La majorité du travail de revue bibliographique a été réalisé par le premier auteur de cet article scientifique, Aude Commenges. Dr Françoise Coucheney, Dr Marie-Hélène Lessard, Pr Djamel Drider et Pr Steve Labrie ont co-supervisé le travail tout en participant activement à la rédaction du manuscrit, en plus d'obtenir le financement nécessaire à la réalisation du travail de recherche.

### 5.2. Résumé

Le genre *Trichosporon* comprend des levures naturellement présentes dans le tractus gastro-intestinal humain, sur la peau et dans le microbiote vaginal. Ce genre est un pathogène opportuniste, que l'on retrouve fréquemment dans les infections fongiques affectant les personnes immunodéprimées. L'espèce *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) est à l'origine de la majorité des trichosporonoses et fait donc l'objet de nombreuses études, notamment en ce qui concerne sa pathogénicité et sa résistance émergente aux médicaments antifongiques utilisés pour traiter la maladie. Cependant, *T. asahii* a également d'importantes applications biotechnologiques, en particulier ses capacités de dépollution et sa bioproduction de composés aromatiques (par exemple, terpènes, C13-Norisoprenoids, composés en C6, hexanoate de méthyle et isovalérate d'éthyle) et de molécules antioxydantes. *T. asahii* produit également des substances qui inhibent certains contaminants présents dans les produits laitiers, tels que *Kocuria rhizophila*, *Clostridium tyrobutyricum* et *Salmonella enterica*. Paradoxalement, cette espèce de levure a également des applications probiotiques potentielles. Cette revue a pour but de discuter

et de fournir des mises à jour sur la taxonomie, la pathogénicité et la pertinence biotechnologique de *T. asahii*. Cette levure a été isolée et identifiée dans les fromages de cette thèse.

### 5.3. Publication

*Trichosporon asahii*: taxonomy, health hazards, and biotechnological applications

Aude Commenges<sup>a,b</sup>, Françoise Coucheney<sup>b</sup>, Marie-Hélène Lessard<sup>a</sup>, Djamel Drider<sup>b</sup>, Steve Labrie<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF) and Dairy Science and Technology Research Centre (STELA), Université Laval, FSAA, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Québec G1V 0A6, Canada.

<sup>b</sup> UMR Transfrontalière BioEcoAgro 1158 INRAE, Univ. Lille, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

#### Highlights

- The taxonomy and origin of *Trichosporon*.
- *Trichosporon asahii* is the main cause of trichosporonosis.
- *Trichosporon asahii* produces aromatic compounds.
- *Trichosporon asahii* as a potential bioremediation tool is explored.
- *Trichosporon asahii* produces antagonist compounds against food contaminants and pathogens.

### 5.4. Abstract

The genus *Trichosporon* includes yeasts that are naturally present within the human gastrointestinal tract, on the skin, and as part of the vaginal microbiota. This genus is an opportunistic pathogen, commonly found in fungal infections affecting immunocompromised individuals. The species *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) causes the

majority of trichosporonosis and is therefore widely studied, particularly in relation to its pathogenicity and its emerging resistance to antifungal drugs used to treat the disease. However, *T. asahii* also has important biotechnological applications, particularly its depolluting abilities and its bioproduction of flavor compounds (e.g., terpenes, C13-Norisoprenoids, C6 compounds, methyl hexanoate, and ethyl isovalerate) and antioxidant molecules. *Trichosporon asahii* also produces substances that inhibit certain contaminants found in dairy products, such as *Kocuria rhizophila*, *Clostridium tyrobutyricum*, and *Salmonella enterica*. Paradoxically, this yeast species also has some potential probiotic applications. This review aims to discuss and provide updates on the taxonomy, pathogenicity, and biotechnological relevance of *T. asahii*.

## 5.5. Introduction

*Trichosporon* sp. (*Trichosporonales*, *Tremellomycetes*, *Basidiomycota*) are yeast-like basidiomycetes commonly found in different ecosystems, including soil, air, rivers, cheese, and decaying wood, as well as within bird droppings and livestock microbiota (Colombo et al., 2011; Delavenne et al., 2011; Mehta et al., 2021b). In humans, this genus is occasionally found within the gastrointestinal tract, on the skin, in the oral microbiota, and, under specific conditions, in the respiratory tract (Mehta et al., 2021b). The *Trichosporon* genus contains opportunistic pathogens that cause trichosporonosis—acute, invasive, and often fatal infections (with an approximate mortality rate of 64%) that spread easily to multiple internal organs. *Trichosporon asahii* is the major species responsible for trichosporonosis (H. Li et al., 2020), which mostly affects immunocompromised individuals (de Almeida Júnior et al., 2016). Although *T. asahii* is closely associated with fungal infections, it has also been reported as a biotechnological tool, particularly in relation to its depolluting abilities, its bioproduction of flavor compounds, and its bioproduction of antioxidant molecules (Zhang et al., 2016). *Trichosporon asahii* also has the ability to inhibit the human pathogens, *Pseudozyma aphidis* and *Aureobasidium pullulans* (Chen and Chou., 2017), and a known contaminant of dairy products, *Kocuria rhizophila* (Ider et al., 2020).

This review summarizes current knowledge on the fungal genus *Trichosporon*, focusing on the species *T. asahii*, particularly highlighting its pathogenicity, resistance to

antifungal drugs, and its potential applications as an emerging biotechnological agent for bioproduction, biotransformation, and bioremediation.

## 5.6. Morphotype and Identification of the Genus *Trichosporon*

### 5.6.1. The Origins and Taxonomy of *Trichosporon* spp.

The genus *Trichosporon* was first described in 1865 by Beigel as “the white Piedra”—a benign hair infection that leads to the formation of whitish nodules, 1-3 mm in size, that adhere to hair shafts on the scalp or other sites with body hair (Guého, de Hoog, et al., 1992). It was then attributed to an infection caused by *Pleurococcus beigelii*. In 1890, Behrend found the infectious agent responsible for the white piedra to be *Trichosporon ovoides*, which was named using a combination of the Greek words *Trichos* (hair) and *sporon* (spore) (Guého et al., 1992b; Chagas-Neto et al., 2008; Singh et al., 2019).

The classification and taxa organization of the genus *Trichosporon* has been based on morphological, physiological, and ecological characteristics (Chagas-Neto et al., 2008). Up until 1992, the *Trichosporon* genus only included two species: *T. beigelii* and *T. cutaneum* (Guého, Smith, et al., 1992). However, it was gradually updated following biochemical and molecular data, which enabled a more accurate differentiation between some species that had previously been grouped in the same taxon; this revealed greater diversity within this genus (Guého et al., 1992b; Middelhoven et al., 2004). In 1992, comparison of the ecological niches and nutritional profiles of *T. beigelii* isolates enabled ten distinct species of *Trichosporon* to be distinguished (Guého, Smith, et al., 1992).

Advances in DNA sequence analysis have further refined the taxonomy of *Trichosporon* sp. based on the sequences of the InterGenic Spacer 1 (IGS1) and the D1/D2 region of the large ribosomal (26S) subunit of DNA. These techniques have enabled the identification of new *Trichosporon* species isolated from different ecological niches (e.g., insect and mammalian guts, food, soil) (Chagas-Neto et al., 2008). There are currently, 15 known (*Taxonomy Browser*, n.d.) *Trichosporon* species (*T. aquatile*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. beigelii*, *T. caseorum*, *T. coremiiforme*, *T. dohaense*, *T. faecale*,

*T. infestans*, *T. inkin*, *T. insectorum*, *T. japonicum*, *T. lactis*, *T. multisporum*, *T. ovoides*) (NCBI:txid5552, 2023).

### 5.6.2. Morphotype and Identification of the Genus, *Trichosporon*

*Trichosporon* sp. form blastoconidia, hyphae, pseudohyphae, and arthroconidia. They are asexual and produce individual spores that disarticulate from the hyphae (Chagas-Neto et al., 2008). The presence of multilamellar cell walls and dolipores, either with or without septal pore caps (called parentheses), is another important trait of *Trichosporon* spp. (Guého, de Hoog, et al., 1992). The presence of additional morphological structures, such as an appressorium or macroconidia, can also be useful to differentiate between some species.

The identification of the *Trichosporon* genus was based on the morphological observation of arthroconidia and the presence of the alkaline fermentation of urea. All *Trichosporon* species are capable of hydrolyzing urea (Chagas-Neto et al., 2008). On Sabouraud dextrose solid media, *Trichosporon* genus colonies are characterized by their creamy or white color, their generally cerebriform and radial appearance, and the fact that they can become dry and membranous (J. W. Lee et al., 1990). Since morphological and biochemical features alone do not enable *Trichosporon* isolates to be identified at the species level, molecular techniques must be used, such as the sequencing of IGS1, the D1/D2 region, and the Internal Transcribed Spacer (ITS) (Sugita et al., 2004); or flow cytometry assays (Colombo et al., 2011). Currently, research is primarily focused on clinical cases, and most available assembled genomes come from human skin lesions (Table 8).

## 5.7. *Trichosporon asahii*: An Opportunistic Pathogen

### 5.7.1. The Pathogenicity of *Trichosporon asahii*

The genus *Trichosporon* is an opportunistic pathogen responsible for both invasive and non-invasive diseases. Currently, *Trichosporon* is considered to be the second most common agent that causes fungal infections in immunocompromised and

immunosuppressed patients, and patients with blood diseases (Chagas-Neto et al., 2008; Colombo et al., 2011; Mehta et al., 2021a). The incidence of trichosporonosis caused by *T. asahii* has significantly increased over the past 20 years (Chagas-Neto et al., 2009). These increases have mostly been in leukemia patients that have undergone bone marrow or solid organ transplants, burn patients, and premature infants (Li et al., 2020; Ramírez et al., 2020).

The clinical manifestations of *T. asahii* infections vary depending on the organs affected. Common symptoms and characteristics include fever, brain abscess, liver abscess, endophthalmitis, fungemia, and respiratory or urinary tract infections (Mehta et al., 2021a), as well as infections of less frequent sites (e.g., eye infections, peritonitis, meningoencephalitis, esophagitis) (Sugita et al., 2004; Li et al., 2020; Raju et al., 2020; Ramírez et al., 2020). Invasive infections due to *T. asahii* can be divided into disseminated and localized forms. In disseminated trichosporonosis, which is the most common form observed, patients usually present with acute symptoms that rapidly progress to multi-organ failure. This disease is often identified from blood cultures, urine, cerebrospinal fluid, sputum, and tissue (H. Li et al., 2020).

#### 5.7.2. Available Treatments for Trichosporonosis

Several antifungal treatments are available for trichosporonosis, including amphotericin B and various azole compounds (e.g., fluconazole, itraconazole, voriconazole) (H. Li et al., 2020). Voriconazole, which has an inhibition concentration of  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  is more efficient than amphotericin B, which has an inhibition concentration of 0.06  $\mu\text{g/mL}$  (Mehta et al., 2021b), and is therefore considered the drug of choice for neutropenic patients with disseminated *T. asahii* infections (Toriumi et al., 2002). Combined therapy using amphotericin B with either 5-flucytosine (Padovan et al., 2019), echinocandin, or triazoles may lead to a synergistic antifungal effect (Tsai et al., 2012; Padovan et al., 2019), contrary to what was observed when used with voriconazole (Li et al., 2020). Treatment guidelines for invasive trichosporonosis remain to be clarified (Li et al., 2020).

### 5.7.3. The Emergence of Resistance to Antifungal Molecules

Therapeutic options to control *T. asahii* infections remain limited and resistance to azole compounds, especially fluconazole and voriconazole, may have a considerably negative impact on mortality rates in patients with invasive trichosporonosis (Falk et al., 2003; Colombo et al., 2011; Iturrieta-González et al., 2014; Padovan et al., 2019). The mechanisms associated with resistance are being studied worldwide, with research focusing on biofilm formation, genetic mutations, signaling pathway modifications, and hyperactivity of efflux pumps (Wang et al., 2015; de Almeida Júnior et al., 2016; Li et al., 2017; Mehta et al., 2021b).

The ability to form biofilm is a major factor in virulence and resistance (Falk et al., 2003). The findings in *Trichosporon* spp. have been comparable to those in *Candida* spp. (Mukherjee et al., 2004), suggesting a potentially reduced response to antifungal treatments, particularly to voriconazole (Iturrieta-González et al., 2014). One hypothesis for the biofilm resistance phenomenon is that the extracellular polymeric substance (EPS) produced acts as a barrier to the diffusion of antifungals and/or as an ion exchange to bind charged antifungal molecules (Di Bonaventura et al., 2006). While the tolerance of *Trichosporon* biofilms to antifungals has been extensively documented (Falk et al., 2003; Di Bonaventura et al., 2006; González-Pombo et al., 2011; Iturrieta-González et al., 2014; Cordeiro et al., 2021), the specific mechanisms responsible for this resistance remain unexplored.

Genetic mutations can also be responsible for drug resistance in *Trichosporon* (de Almeida et al., 2022). For example, four super mutated genes related to the Target Of Rapamycin (TOR) signaling pathway were identified after prolonged exposure to fluconazole (Fig. 8), which enabled antifungal resistance (Li et al., 2017). The mutations seemed to disrupt the integration of exogenous factors during homeostasis regulation, the main role of the TOR pathway (Li et al., 2017; Lushchak et al., 2017); however, the specific mechanism of resistance induced by these mutations has yet to be elucidated (Padovan et al., 2019). Some fluconazole-resistant *T. asahii* isolates exhibit hyperactivity of efflux pumps (Padovan et al., 2019), similar to strains of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*, obtained following prolonged exposure to antifungal compounds. In this case, the *mdr1* and *cdr1* genes, which encode membrane transporters, were overexpressed

and this contributed to the antifungal characteristics (A. Singh et al., 2012). The mechanisms related to this hyperactivity of efflux pumps, however, have not yet been resolved (X. Ma et al., 2023).

In addition, *T. asahii* possesses the antioxidant enzymes, superoxide dismutase and catalase, which protect microorganisms from the damage caused by reactive oxygen species (ROS). These antioxidant enzymes appear to be involved in the development of resistance to fluconazole; it has therefore previously been hypothesized that the mechanisms of infection, drug resistance, and ROS responses were somehow linked (Y. Zhang et al., 2016). Overall, there are multiple mechanisms of resistance to antifungal drugs and many remain to be fully understood.

## 5.8. *Trichosporon asahii* as a Potential Biotechnological Agent

Most published studies have focused on *T. asahii* pathogenicity and its emerging resistance to the major antifungal drugs used for trichosporonosis treatment. However, *T. asahii* also has potential beneficial roles in the bioproduction of aromatic compounds and as a bioremediation agent.

### 5.8.1. *Trichosporon asahii* and the Production of Aromatic Compounds

In the agri-food industry, the production and use of flavor compounds is a major growing market with a turnover of approximately two billion euros in the European Union (Sigurdson et al., 2017). The production of flavors is usually performed using plant materials or by chemical synthesis, but some microorganisms are able to synthesize precursors of odorant substances naturally (Rakowska et al., 2017). *Trichosporon asahii* participates in the production of many aromatics compounds, such as vanillin. It could also be used to improve the aromas of Cabernet-Sauvignon wines or Harbin dry sausages (fermented meat from China) (Ashengroph et al., 2017; Wen et al., 2021).

Vanillin is a chemical compound used in cosmetics as a perfume and in foods as a vanilla flavor enhancer, but it is also used as a preservative for its antioxidant and antimicrobial properties (Banerjee et al., 2019). Vanillin is typically produced either from expensive



green vanilla beans or by chemical synthesis, which is costly and not environmentally friendly. In contrast, the bioproduction of vanillin from isoeugenol by *T. asahii* presents a cleaner and less expensive approach. In fact, soil isolates grown on an isoeugenol-enriched medium produce vanillin (Ashengroph et al., 2017); however, the mechanisms involved in this bioconversion have not been elucidated.

*Trichosporon asahii* has also been associated with the typical aromatic profiles of Cabernet-Sauvignon (Y. Wang et al., 2013), that develop during grape fermentation (Delfini et al., 2001). In wine production, each grape variety produces distinctive aromatic compounds following enzymatic or chemical hydrolysis of odorless, non-volatile glycoconjugates from the fruit (Loscos et al., 2010; Pérez-Martín et al., 2012). As heat hydrolysis can negatively impact wine flavoring, the hydrolysis of non-volatile glycosides present in musts and wines relies on enzymatic hydrolysis using glycosidic enzymes, particularly  $\beta$ -D-glucosidase (Delfini et al., 2001). This enzyme is involved in the production of terpenes, which adds a fruit-like characteristic to the wine. These enzymes are commercially available and their incorporation into wines, including Riesling, Gewurztraminer, Muscat, and other grape varieties, contribute to the taste and characteristics of the wine (Maicas et al., 2016). In young wines, supplementation with *T. asahii* F6 producing to  $\alpha$ - $\beta$ -D-glucosidase enhanced their aroma profile (terpenes, C13-Norisoprenoids, and C6 compounds) (Fig. 9) compared to wines produced using commercial enzymes (Y. Wang, Kang, et al., 2011). Therefore, winemakers consider the use of  $\beta$ -D-glucosidases derived from yeasts as a key controlled enzymatic strategy to produce wines with specific aromatic profiles (González-Pombo et al., 2011), and a potentially better alternative to commercial enzymes (Wang et al., 2012; 2011b).

Another example is found in the typical Chinese food, Harbin dry sausage. The presence of *T. asahii* was recently associated with the production of methyl hexanoate and ethyl isovalerate, which lead to fruity pineapple and sweet apple smells, respectively (Wen et al., 2021). Nevertheless, future research endeavors should investigate the distinct role of *T. asahii* in generating volatile compounds through the utilization of multi-omic methodologies. *Trichosporon asahii* could therefore present a promising agent to develop flavors in food products.

### 5.8.2. *Trichosporon* as a Bioremediation Agent

The bioremediation process uses microorganisms to degrade pollutants found in soil or water (Azubuikwe et al., 2016). This environmentally-friendly approach has been studied intensively worldwide. *Trichosporon asahii* may have depolluting potential due to its ability to assimilate and degrade phenylalkanes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and caffeine (Dutta et al., 2001; Morikawa, 2006; Awe et al., 2009). The petrochemical industry produces many organic pollutants, such as phenylalkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), as well as benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene, also known as BTEX compounds. Phenylalkanes are used as solvents and components in detergents, varnishes, and cable oils. They are extremely hydrophobic and able to bind to sediments, which causes them to be found in food through bioaccumulation (Dutta et al., 2001). Through the process of ortho-oxidation, *T. asahii* metabolizes the aromatic rings of phenylalkanes, using them as carbon sources, into hydroxylated coumarins (5-hydroxycoumarin, 4,6-dihydroxycoumarin, 4,8-dihydroxycoumarin) and alkyl-substituted aromatic acids (phenylheptanoic acid, 2-hydroxyphenylheptanoic acid, 2-hydroxyphenylpropanoic acid). Hydroxylated coumarins are of particular interest to the pharmaceutical industry (for their anti-inflammatory, anticoagulant, antifungal, and antitumor applications), the food industry, and the perfume industry (Al-Warhi et al., 2020; Feng et al., 2020).

Other organic by-products of the petroleum industry (e.g., halogenated compounds, PAH, and BTEX compounds) are major soil contaminants that have been significantly implicated in the development of cancers and other health issues (Abdel-Shafy et al., 2016; Geraldino et al., 2021). *Trichosporon asahii* B1 has already been shown to have the ability to biotransform and biodegrade PAH (Awe et al., 2009), and, more recently, to degrade another petrochemical industry derivative: the BTEX compound sec-hexylbenzene and its metabolites. With its ability to form biofilm, this opportunistic pathogenic strain could be a good candidate for the development of new bioremediation techniques (Nhi-Cong et al., 2016).

Caffeine is a substance naturally present in coffee, tea, and coca leaves, among other sources. After ingesting caffeine-containing food, the caffeine is expected to be released into the body and excreted, subsequently ending up in wastewater, which can then diffuse

into nature (Berger et al., 2017). However, caffeine is seldom metabolized in nature and its accumulation could have a damaging effect on fauna and flora (Ogunseitan, 2002). For example, high concentrations of caffeine can be detrimental to zebrafish embryos (*Danio rerio*; >300 mg/L) (Ogunseitan, 2002), and can also reduce soil fertility and limit seed germination and plant growth (Batish et al., 2008). Chemical treatments using solvents or supercritical carbon dioxide extraction methods are available to remove caffeine from the environment but, because of their high financial and environmental costs, microorganisms are being studied extensively as an alternative; this includes studies on *T. asahii* and its ability to form biofilm (Morikawa, 2006; Lakshmi et al., 2012). For the bioremediation of xenobiotic compounds, biofilms are increasingly being used in biotechnological processes. This is because some microorganisms in the environment only exist in the form of biofilm, which gives them a high tolerance to physical, chemical, and biological constraints (Morikawa, 2006). Previously, *T. asahii* immobilized on alginate beads to promote biofilm production demonstrated better caffeine degradation abilities than non-immobilized cells. This ability to grow under a biofilm may sustainably contribute to the bio-decaffeination of wastewater (Morikawa, 2006).

### 5.8.3. Limitation of Utilization of Opportunistic Pathogenic Yeasts in Industrial Settings

The yeast *Trichosporon* presents a dual nature, offering technological advantages while concurrently being recognized as an opportunistic pathogen capable of causing infections in immunocompromised individuals (Colombo et al., 2011). This pathogenic potential hinders its viability in food applications, resulting in the absence of Generally Recognized As Safe (GRAS) status and exclusion from the Qualified Presumption of Safety (QPS) list. Similarly, in line with the evaluation of other opportunistic pathogenic microorganisms, such as *Enterococcus* (Graham et al., 2020), a case-by-case assessment of promising *Trichosporon* strains for food use is relevant. Ideally, strains intended for incorporation into foods should exhibit the absence of virulence determinants and sensitivity to clinically relevant antifungals (Sundh & Melin, 2011b).

Within the European Union (EU), the manipulation of opportunistic pathogenic yeasts is governed by stringent regulations aimed at safeguarding human health and the environment (Sundh and Melin, 2011). Companies must conduct comprehensive risk

assessments to identify potential hazards associated with the use of these microorganisms. Specific regulations vary based on the microorganism type and industrial sector. For instance, the Biocidal Products Directive (98/8/EC) may apply if opportunistic pathogenic yeasts are incorporated into biocidal products (fao.org). Additionally, the Directive 2000/54/EC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work is pertinent to the professional handling of these yeasts. The Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (REACH) regulation (EC) No 1907/2006 may also be influential based on the nature of the substances used (fao.org). Ensuring compliance with biosafety standards is essential to minimize the risks of pathogen dissemination, and companies may need specific authorizations or notifications for certain substances to competent authorities. Effective risk communication to workers and the public is another critical aspect of these regulations.

Therefore, companies must consult national competent authorities and appropriate European agencies to ensure strict compliance with prevailing regulations. Conducting a comprehensive risk-benefit analysis, verifying the safety of considered strains, and adhering to guidelines, legislation, and regulatory aspects concerning the development of functional foods will contribute to fostering the acceptance of *Trichosporon* as a valuable candidate for beneficial applications in food biotechnology, garnering support from industry, healthcare professionals, and consumers alike.

## 5.9. *Trichosporon asahii* in the Dairy Industry

### 5.9.1. The Use of Oleaginous Yeasts as Food Supplements for Dairy Cattle

Dairy farmers can add fats and oils (e.g., palm oil) to their herds' diet to improve energy content and quality (Weiss et al., 2009). Adding oleaginous yeasts as a feed supplement, such as *T. asahii*, is expected to improve fiber digestion, ruminal fermentation, and improve rumen acid-base control (Hespell, 1987) while providing additional vitamins, lipids, and proteins (Paserakung et al., 2015). Collectively, these additions could improve the milk productivity of the dairy cattle (Ferraretto et al., 2012; Mao et al., 2013).

One interesting source of carbon for lipid synthesis by oleaginous yeasts is molasses, a by-product of the sugar industry with a high content of fermentable sugar (approximately 45%) (Huang et al., 2016). When a strain of *T. asahii* GSY10 isolated from soil was compared with multiple other yeasts isolated from animal feed and ruminal fluids for their ability to produce lipids from molasses, the strain was most efficient. This delineates further potential industrial applications, including as a feed supplement for dairy cattle and as an effective method of recycling molasses (Paserakung et al., 2015).

#### 5.9.2. The Occurrence of *Trichosporon asahii* in Dairy Products, and its Impacts on the Sensory Characteristics of Cheese

Improving our knowledge of the fungal populations in raw milk is crucial for a better comprehension of the role played by yeasts and molds in the production of milk-derived products, such as cheese. *Trichosporon asahii* is regularly found in cheese produced using cow, sheep, goat, or camel milk, and in the microbiota of the raw milk itself (Suzzi et al., 2003; Delavenne et al., 2011; Lavoie et al., 2012; Rezki et al., 2013; Ceugniez et al., 2015; Paserakung et al., 2015; Marín et al., 2015; Rai et al., 2016; Ceugniez et al., 2017; Garnier et al., 2017; Moubasher et al., 2018; Ider et al., 2019; Jingkai et al., 2020).

Because of its ability to produce flavor compounds, especially through proteolysis and lipolysis, *T. asahii* could be a key player during the cheese ripening process (Vorbeck et al., 1963; Suzzi et al., 2003; Awe et al., 2009; Wang et al., 2012; Paserakung et al., 2015; Wen et al., 2021). In many ripened cheeses made from cow milk, such as Monteca and Le Trappiste, the presence of *T. asahii* was associated with high protein and peptide hydrolysis during ripening, which generated desirable flavors (Vorbeck et al., 1963). Recently, the same association was observed in a traditional Chinese cheese, where *T. asahii* influenced the cheese typicity and sensory characteristics (Jingkai et al., 2020). Even when the mechanisms of aroma production are not clear, both proteolytic and lipolytic activities could be involved, as has been described in other fermented products (Wang et al., 2012; Wen et al., 2021).

The proteolytic activities of *T. asahii* enable peptides with antioxidant properties to accumulate. During the ripening of a Nepalese cheese made from yak milk, *chhurpi*,

*T. asahii* YMB6 was not only found in large quantities but was also found to be responsible for the increased production of an antioxidant capable of trapping the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH). DPPH is the major free radical used to study free radical scavenging activities (Rai et al., 2016). Antioxidant activities can limit the development of the rancid flavor in cheese produced by lipid oxidation, one of the primary causes of cheese alteration (I. T. Khan et al., 2019).

### 5.9.3. The Inhibitory Properties of the Yeast *Trichosporon* in the Dairy Industry

In natural and complex ecosystems, microorganisms communicate and interact through different pathways. Microbial interactions include passive competition (e.g., spatial competition) or active competition, which produces inhibitory substances, mostly antimicrobial peptides (AMPs) (Jenssen et al., 2006; Stubbendieck & Straight, 2016). AMPs can be active against bacteria, yeasts, and viruses, but also parasites (Jenssen et al., 2006; Lo et al., 2020). The extracellular antimicrobial peptide, oranicin p16, is 4,607 Da with two putative sequence tags of PPFPK and CTHV(L/I)(K/Q) or TCHV(L/I)(K/Q) and is generated by *T. asahii* ICVY021 (Ider et al., 2019). When tested against a large number of bacteria and fungi isolates, this yeast (isolated from Algerian camel milk) specifically inhibited *Kocuria rhizophila*, a contaminant of camel milk and an opportunistic pathogen (Whon et al., 2018; Ider et al., 2019). Further studies showed it may also have antagonistic activities against other dairy contaminants, such as *Clostridium tyrobutyricum* or *Salmonella enterica* (Ider et al., 2020a). The peptide, oranicin P16, displays similar characteristics to typical bacteriocins from Gram-positive and Gram-negative bacteria and seems to target the cell division mechanisms of *K. rhizophila* (Cavera et al., 2015; Ider et al., 2020)). This peptide continues to be studied as it may provide an alternative to existing strategies to inhibit *K. rhizophila* in dairy products.

*Trichosporon asahii* is also able to secrete antagonistic compounds against *Pseudozyma aphidis* and *Aureobasidium pullulans*—opportunistic human yeasts pathogens (Chen and Chou., 2017). Even when the inhibitory substance was not identified, the authors revealed that the secretion of these compounds and their sensitivities to temperature, salinity, and media pH are similar to the killer toxins, K1, K2, and K28, produced by *S. cerevisiae*

(Schmitt et al., 2002; Chen and Chou, 2017). The isolated antagonists can also be applied in food industries to reduce contamination by undesirable yeasts or fungi.

## 5.10. Conclusions and perspectives

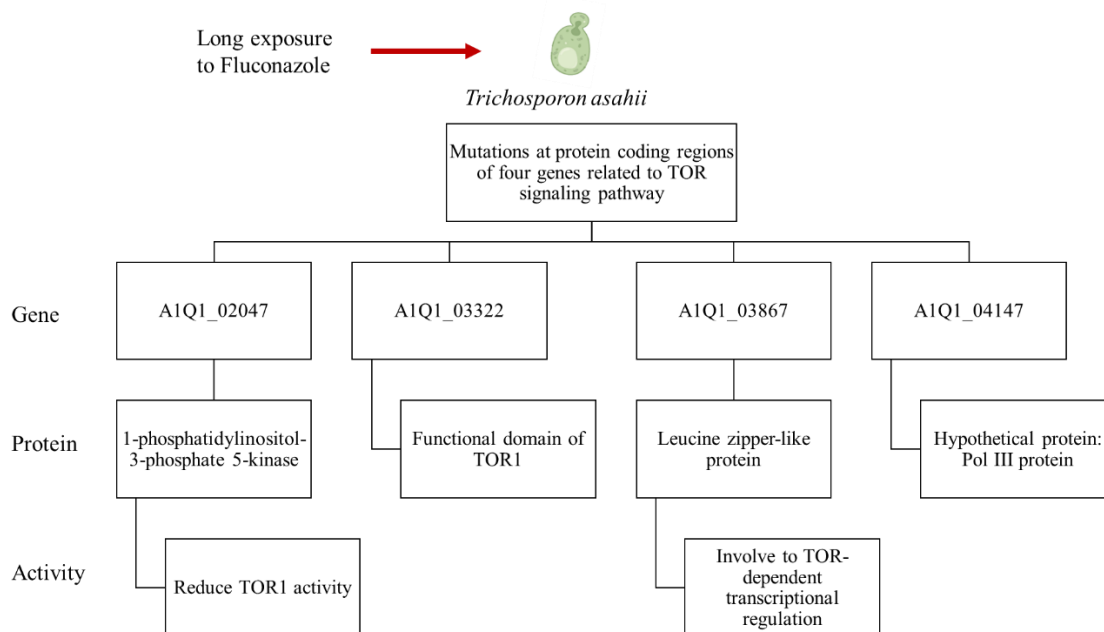
*Trichosporon asahii* is a yeast largely known for its detrimental effects in immunocompromised patients and its increasing resistance to treatments. However, its proteolytic, lipolytic, antioxidant, and antimicrobial abilities can be of use during bioprocessing, bioproduction, and bioremediation processes, which offer vast possibilities for its exploitation in different economic sectors.

In the dairy industry, *T. asahii* is frequently found in the milk of most milk-producing animals and dairy products and could be a good candidate for biopreservation. Further investigations of its activities against other spoilage microorganisms, pathogens, and viruses could therefore be beneficial. Indeed, another species of *Trichosporon*, *T. scarabaeorum*, has been shown to have virucidal properties in tomato plants (Chiu et al., 2018, 2021). However, the safety of the strains to be used for these applications must still be investigated. However, the safety of the strains to be used for these applications must still be investigated, in fact it prohibits direct inoculation as a bio-preservation agent. For this yeast, the antagonistic compound must be isolated, purified, and added directly. An alternative would be the use of a fermentation product from this strain in which the microorganisms will be deactivated before food use.

This review exposes *T. asahii* as a complex species with genuine potential to produce value-adding and ecologically-interesting metabolites. Many of the mechanisms of interest (i.e., bioremediation, aroma production, and antagonist activity) in this yeast are still poorly understood, and therefore, further research efforts on this specie must continue.

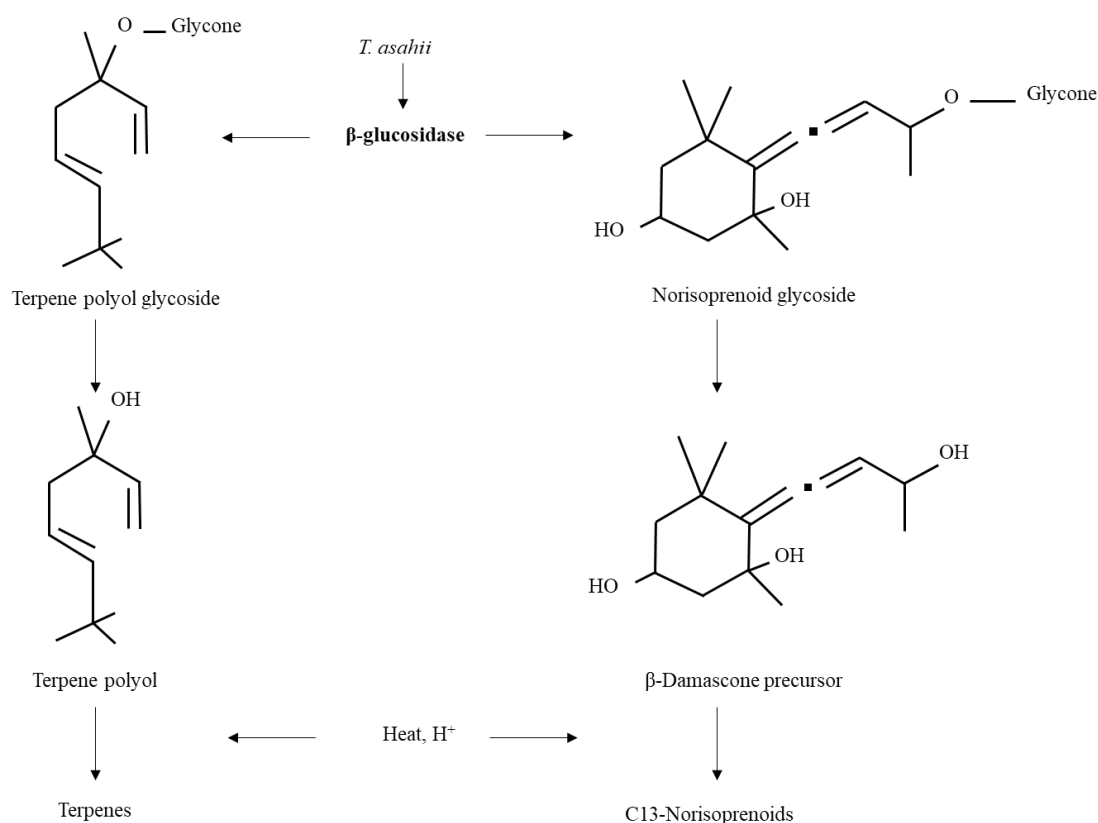
**Table 8** Overview of the Genome Assembly related of *T. asahii*

Organism	Identification	Origin	Assembly level	Genbank assembly accession	Reference
<i>Trichosporon asahii</i> 1	CBS 2479	skin human lesions	Scaffold	GCA_000293215.1	(R. Yang et al., 2003)
JCM_2466_ASSEMBL Y_V001	JCM_2466	psoriatic lesion	Scaffold	GCA_001972365.1	(Sriswasdi et al., 2019)
ASM2363013V1	M6011	n/a	Scaffold	GCA_023630135.1	Dalian Medical University
ASM2552995V1	F6008	n/a	Scaffold	GCA_025529955.1	Dalian Medical University
ASM2363001V1	Y-2-4	n/a	Scaffold	GCA_023630015.1	Dalian Medical University
ASM2363007V1	PH2804	n/a	Scaffold	GCA_023630075.1	Dalian Medical University
ASM2363003V1	Y3	n/a	Scaffold	GCA_023630035.1	Dalian Medical University
ASM29921V2	CBS 8904	Environment	Scaffold	GCA_000299215.2	(R. Y. Yang et al., 2012)
ASM402634V1	n/a	Infant gut	Scaffold	GCA_004026345.1	(Olm et al., 2019)



**Figure 8.** The four mutations in the TOR pathway of *T. asahii* are implicated in fluconazole resistance. Adapted from [Li et al. \(2017\)](#) and [Padovan et al. \(2019\)](#).





**Figure 9.** Formation of volatile aroma compounds (terpene and norisoprenoid) from aroma glycosides (monoterpene polyol and norisoprenoid glycoside) by  $\beta$ -glucosidase produce by *T. asahii*. Adapted from Wang and al. (2012)

### Conflict of interest:

The authors confirm that they do not have any conflict of interest with respect to the work described in this manuscript.

### Acknowledgements

Aude Commenges was recipient of a scholar fellowship from the University of Lille (France) and the University Laval (Canada). The authors acknowledge the Hauts-de-France region, through BiHauts de France CPER FEDER 2022-2027.

## 5.11. References

- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Pet* 25, 107–123.
- Ageitos, J.M., Vallejo, J.A., Veiga-Crespo, P., Villa, T.G., 2011. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 1219–1227.
- Al-Warhi, T., Sabt, A., Elkaeed, E.B., Eldehna, W.M., 2020. Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review. *Bioorg Chem* 103, 104163.
- Ashengroph, M., Amini, J., 2017. Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. *3 Biotech* 7, 358.
- Awe, S., Mikolasch, A., Schauer, F., 2009. Formation of coumarines during the degradation of alkyl substituted aromatic oil components by the yeast *Trichosporon asahii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 84, 965–976.
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C., 2016. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol* 32, 180.
- Banerjee, G., Chattopadhyay, P., 2019. Vanillin biotechnology: the perspectives and future. *J Sci Food Agric* 99, 499–506.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kaur, S., Kohli, R.K., Yadav, S.S., 2008. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *J Plant Physiol* 165, 297–305.
- Berger, E., Haase, P., Kuemmerlen, M., Leps, M., Schäfer, R.B., Sundermann, A., 2017. Water quality variables and pollution sources shaping stream macroinvertebrate communities. *Sci Total Environ* 587–588, 1–10.
- Cavera, V.L., Arthur, T.D., Kashtanov, D., Chikindas, M.L., 2015. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 46, 494–501.
- Ceugniz, A., Drider, D., Jacques, P., Coucheney, F., 2015. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d’Orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiol* 52, 177–184.

- Ceugniesz, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., Drider, D., 2017. Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *Int J Food Microbiol* 258, 89–93.
- Chagas-Neto, T.C., Chaves, G.M., Colombo, A.L., 2008. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* 166, 121–132.
- Chagas-Neto, T.C., Chaves, G.M., Melo, A.S.A., Colombo, A.L., 2009. Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 47, 1074–1081.
- Chen, P.H., Chou, J.Y., 2017. Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Pol J Microbiol* 66, 101-106.
- Chiu, Y.S., Chen, P.Y., Kuan, T., Wang, P.C., Chen, Y.J., Yang, Y.L., Yeh H.H., 2018. A polysaccharide derived from a *Trichosporon* sp. culture strongly primes plant resistance to viruses. *Mol Plant Microbe Interact* 31, 1257-1270.
- Chiu, Y.S., Tzean, Y., Chen, Y.H., Tsai, C.W., Yeh, H.H., 2021. Fungal F8-culture filtrate induces tomato resistance against tomato yellow leaf curl Thailand virus. *Viruses* 13, 1434.
- Colombo, A.L., Padovan, A.C.B., Chaves, G.M., 2011. Current Knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev* 24, 682–700.
- Cordeiro, R. de A., Aguiar, A.L.R., da Silva, B.N., Pereira, L.M.G., Portela, F.V.M., de Camargo, Z.P., de Lima-Neto, R.G., Castelo-Branco, D. de S.C.M., Rocha, M.F.G., Sidrim, J.J.C., 2021. *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 645812.
- de Almeida Júnior, J.N., Hennequin, C., 2016. Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. *Front Microbiol* 7, 1629.
- de Almeida, J.N., Jimenez-Ortigosa, C., Francisco, E.C., Colombo, A.L. Perlin, D.S., 2022. *ERG11* analysis among clinical isolates of *Trichosporon asahii* with different azole susceptibility profiles. *Antimicrob Agents Chemother* e0110122.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.L., Barbier, G., Le Blay, G., 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol* 151, 247–251.
- Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., Baiocchi, C., 2001. Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *J Agric Food Chem* 49, 5397–5408.

- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., Piccolomini, R., 2006. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3269–3276.
- Dutta, T.K., Harayama, S., 2001. Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environ Sci Technol* 35, 102–107.
- Falk, R., Wolf, D.G., Shapiro, M., Polacheck, I., 2003. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. *J Clin Microbiol* 41, 911.
- Feng, D., Zhang, A., Yang, Y., Yang, P., 2020. Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. *Arch Pharm (Weinheim)* 353, 1900380.
- Ferraretto, L.F., Shaver, R.D., Bertics, S.J., 2012. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. *J Dairy Sci* 95, 4017–4028.
- 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. *Int J Food Microbiol* 241, 191–197.
- Geraldino, B.R., Nunes, R.F.N., Gomes, J.B., da Poça, K.S., Giardini, I., Silva, P.V.B., Souza, H.P., Otero, U.B., Sarpa, M., 2021. Evaluation of exposure to toluene and xylene in gasoline station workers. *Adv Prev Med*, 2021, 5553633.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., Brena, B.M., 2011. A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry* 46, 385–389.
- Graham, K., Stack, H., Rea, R., 2020. Safety, beneficial and technological properties of *enterococci* for use in functional food applications - a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 60, 3836–3861.
- Guého, E., de Hoog, G.S., Smith, M.T., 1992a. Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 285–288.
- Guého, E., Smith, M.T., de Hoog, G.S., Billon-Grand, G., Christen, R., Batenburg-van der Vegte, W.H., 1992b. Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 289–316.
- Hespell, R.B., 1987. Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *Proc Nutr Soc* 46, 407–413.

- Huang, X., Zhang, X., Feng, F., Xu, X., 2016. Biodegradation of tetracycline by the yeast strain *Trichosporon mycotoxinivorans* XPY-10. *Prep Biochem Biotechnol* 46, 15–22.
- Ider, S., Belguesmia, Y., Cazals, G., Boukherroub, R., Coucheney, F., Kihal, M., Enjalbal, C., Drider, D., 2020. The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*. *Food Biosci* 36, 100670.
- Ider, S., Belguesmia, Y., Coucheney, F., Kihal, M., Drider, D., 2019. Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria. *Arch Microbiol* 201, 399–407.
- Iturrieta-González, I.A., Padovan, A.C.B., Bizerra, F.C., Hahn, R.C., Colombo, A.L., 2014. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One* 9, 109553.
- Jenssen, H., Hamill, P., Hancock, R.E.W., 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 19, 491–511.
- Jingkai, J., Jianming, Z., Zhenmin, L., Huaxi, Y., 2020. Dynamic changes of microbiota and texture properties during the ripening of traditionally prepared cheese of China. *Arch Microbiol* 202, 2059–2069.
- Khan, I.T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., Jaspal, M.H., 2019. Antioxidant properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids Health Dis* 18, 41.
- Lakshmi, V., Das, N., 2012. Removal of caffeine from industrial wastewater using *Trichosporon asahii*. *J Environ Biol* 34, 701–708.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S., 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci. & Technol.* 92, 455–468.
- Lee, J.W., Melcher, G.A., Rinaldi, M.G., Pizzo, P.A., Walsh, T.J., 1990. Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigelii*. *J Clin Microbiol* 28, 2823–2827.
- Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A.M., Ferraro, T.N., Yang, R., Chen, Y., 2020. Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiol Infect* 148, 169.

- Li, H., Wang, C., Chen, Y., Zhang, S., Yang, R., 2017. Integrated transcriptomic analysis of *Trichosporon asahii* uncovers the core genes and pathways of fluconazole resistance. *Sci Rep* 7, 17847.
- Lo, S.C., Xie, Z.R., Chang, K.Y., 2020. Structural and functional enrichment analyses for antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci* 21, 8783
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V., 2010. Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chem* 120, 205–216.
- Lushchak, O., Strilbytska, O., Piskovatska, V., Storey, K.B., Koliada, A., Vaiserman, A., 2017. The role of the TOR pathway in mediating the link between nutrition and longevity. *Mech Ageing Dev* 164, 127–138.
- Ma, X., Yang, W., Yang, A., Chen, D., Wang, C., Ling, S., Cao, S., Zuo, Z., Wang, Y., Zhong, Z., Peng, G., He, M., Gu, Y., 2023. Metabolome and transcriptome combinatory profiling reveals fluconazole resistance mechanisms of *Trichosporon asahii* and the role of farnesol in fluconazole tolerance. *Microorganisms* 11, 2798.
- Maicas, S., Mateo, J.J., 2016. Microbial Glycosidases for wine production. *Beverages* 2, 20.
- Mao, Hui-ling, Mao, Hua-long, Wang, J.K., Liu, J.X., Yoon, I., 2013. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on in vitro fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets. *J Anim Sci* 91, 3291–3298.
- Marín, P., Palmero, D., Jurado, M., 2015. Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *Int J Dairy Technol* 68, 565–572.
- Mehta, V., Chander, J., Gulati, N., Singla, N., Vasdeva, H., Sardana, R., Kumar Pandey, A., 2021a. Epidemiological profile and antifungal susceptibility pattern of *Trichosporon* species in a tertiary care hospital in Chandigarh, India. *Curr Med Mycol* 7, 19–24.
- Mehta, V., Nayyar, C., Gulati, N., Singla, N., Rai, S., Chandar, J., 2021b. A comprehensive review of *Trichosporon* spp.: an invasive and emerging fungus. *Cureus* 13, 17345.
- Middelhoven, W.J., Scorzetti, G., Fell, J.W.Y. 2004. Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon behrend* with the description of five

- novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 975–986.
- Morikawa, M., 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *J Biosci Bioeng* 101, 1–8.
- Moubasher, A.A.H., Abdel-Sater, M.A., Soliman, Z.S.M., 2018. Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *J Mycol Med* 28, 76–86.
- Mukherjee, P. K. & Chandra, J., 2004. Candida biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7, 301–309.
- Nhi-Cong, L.T., Mai, C.T.N., Minh, N.N., Ha, H.P., Lien, D.T., Tuan, D.V., Quyen, D.V., Ike, M., Uyen, D.T.T., 2016. Degradation of sec-hexylbenzene and its metabolites by a biofilm-forming yeast *Trichosporon asahii* B1 isolated from oil-contaminated sediments in Quangninh coastal zone, Vietnam. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 51, 267–275.
- Ogunseitan, O.A., 2002. Caffeine-inducible enzyme activity in *Pseudomonas putida* ATCC 700097. *World J Microbiol Biotechnol* 18, 423–428.
- Olm, M.R., West, P.T., Brooks, B., Firek, B.A., Baker, R., Morowitz, M.J., Banfield, J.F., 2019. Genome-resolved metagenomics of eukaryotic populations during early colonization of premature infants and in hospital rooms. *Microbiome* 7, 26.
- Padovan, A.C.B., Rocha, W.P. da S., Toti, A.C. de M., Freitas de Jesus, D.F., Chaves, G.M., Colombo, A.L., 2019. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. *Fungal Genet Biol* 133, 103267.
- Paserakung, A., Pattarajinda, V., Vichitphan, K., Froetschel, M.A., 2015. Selection and identification of oleaginous yeast isolated from soil, animal feed and ruminal fluid for use as feed supplement in dairy cattle. *Lett Appl Microbiol* 61, 325–332.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P.M., Martín, R., Palop, M.L., 2012. Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol* 28, 1423–1432.
- Rai, A.K., Kumari, R., Sanjukta, S., Sahoo, D., 2016. Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresour Technol* 219, 239–245.
- Raju, D.S., Sugunan, A., Keechilattu, P., Philip, A., Reghu, R., 2020. Chemoport-related fungemia caused by *Trichosporon asahii*. *J Pediatr Hematol Oncol* 42, e193–e194.

- Rakowska, R., Sadowska, A., Dybkowska, E., Świdorski, F., 2017. Spent yeast as natural source of functional food additives. *Rocz Panstw Zakl Hig* 68, 115–121.
- Ramírez, I., Moncada, D., 2020. Fatal disseminated infection by *Trichosporon asahii* under voriconazole therapy in a patient with acute myeloid leukemia: a review of breakthrough infections by *Trichosporon* spp. *Mycopathologia* 185, 377–388.
- Rezki, M.A., Benbadis, L., DeBillerbeck, G., Benbayerland, Z., 2013. Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. *J Yeast Fungal Res* 4, 75–83.
- Schmitt, M.J., Breinig, F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26, 257–276.
- Sigurdson, G.T., Tang, P., Giusti, M.M., 2017. Natural colorants: food colorants from natural sources. *Annu Rev Food Sci Technol* 8, 261–280.
- Singh, A., Nyati, A., Mohta, A., Kushwaha, R.K., Jain, S.K., 2019. A case of scalp white piedra caused by *Trichosporon ovoides*. *Int J Trichology* 11, 134–137.
- Singh, A., Yadav, V., Prasad, R., 2012. Comparative lipidomics in clinical isolates of *Candida albicans* reveal crosstalk between mitochondria, cell wall integrity and azole resistance. *PLoS One* 7, e39812.
- Sriswasdi, S., Takashima, M., Manabe, R.-I., Ohkuma, M., Iwasaki, W., 2019. Genome and transcriptome evolve separately in recently hybridized *Trichosporon* fungi. *Commun Biol* 2, 263.
- Stubbendieck, R.M., Straight, P.D., 2016. Multifaceted interfaces of bacterial competition. *J Bacteriol* 198, 2145–2155.
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., Shinoda, T., 2002. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J Clin Microbiol* 40, 1826–1830.
- Sugita, T., Nishikawa, A., 2004. Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 45, 55–58.
- Sundh, I., Melin, P., 2011. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 113–119.
- Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M.E., Neviani, E., 2003. Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Res* 3, 159–166.
- Toriumi, Y., Sugita, T., Nakajima, M., Matsushima, T., Shinoda, T., 2002. Antifungal pharmacodynamic characteristics of amphotericin B against *Trichosporon asahii*, using time-kill methodology. *Microbiol Immunol* 46, 89–93.



- Tsai, M.S., Yang, Y.L., Wang, A.H., Wang, L.S., Lu, D.C.T., Liou, C.H., Hsieh, L.Y., Wu, C.J., Cheng, M.F., Shi, Z.Y., Lo, H.J., 2012. Susceptibilities to amphotericin B, fluconazole and voriconazole of *Trichosporon* clinical isolates. *Mycopathologia* 174, 121–130.
- Vorbeck, M.L., Cone, J.F., 1963. Characteristics of an intracellular proteinase system of a *Trichosporon* species isolated from Trappist-type cheese. *Appl Microbiol* 11, 23–27.
- Wang, B., Huang, L.H., Zhao, J.X., Wei, M., Fang, H., Wang, D.Y., Wang, H.F., Yin, J.G., Xiang, M., 2015. Erg11 mutations associated with azole resistance in *Candida albicans* isolates from vulvovaginal candidosis patients. *Asian Pac J Trop Biomed* 5, 909–914.
- Wang, Y., Kang, W., Xu, Y., Li, J., 2011a. Effect of different indigenous yeast  $\beta$ -glucosidases on the liberation of bound aroma compounds. *J Inst Brew* 117, 230–237.
- Wang, Y., Li, J., Xu, Y., 2011b. Characterization of novel  $\beta$ -glucosidases with transglycosylation properties from *Trichosporon asahii*. *J Agric Food Chem* 59, 11219–11227.
- Wang, Y., Xu, Y., Li, J., 2012. A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichosporon asahii*: yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. *J Food Sci* 77, M505–515.
- Wang, Y., Zhang, C., Li, J., Xu, Y., 2013. Different influences of  $\beta$ -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. *Food Chemistry* 140, 245–254.
- Weiss, W.P., Pinos-Rodríguez, J.M., 2009. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. *J Dairy Sci* 92, 6144–6155.
- Wen, R., Li, X., Han, G., Chen, Q., Kong, B., 2021. Fungal community succession and volatile compound dynamics in Harbin dry sausage during fermentation. *Food Microbiol* 99, 103764.
- Whon, T.W., Kim, H.S., Bae, J.W., 2018. Complete genome sequence of *Kocuria rhizophila* BT304, isolated from the small intestine of castrated beef cattle. *Gut Pathog* 10, 42.
- Yang, R., Ao, J., Wang, W., Song, K., Li, R., Wang, D., 2003. Disseminated trichosporonosis in China. *Mycoses* 46, 519–523.

- Yang, R.Y., Li, H.T., Zhu, H., Zhou, G.P., Wang, M., Wang, L., 2012. Genome Sequence of the *Trichosporon asahii* Environmental Strain CBS 8904. *Eukaryot Cell* 11, 1586–1587.
- Zhang, Y., Li, H., Yang, R., Wang, C., 2016. Study on antioxidant enzymatic activities of *Trichosporon asahii*. *Indian J Microbiol* 56, 445–450.

## Chapitre 6 : Discussion générale

### 6.1. Diversité microbienne et typicité des fromages

La Bourle Roncquoise (BR) et le Carré du Vinage (CV) sont deux fromages fermiers à base de lait de vache thermisé. L'utilisation du métabarcoding a permis de révéler les profils bactériens et fongiques de ces fromages après leur affinage. La description de la composition et de l'activité du microbiote présent dans les fromages permet d'approfondir notre connaissance de la diversité et de la spécificité de ces produits, en identifiant parfois des éléments distinctifs qui les caractérisent (Banjara et al., 2015; Ceugniet, Taminiau, et al., 2017b, 2017a; Duru et al., 2018). Cette information peut se révéler précieuse pour améliorer la qualité des fromages. Les interactions entre chaque microorganisme présent dans le fromage jouent donc un rôle déterminant dans le développement de son goût unique. Dans l'ensemble la composition microbienne de la BR et du CV est caractéristique de leur type de fromages (pâte pressée non cuite et pâte molle à croûte lavée) et les distingue peu des autres variétés, tels que le Maroilles, le Tilsit ou le Reblochon (Feurer et al., 2004; Mounier et al., 2017; Irlinger et Monnet, 2021) pour le CV, et le Saint-Nectaire, la Tomme de Savoie, le Taleggio ou le Cheddar (Fox et al., 2004; Mohamed et al., 2023) pour la BR.

Pour la BR, un fromage à pâte pressée non cuite, on observe une prédominance de *S. thermophilus* au cœur, une culture d'affinage introduite dans le lait pendant la fabrication. En revanche, la surface de la BR présente une plus grande diversité bactérienne et fongique, notamment des bactéries halotolérantes telles que *Halomonas* sp. et *Psychrobacter* sp., en raison de la concentration élevée en sels pendant l'affinage, ou des champignons microscopiques, comme *Penicillium* sp., *Mucor* sp. et *Candida* sp., qui contribuent aux caractéristiques sensorielles du fromage. Ces microorganismes constituent le microbiote secondaire de la BR et proviennent de l'environnement de production, du procédé, des outils ou bien encore des fromagers (Choi et al., 2020).

Le CV est un fromage à croûte lavée à pâte molle, soumis à un processus de maturation particulier consistant en un lavage de la croûte avec une solution saline contenant *B. linens*. La concentration de sel à la surface exerce une sélection sur l'ensemble des

microorganismes présents. Le microbiote bactérien est composé de bactéries partageant des caractéristiques physiologiques similaires qui favorisent leur prolifération en surface. Ces bactéries sont aérobies, tolérantes au sel, mais incapables de se développer dans des environnements acides (Mounier et al., 2017). Le microbiote fongique, quant à lui, contribue à la désacidification du fromage en consommant l'acide lactique, ce qui favorise la croissance de diverses bactéries halotolérantes, telles que les bactéries coryneformes (*Corynebacterium* sp., *Glutamibacter* sp., *Brevibacterium* sp. et *Microbacterium* sp.) et les bactéries d'origine marine (*Marinomonas* sp., *Psychrobacter* sp., *Halomonas* sp.) (Feurer et al., 2004; Mounier et al., 2017; Irlinger et Monnet, 2021).

L'abondance de chaque microorganisme peut influencer le profil aromatique en produisant certains composés aromatiques en quantités variables. Il est également possible que la méthode de métabarcoding ne mette pas en lumière des genres microbiens à l'origine de la typicité de ces fromages. En effet, une des limites de cette technique est le seuil de détection. Si certains genres sont en trop faibles concentrations, ils ne seront pas détectés, alors qu'ils peuvent être la source de composés aromatiques uniques (Zotta et al., 2022). La typicité des fromages renvoie à leurs caractéristiques uniques en termes de goût, de texture et d'apparence (Ferrocino et al., 2022). Le processus d'affinage des fromages est une phase cruciale au cours de laquelle la fermentation microbienne s'accompagne de réactions enzymatiques et chimiques qui façonnent les caractéristiques finales du produit, incluant leur texture et leur saveur. Ces caractéristiques ont aussi une influence sur la perception sensorielle et l'appréciation par le consommateur (Yavuz et al., 2021). Il existe, une relation étroite entre les composés organiques volatils (COV) et l'activité du microbiote du fromage. Les interactions complexes entre le microbiote et le métabolome permet de comprendre quelles microorganismes contribue à la saveur, et quels sont les COV majoritaires lors de l'affinage du fromage (Bertuzzi et al., 2018; Afshari et al., 2020). Trois principaux métabolismes contribuent à la formation des composés aromatiques dans les fromages : le métabolisme des sucres, la protéolyse et la lipolyse. Parmi ces composés, on trouve les acides, les alcools, les cétones, les composés soufrés, les aldéhydes, les alcools secondaires et les lactones, qui contribuent à l'arôme final du fromage (Yavuz et al., 2021).

Le lactose, principal hydrate de carbone utilisé par les microorganismes dans leur métabolisme, subit une transformation en différents composés tels que le lactate (goût

acide à aigre si en trop forte concentration), l'acétate (saveurs fruitées et sucrées, comme la banane), le formate (arôme floral léger) et l'acétaldéhyde (notes de pommes à faibles concentrations) (Bertuzzi et al., 2018). Les bactéries lactiques ont aussi la capacité de produire des composés aromatiques tels que l'acétoïne, le 2,3-butanediol, le diacétyle et la 2-butanone (Bertuzzi et al., 2018). La protéolyse et les activités aminopeptidasiques, entraîne la dégradation des protéines en acides aminés libre et en COV. Enfin, la lipolyse joue un rôle dans la formation d'arômes en hydrolysant les triglycérides en acides gras libres, mono- et di-glycérides, ainsi qu'en glycérol, qui peuvent servir de précurseurs à divers composés aromatiques (Khattab et al., 2019). La présence, l'abondance et les interactions entre les microorganismes au sein des écosystèmes de production de fromage jouent un rôle crucial dans le développement des caractéristiques organoleptiques distinctes propres à chaque variété de fromage, contribuant ainsi à leur goût unique. L'analyse de la diversité microbienne au moyen du métabarcoding de la BR et du CV vient enrichir notre compréhension de ces fromages fermiers particuliers.

## 6.2. Carte d'identité microbiologique des fromages à l'étude

Cette étude de la composition microbienne par métabarcoding de la BR et du CV permet de compléter les informations sur ces types de fromages fermiers et participe à la construction des cartes d'identités microbiologiques, pouvant être un moyen de lutte contre les fraudes alimentaires. Les produits laitiers, en particulier le fromage, sont souvent touchés par la fraude alimentaire. C'est un problème mondial, qui implique des actes illégaux délibérés dans la chaîne alimentaire pour des gains financiers, tels que la substitution, la contrefaçon, et l'étiquetage incorrect, avec des coûts annuels estimés entre 10 et 65 milliards de dollars américains et des répercussions sur la sécurité alimentaire, la qualité des produits, la santé publique et la société (Robson et al., 2021; Cardin et al., 2022). Pour lutter contre les fraudes alimentaires et assurer la provenance des fromages, par exemple des fromages d'appellation d'origine protégé (AOP), il est possible d'utiliser des méthodes telles que l'analyse de spectrométrie de masse, les profils isotopiques, et même l'analyse de l'ADN (Katerinopoulou et al., 2020). L'analyse de l'ADN se fait principalement via un séquençage *shotgun*, qui permet de déterminer la composition génétique complète d'un échantillon (Anastasiou et al., 2022).

En surplus de la diversité microbienne établie au moyen du métabarcoding, il est possible d'approfondir la compréhension des caractéristiques distinctives des fromages fermiers par plusieurs autres approches de -OMICS, notamment le séquençage *shotgun* (métagénomique) qui permet de déterminer la composition génétique complète d'un échantillon (Anastasiou et al., 2022), la métatranscriptomique et, plus récemment, la métabolomique. L'utilisation de techniques -OMICS a permis de mettre en lumière des corrélations significatives entre le microbiote du fromage, les métabolites produits et leur impact sur les caractéristiques aromatiques et la qualité globale du fromage (Afshari et al., 2020; Anastasiou et al., 2022). Les profils microbiologiques de la BR et du CV offrent une vue d'ensemble de leur composition, mais pour établir une « carte d'identité » complète de ces fromages, des analyses plus approfondies telles que la métatranscriptomique, le séquençage *shotgun* et la métabolomique devraient être menées à différents stades d'affinage et sur plusieurs lots.

### 6.3. Métabarcoding vs approche culture dépendante

L'étude des microbiotes présents dans les fromages peut être réalisée de diverses manières, notamment par l'utilisation de techniques telles que le métabarcoding et l'approche culture-dépendante. Les approches de séquençage, en particulier, se distinguent par leur rapidité et leurs précisions (Alves et al., 2018). Pour les fromages français, l'approche de métabarcoding a permis d'obtenir une vue d'ensemble des populations bactériennes et fongiques présentes dans les différentes parties des fromages (cœur et croûte). Cette méthode est complétée par l'approche culture-dépendante, qui permet de déterminer les abondances relatives, exprimées en pourcentage, en unités formant colonies par gramme (CFU.g<sup>-1</sup>), offrant ainsi une meilleure compréhension de la contribution de chaque genre microbien aux écosystèmes fromagers.

Les approches basées sur le métabarcoding pour l'analyse des microbiotes comportent un ensemble de limitations significatives. Tout d'abord, la dépendance aux bases de données est essentielle. Cette méthode exige l'identification des séquences obtenues par homologie avec les bases de données de référence pour l'identification des genres et espèces. Des biais taxonomiques peuvent se manifester et les segments génétiques ciblés dans le métabarcoding peuvent présenter des sensibilités différentes en fonction des

genres et espèces (Ficetola et al., 2016). Un biais technique peut également être introduit dans l'analyse des résultats, si la présence d'un taxon en grande quantité masque un autre taxon présent en plus faible concentration dans l'échantillon. Par conséquent, ces biais peuvent favoriser la surreprésentation de certaines communautés microbiennes au détriment d'autres, altérant ainsi la représentation réelle des populations (Bellassi et al., 2021; Shikha et al., 2021). La quantification précise des abondances microbiennes constitue un autre défi. Bien que le métabarcoding puisse indiquer la présence relative des espèces, il peut être difficile de quantifier avec précision les abondances absolues, en particulier dans des contextes où les concentrations totales en microorganismes varient considérablement. La concentration variable d'ADN est une limitation supplémentaire. Les échantillons microbiens peuvent contenir des quantités variables d'ADN provenant de différentes espèces. Les espèces présentes en faibles concentrations peuvent échapper à la détection, entraînant une sous-représentation de leur rôle au sein de la communauté (Bellassi et al., 2021; Shikha et al., 2021). Un échantillonnage incomplet est aussi une préoccupation majeure. Lorsque la taille des échantillons est restreinte ou que certaines espèces sont rares, l'échantillonnage peut ne pas capturer l'ensemble de la diversité microbienne, conduisant à des conclusions partielles (Y.-X. Liu et al., 2021). Un exemple illustrant ces limitations est observé dans les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse, où la levure *M. pulcherrima* a été identifiée grâce à des méthodes d'isolement systématique des souches de fromages, mais n'a pas été détectée dans les résultats obtenus par métabarcoding (concentration trop faible ou incertitudes dans les séquences d'ADN dans les régions ITS et D1/D2 ou difficulté d'extraction de l'ADN (Kregiel et al., 2023)).

La variabilité génétique intraspécifique est également une considération majeure. Les variations génétiques significatives entre les microorganismes d'une même espèce ne sont pas détectées de manière adéquate dans la majorité des cas par les approches de métabarcoding, ce qui peut entraîner des erreurs dans l'identification et la quantification des espèces (Y.-X. Liu et al., 2021). L'identification des microorganismes à niveau taxonomique inférieur au genre est également difficile avec une étude métabarcoding (Hakimzadeh et al., 2023). Par ailleurs, la seule présence d'un genre ou d'une espèce ne garantit pas sa fonctionnalité ou son activité spécifique. En effet, les microorganismes détectés peuvent être en état de latence ou en phase de décroissance ou même non viable. Ceci limite ainsi la compréhension fonctionnelle des espèces présentes (Bellassi et al., 2021; Shikha et al., 2021).

#### 6.4. Fromage : réservoir de souches possédant une activité de biopréservation

Le fromage a été identifié comme une source potentielle de bactéries et de levures dotées de propriétés inhibitrices (Hatoum et al., 2012; Trejo-González et al., 2022). Cette observation découle du fait que le fromage constitue une matrice alimentaire complexe, abritant une multitude de micro-organismes bénéfiques, dont les interactions et les voies métaboliques jouent un rôle essentiel (Al-Qaysi et al., 2017; Angiolillo et al., 2014; Ceugniet, 2017). Le criblage systématique des isolats des fromages sélectionnés, contre les pathogènes et les agents d'altération propre aux types de fromages utilisés lors de ces travaux donne l'occasion de discerner le potentiel du fromage en tant que réservoir de souches antimicrobiennes.

Les 794 souches isolées du cœur et de la surface des fromages BR et CV, ainsi que les souches des fromages québécoise issues de la banque de données du Laboratoire de mycologie alimentaire (annexe 1) ont été testées contre dix cibles bactériennes (agents d'altération et pathogènes) : *C. tyrobutyricum* LMG 1285, *E. coli* ATCC 8739, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* CIP 82.110T, *L. monocytogenes* CIP 105459, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. enterica* serovar Kentucky CIP 105623, *S. enterica* serovar Newport ATCC 6962, *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 53648, et *S. aureus* ATCC 13709, et sept cibles fongiques (agents de détérioration): *C. parapsilosis* LMA-804, *R. mucilaginosa* LMA-808, et *Y. lipolytica* LMA-800, et les moisissures *C. cladosporioides* LMA-31, *C. herbarum* LMA-929, *M. racemosus* LMA-722 et *P. commune* LMA-72. De nombreux isolats présentent des propriétés antifongiques (annexe 2) et/ou antibactériennes (annexe 3) - 49 isolats antifongiques et 16 isolats antibactériens. Plusieurs candidats prometteurs pour la biopréservation dans la production de fromage ont été trouvés, notamment *E. faecalis*, *Marinomonas* sp., *Halomonas* sp., *D. hansenii*, *T. asahii* et *M. pulcherrima*. Ces micro-organismes présentent une gamme d'activités antimicrobiennes, ce qui en fait des outils potentiels pour améliorer la sécurité et la qualité des fromages. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement leurs mécanismes d'action et leurs impacts sur les écosystèmes fromagers. De plus, les bactéries opportunistes pathogènes telles que *Klebsiella* sp. et *R. planticola*, bien qu'elles montrent des activités inhibitrices intéressantes, suscitent des inquiétudes et peuvent ne pas être utilisées directement pour la biopréservation des aliments. Il est intéressant de noter que parmi les 830



microorganismes provenant de fromages français et québécois qui ont été testés, seuls 5,90 % ont montré une activité antifongique, tandis que seulement 1,81 % ont présenté une activité antibactérienne. Ainsi, les souches de microorganismes potentiellement utiles pour la biopréservation demeurent rares, même au sein d'écosystèmes aussi diversifiés et complexes que ceux des fromages.

D'autres écosystèmes complexes, tels que les fonds marins (Habbu et al., 2016; Cabral et al., 2021), les sols (Nikitin et al., 2022), les fruits et légumes (Reyes et al., 2004; Janakiev et al., 2022) ou les écosystèmes liés aux aliments fermentés tels que la saucisse fermentée et le jambon sec (Álvarez et al., 2020; Cebrián et al., 2020), font également l'objet d'études approfondies dans le but d'augmenter les chances de découvrir de nouvelles souches antimicrobiennes. Une autre approche prometteuse dans le domaine de la biopréservation est l'utilisation d'un consortium de microorganismes, tels que ceux issus du Kéfir ou du Kombucha, qui sont des candidats prometteurs (Zhimo et al., 2020; Nyiew et al., 2022). Dans l'ensemble, la recherche de souches antagonistes dans des environnements complexes se diversifie, avec une exploration de différentes matrices microbiennes visant à maximiser les opportunités de découvrir des souches exploitables commercialement en tant qu'agents de conservation.

## 6.5. Les levures dotées d'activités antimicrobiennes

La recherche axée sur l'utilisation de souches de microorganismes dans les aliments fermentés, en particulier pour la biopréservation, a principalement privilégié les bactéries lactiques. Ces dernières sont largement reconnues pour leur capacité à générer des bactériocines (Leyva Salas et al., 2017; Russo et al., 2017; Rouxel et al., 2020; Shi et Maktabdardar, 2021). Toutefois, au cours des deux dernières décennies, les recherches sur la biopréservation ont aussi inclus l'utilisation des levures naturelles dans le but d'inhiber la croissance des bactéries et des champignons pathogènes, ainsi que la détérioration des produits (Bourdichon et al., 2021; Y. Ma et al., 2023; Sipiczki, 2023). Les levures présentent de nombreuses caractéristiques qui les positionnent comme des agents de biocontrôle appropriés, incluant leurs besoins nutritionnels simples, une forte capacité à coloniser des surfaces sèches pendant de longues périodes, et leur prolifération rapide sur des substrats économiques dans des bioréacteurs. Ces caractéristiques deviennent

particulièrement cruciales lors de la sélection d'agents de biocontrôle (Sundh and Melin, 2011; Muccilli et Restuccia, 2015; Freimoser et al., 2019; Mukherjee et al., 2020; Nascimento et al., 2020). Les levures mettent en place plusieurs mécanismes antagonistes, tel que la compétition nutritive (Sipiczki, 2020; Büyüksırit Bedir et Kuleşan, 2021), la formation de biofilm (Freimoser et al., 2019) ou encore la production de mycocines (Muccilli et Restuccia, 2015; Comitini et al., 2023). Les levures dans la biopréservation sont principalement étudiées pour agir contre d'autres levures. Toutefois, il est intéressant de vérifier les activités antibactériennes. En effet, une souche de *D. hansenii* isolée du fromage a montré des activités anti-*Listeria* par la production d'un peptide hydrophobe (Hatoum et al., 2013).

Lors des présents travaux de thèse, deux souches de levures antagonistes ont été isolées, soit la souche *M. pulcherrima* LMA-2038, du « Carré du Vinage » et *T. asahii* LMA-810, de la « Rose Blanche », qui sont des fromages traditionnels produits et commercialisés respectivement dans le nord de la France et au Québec (Canada). *M. pulcherrima* LMA-2038 a une activité antibactérienne contre *C. tyrobutyricum*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*. Il est intéressant de noter que cette levure a également une activité antifongique contre six des cibles fongiques testées : *C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica*, *C. cladosporioides*, *C. herbarum* et *P. commune*. La souche *T. asahii* LMA-810 a une activité antibactérienne contre *C. tyrobutyricum*, ainsi qu'une activité antifongique contre *R. mucilaginosa*, *Y. lipolytica* et *P. commune*. Ces deux levures ont montré des activités à la fois antifongiques et antibactériennes lors des tests antimicrobiens sur gélose (annexe 2 et 3). Les levures, telles que *M. pulcherrima* et *T. asahii* présentent un vaste éventail d'activités antagonistes contre de nombreux microorganismes pathogènes et responsables de la détérioration alimentaire. Les mécanismes sous-tendant ces antagonismes peuvent être variés, et la caractérisation de ces composés s'est uniquement portée sur les surnageants de culture. Plusieurs pistes sur la nature des composés à l'origine de l'inhibition des deux levures d'altérations ont été émises dans le chapitre 4. Les tests de caractérisation contre les cibles bactériennes n'ont pas été concluants, des expériences complémentaires pour mieux comprendre les mécanismes antagonistes de levures vis-à-vis des bactéries pathogènes ou d'altérations devront donc compléter ces travaux. Une meilleure compréhension de ces interactions, ainsi que des mécanismes sous-jacents, pourraient constituer une opportunité pour lutter contre le problème de la résistance aux antibiotiques, qui concerne à la fois le secteur

médical, en santé humaine et animale, et le secteur alimentaire, dans un contexte « One Health ». Il est donc impératif d'orienter la recherche vers l'étude des interactions entre les levures et les bactéries, même dans des environnements de fermentations complexes impliquant plusieurs espèces microbiennes, comme le fromage.

## 6.6. Utilisation des levures comme agent de biopréservation

Il est important d'effectuer des recherches qui associent la microbiologie alimentaire et les procédés de transformation pour créer des produits où les micro-organismes restent efficaces pendant longtemps, tout en facilitant leur gestion de manière économique et pratique lors de l'ensemencement et de la fermentation (Comitini et al., 2023). Dans ces travaux de thèse, *M. pulcherrima* et *T. asahii* ont montré des activités antimicrobiennes différentes lors des tests sur les modèles caillés puisque seules les activités antifongiques contre *Y. lipolytica* et *R. mucilaginosa* ont été conservées dans cette matrice, alors que dix souches pour *M. pulcherrima* et quatre souches pour *T. asahii* ont été inhibées sur milieu de culture. Le modèle caillé apporte de la complexité qui peut modifier la production de métabolites secondaires. En effet selon la composition du milieu, l'effet inhibiteur peut varier (Mukherjee et al., 2020). Il est donc essentiel de confirmer l'activité antagoniste observée sur des milieux synthétiques en la testant sur un milieu plus complexe qui ressemble étroitement à la matrice finale du produit alimentaire sur lequel sera utilisé la souche de biopréservation (Rouxel et al., 2020).

Dans le contexte de l'utilisation de ces souches comme agents de biopréservation, il est essentiel de mener une caractérisation approfondie de leurs composés antimicrobiens, en mettant particulièrement l'accent sur leur cytotoxicité, leur spectre d'action, et leur impact sur la communauté microbienne présente dans le fromage. De futures recherches sont prévues pour préciser leur composition exacte et pour évaluer leur influence sur le microbiote du fromage, avec pour objectif d'éviter tout effet indésirable sur les micro-organismes bénéfiques, en particulier ceux qui contribuent aux caractéristiques aromatiques et typiques du fromage.

## Conclusion générale et perspectives :

L'objectif principal de ce projet était de démontrer le potentiel des fromages, en particulier des fromages à pâte pressée non cuite et les pâtes molles à croûte lavée, en tant que réservoirs de souches de biopréservation. Notre étude des divers écosystèmes, cœur et surface, bactérien et fongique, a permis de mettre en lumière la diversité microbienne présente. Cette diversité, qui favorise des interactions multiples entre les différents micro-organismes, a révélé un potentiel en tant que réservoir de souches de biopréservation. Dans ce contexte, deux levures, *T. asahii* et *M. pulcherrima*, ont été identifiées comme des souches potentielles de biopréservation. Les tests réalisés dans des aliments modèles constituent une première étape dans la validation de leur capacité antagoniste. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour confirmer leur pouvoir antimicrobien sur des modèles plus complexe tel que de vrais fromages.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagés à la suite de ce projet. Tout d'abord, l'analyse des écosystèmes fromagers pourrait être complétée avec d'autres techniques de séquençage comme le séquençage *long-read*, qui permettrait d'obtenir une meilleure identification taxonomique que le métabarcoding. De plus, dans l'objectif de déterminer un profil microbiologique type de la BR et du CV, la méthode de séquençage *shotgun* pourrait être réalisée. Cette méthode permet la détection de l'ensemble des bactéries, champignons, virus, acariens, etc, présents dans les fromages, permettant ainsi d'avoir une vue complète sur la composition microbiologique. Ces différentes méthodes, séquençage *long-read*, *shotgun*, mais aussi le métabarcoding pourraient être réalisées sur différents lots de ces fromages et à différents stades d'affinage, pour compléter les informations déjà obtenues.

Une deuxième voie à poursuivre à la suite de ce projet est de valider l'efficacité inhibitrice des souches de biopréservation ou de leurs composés antagonistes face aux agents d'altération et aux agents pathogènes dans des modèles plus complexes, susceptibles de modifier le spectre de leur activité inhibitrice. Les milieux de culture synthétiques ne parviennent pas à reproduire fidèlement les conditions de croissance de l'environnement fromager, pour pallier cette limite il est possible d'utiliser des modèles fromagers. Les caillés modèles présentent une complexité qui leur permet simuler la composition des

fromages tout en garantissant une uniformité des conditions de croissance, grâce à la possibilité de contrôler plusieurs paramètres. Dans le cadre de ce projet, nous avons seulement évalué un type de caillé modèle, cependant, il serait pertinent d'explorer d'autres types avec des niveaux de complexité croissants. Ces modèles nous offrent ainsi la possibilité de comprendre le comportement inhibiteur avant de réaliser des tests sur de vrais fromages, où les paramètres sont bien plus variables.

Il est intéressant de prendre en considération l'impact de l'introduction de ces souches de biopréservation ou de leurs composés inhibiteurs sur le microbiote fromager. La comparaison par métabarcoding des fromages avec et sans les produits de biopréservation pourraient être réalisée dans un premier temps puis de manière plus ciblée, une approche métatranscriptomique pourrait être proposée. Ceci permettrait de valider l'impact du composé inhibiteur sur les gènes transcrits dans les microorganismes bénéfiques et, par conséquent, estimer l'impact sur les activités métaboliques de ces microorganismes.

Une autre information importante à valider lors de l'introduction d'une nouvelle souche ou de son composé inhibiteur est l'impact de celle-ci sur les caractéristiques organoleptiques des fromages. En effet, un agent de biopréservation doit pouvoir inhiber les pathogènes ou prolonger la durée de conservation des produits tout en minimisant son influence sur leurs propriétés sensorielles. Des approches telles que l'évaluation de la texture par des méthodes de rhéologie ou l'analyse des composés volatils pourraient être utilisées pour résoudre cette question. Également, si l'innocuité est assurée, un panel d'analyse sensoriel permettra aussi de valider l'impact.

À la suite de ces travaux, l'identification des composés antagonistes produits par *M. pulcherrima* LMA-2038 et *T. asahii* LMA-810 est prévue. Les génomes complets de ces deux levures ont été séquencés en vue d'une étude de génomique comparative, avec l'utilisation possible de bases de données telles que antiSmash, Bagel 4 (pour les bactériocines) ou ThioFinder (Bin Hafeez et al., 2021; Blin et al., 2023). En parallèle, une étude métabolomique peut être envisagée en utilisant des techniques telles que la spectrométrie de masse et la spectroscopie RMN pour obtenir des informations détaillées sur la structure et la quantité des molécules étudiées. Ces études peuvent être réalisées de manière ciblée en comparant les composés recherchés à des bases de données ou à la littérature, ou de manière non ciblée. La métabolomique non ciblée est une technique

d'analyse visant à caractériser l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon biologique, offrant ainsi la possibilité d'identifier des composés métaboliques potentiellement antimicrobiens issus de micro-organismes ou d'autres sources naturelles. Des essais préliminaires réalisés pendant cette thèse (données non présentées) sont prometteurs et méritent d'être approfondis.

Ces différentes études permettront ainsi d'orienter l'utilisation de ces souches de biopréservation. Pour la souche *T. asahii*, pathogène opportuniste, l'inoculation directe comme souche de biopréservation est proscrite. Pour cette levure, le composé antagoniste devra être isolé, purifié et directement ajouté. Une alternative serait l'utilisation d'un produit de la fermentation de cette souche dans lequel le microorganisme sera inactivé avant utilisation alimentaire. L'innocuité des composés antagonistes de ces souches devra être testée. En effet, l'innocuité des composés antagonistes est primordiale tant pour les consommateurs que pour l'environnement. L'utilisation d'agents de biocontrôle microbiens a suscité des préoccupations en raison de l'impact négatif sur l'environnement, autre que l'aliment à préserver, qu'ils peuvent provoquer. Leur dissémination dans la nature peut provoquer des déséquilibres avec d'autres populations de micro-organismes bénéfiques, pouvant par exemple se trouver dans les haloirs ou bien sur les étagères d'affinage.

Ces études proposées en perspective visent à valider le potentiel de biopréservation de ces souches à l'égard du microbiote altérant les fromages. À plus long terme, l'exploration de leur antagonisme contre d'autres microorganismes contaminants est envisagée. Les souches de biopréservation s'affirment comme des acteurs clés de l'industrie agro-alimentaire, contribuant à la sécurité alimentaire, à la réduction du gaspillage et au maintien des caractéristiques sensorielles tout en favorisant l'innovation. Dans l'avenir, on peut s'attendre à des avancées significatives dans la sélection et l'optimisation des souches de biopréservation pour des applications spécifiques. Les technologies de séquençage de nouvelle génération et les approches métabolomiques permettront une caractérisation plus précise des composés antimicrobiens produits par ces souches. De plus, l'utilisation de souches de biopréservation dans des produits respectueux de l'environnement et durables devrait être un axe de développement important, en réponse à la demande croissante des consommateurs pour des produits plus écologiques, en accord avec le CL, et permettre de réduire les additifs chimiques. Pour optimiser leur utilisation

dans ces secteurs, une recherche continue sur leur efficacité, leur sécurité et leur conformité réglementaire est essentielle.

## Bibliographie

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Afshari, R., Pillidge, C. J., Dias, D. A., Osborn, A. M., & Gill, H. (2020). Cheesomics: The future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(1), 33–47. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>
- Ageitos, J. M., Vallejo, J. A., Veiga-Crespo, P., & Villa, T. G. (2011). Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1219–1227. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3200-z>
- Alampoondi Venkataramanan, S. V., George, L., Sahu, K. K., & Abraham, G. M. (2021). A 5-Year Retrospective Analysis of *Raoultella planticola* Bacteriuria. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1989–2001. <https://doi.org/10.2147/IDR.S306632>
- Alawiye, T. T., & Babalola, O. O. (2021). Metabolomics: Current application and prospects in crop production. *Biologia*, 76(1), 227–239. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00574-z>
- Al-Gamal, M. S., Ibrahim, G. A., Sharaf, O. M., Radwan, A. A., Dabiza, N. M., Youssef, A. M., & El-ssayad, M. F. (2019). The protective potential of selected lactic acid bacteria against the most common contaminants in various types of cheese in Egypt. *Heliyon*, 5(3), e01362. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01362>
- Allen, J. P., & Hauser, A. R. (2019). Diversity of contact-dependent growth inhibition systems of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 201(14), e00776-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00776-18>
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature*, 568(7753), 499–504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>
- Almena-Aliste, M., & Mietton, B. (2014). Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Microbiology Spectrum*, 2(1), CM-0003–2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>
- Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., AbuNaser, R. A., Olaimat, A. N., Ayyash, M., Al-Holy, M. A., Kadora, K. M., & Holley, R. A. (2020). Factors affecting the viability of



- Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin during processing and storage of white-brined cheese. *Journal of Dairy Science*, 103(8), 6869–6881. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18158>
- Al-Qaysi, S. A. S., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A.-R., & Ibrahim, J. A. A.-R. (2017). Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International Journal of Microbiology*, 2017, 2605382. <https://doi.org/10.1155/2017/2605382>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez, M., Rodríguez, A., Peromingo, B., Núñez, F., & Rodríguez, M. (2020). *Enterococcus faecium*: A promising protective culture to control growth of ochratoxigenic moulds and mycotoxin production in dry-fermented sausages. *Mycotoxin Research*, 36(2), 137–145. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00376-6>
- Alves, L. de F., Westmann, C. A., Lovate, G. L., de Siqueira, G. M. V., Borelli, T. C., & Guazzaroni, M.-E. (2018, August 23). Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science [Review Article]. *International Journal of Genomics*; . <https://doi.org/10.1155/2018/2312987>
- Al-Warhi, T., Sabt, A., Elkaeed, E. B., & Eldehna, W. M. (2020). Recent advancements of coumarin-based anticancer agents: An up-to-date review. *Bioorganic Chemistry*, 103, 104163. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104163>
- Anastasiou, R., Kazou, M., Georgalaki, M., Aktypis, A., Zoumpopoulou, G., & Tsakalidou, E. (2022). Omics approaches to assess flavor development in cheese. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(2), 188. <https://doi.org/10.3390/foods11020188>
- And, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82–100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
- André, M. C. D. P. B., Campos, M. R. H., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C., & Serafini, Á. B. (2008). Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following SmaI digestion. *Food Control*, 19(2), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.03.010>
- Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A. V., & Nobile, M. A. D. (2014). Biopreservation of Fior di Latte cheese. *Journal of Dairy Science*, 97(9), 5345–5355. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8022>

- Aoki, S. K., Pamma, R., Hernday, A. D., Bickham, J. E., Braaten, B. A., & Low, D. A. (2005). Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5738), 1245–1248. <https://doi.org/10.1126/science.1115109>
- Ashengroph, M., & Amini, J. (2017). Bioconversion of isoeugenol to vanillin and vanillic acid using the resting cells of *Trichosporon asahii*. *3 Biotech*, *7*(6), 358. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0998-9>
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, *99*, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.022>
- Awe, S., Mikolasch, A., & Schauer, F. (2009). Formation of coumarines during the degradation of alkyl substituted aromatic oil components by the yeast *Trichosporon asahii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(5), 965–976. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2044-2>
- Azubuikwe, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *32*(11), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Bachmann, H. P., Bobst, C., Bütikofer, U., Casey, M. G., Dalla Torre, M., Fröhlich-Wyder, M. T., & Fürst, M. (2005). Occurrence and significance of *Fusarium domesticum* alias Anticollanti on smear-ripened cheeses. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(4), 399–407. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.05.018>
- Banerjee, G., & Chattopadhyay, P. (2019). Vanillin biotechnology: The perspectives and future. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(2), 499–506. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9303>
- Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, *222*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>
- Banjara, N., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2015). Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology*, *70*(6), 792–800. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>
- Baquero, F., Lanza, V. F., Baquero, M.-R., Del Campo, R., & Bravo-Vázquez, D. A. (2019). Microcins in *Enterobacteriaceae*: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02261>

- Barría, C., Singer, R. S., Bueno, I., Estrada, E., Rivera, D., Ulloa, S., Fernández, J., Mardones, F. O., & Moreno-Switt, A. I. (2020). Tracing *Listeria monocytogenes* contamination in artisanal cheese to the processing environments in cheese producers in southern Chile. *Food Microbiology*, *90*, 103499. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103499>
- Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K., & Gannon, F. (1991). The 16s/23s ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *Genome Research*, *1*(1), 51–56. <https://doi.org/10.1101/gr.1.1.51>
- Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J.-M., & Haertlé, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(4), 837–848. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02966.x>
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kaur, S., Kohli, R. K., & Yadav, S. S. (2008). Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology*, *165*(3), 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.003>
- Bedassa, A., Nahusenay, H., Asefa, Z., Sisay, T., Girmay, G., Kovac, J., Vipham, J. L., & Zewdu, A. (2023). Prevalence and associated risk factors for *Salmonella enterica* contamination of cow milk and cottage cheese in Ethiopia. *Food Safety and Risk*, *10*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40550-023-00101-3>
- Bellassi, P., Rocchetti, G., Nocetti, M., Lucini, L., Masoero, F., & Morelli, L. (2021). A combined metabolomic and metagenomic approach to discriminate raw milk for the production of hard cheese. *Foods*, *10*, 109. <https://doi.org/10.3390/foods10010109>
- Bennett, S. (2004). Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, *5*(4), 433–438. <https://doi.org/10.1517/14622416.5.4.433>
- Bertuzzi, A. S., McSweeney, P. L. H., Rea, M. C., & Kilcawley, K. N. (2018). Detection of volatile compounds of cheese and their contribution to the flavor profile of surface-ripened cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(2), 371–390. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12332>
- Bertuzzi, A. S., Walsh, A. M., Sheehan, J. J., Cotter, P. D., Crispie, F., McSweeney, P. L. H., Kilcawley, K. N., & Rea, M. C. (2018). Omics-based insights into flavor development and microbial succession within surface-ripened cheese. *mSystems*, *3*(1), e00211-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00211-17>
- Bettera, L., Dreier, M., Schmidt, R. S., Gatti, M., Berthoud, H., & Bachmann, H.-P. (2023). Selective enrichment of the raw milk microbiota in cheese production:

Concept of a natural adjunct milk culture. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1154508. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1154508>

Bik, H. M., Porazinska, D. L., Creer, S., Caporaso, J. G., Knight, R., & Thomas, W. K. (2012). Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(4), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.11.010>

Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11691. <https://doi.org/10.3390/ijms222111691>

Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, 7(4), 447–470. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2021027>

Blin, K., Shaw, S., Augustijn, H. E., Reitz, Z. L., Biermann, F., Alanjary, M., Fetter, A., Terlouw, B. R., Metcalf, W. W., Helfrich, E. J. N., van Wezel, G. P., Medema, M. H., & Weber, T. (2023). antiSMASH 7.0: New and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W46–W50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad344>

Bockelmann, W., & Hoppe-Seyler, T. (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal*, 11, 307–314. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00060-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00060-7)

Bockelmann, W., Krusch, U., Engel, G., Klijn, N., Smit, G., & Heller, K. J. (1997). The microflora of Tilsit cheese. Part 1. Variability of the smear flora. *Food / Nahrung*, 41(4), 208–212. <https://doi.org/10.1002/food.19970410405>

Bodinaku, I., Shaffer, J., Connors, A. B., Steenwyk, J. L., Biango-Daniels, M. N., Kastman, E. K., Rokas, A., Robbat, A., & Wolfe, B. E. (2019). Rapid phenotypic and metabolomic domestication of wild *Penicillium* molds on cheese. *mBio*, 10(5), e02445-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02445-19>

Boor, K. J., Wiedmann, M., Murphy, S., & Alcaine, S. (2017). A 100-Year Review: microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9933–9951. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>

Borges, F., Briandet, R., Callon, C., Champomier-Vergès, M.-C., Christeians, S., Chuzeville, S., Denis, C., Desmasures, N., Desmonts, M.-H., Feurer, C., Leroi, F., Leroy, S., Mounier, J., Passerini, D., Pilet, M.-F., Schlüsselhuber, M., Stahl, V., Strub, C., Talon, R., & Zagorec, M. (2022). Contribution of omics to biopreservation: Toward food microbiome engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13, 951182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.951182>

- Bourdichon, F., Arias, E., Babuchowski, A., Bückle, A., Bello, F. D., Dubois, A., Fontana, A., Fritz, D., Kemperman, R., Laulund, S., McAuliffe, O., Miks, M. H., Papademas, P., Patrone, V., Sharma, D. K., Sliwinski, E., Stanton, C., Von Ah, U., Yao, S., & Morelli, L. (2021). The forgotten role of food cultures. *FEMS Microbiology Letters*, *368*(14), fnab085. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085>
- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2017). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, *20*(4), 1125–1136. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Bremer, P., Flint, S., Brooks, J., & Palmer, J. (2015). Introduction to biofilms. In *Biofilms in the Dairy Industry* (pp. 1–16). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118876282.ch1>
- Brennan, N. M., Ward, A. C., Beresford, T. P., Fox, P. F., Goodfellow, M., & Cogan, T. M. (2002). Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(2), 820–830. <https://doi.org/10.1128/aem.68.2.820-830.2002>
- Broome, M. C., Powell, I., & Limsowtin, G. K. Y. (2011). Starter cultures: Specific properties. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, *1*, 269–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00067-4>
- Brown, S. R. B., Forauer, E. C., & D'Amico, D. J. (2018). Effect of modified atmosphere packaging on the growth of spoilage microorganisms and *Listeria monocytogenes* on fresh cheese. *Journal of Dairy Science*, *101*(9), 7768–7779. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14217>
- Brul, S., & Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, *50*(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00072-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00072-0)
- Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clinics in Laboratory Medicine*, *35*(2), 247–272. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.004>
- Buehler, A. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018a). Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 10759–10774. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15082>
- Buehler, A. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2018b). Psychrotolerant spore-former growth characterization for the development of a dairy spoilage predictive model. *Journal of Dairy Science*, *101*(8), 6964–6981. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14501>

- Büyüksırt Bedir, T., & Kuleaşan, H. (2021). A natural approach, the use of killer toxin produced by *Metschnikowia pulcherrima* in fresh ground beef patties for shelf life extension. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109154>
- Büyüksırt-Bedir, T., & Kuleaşan, H. (2022). Purification and characterization of a *Metschnikowia pulcherrima* killer toxin with antagonistic activity against pathogenic microorganisms. *Archives of Microbiology*, 204(6), 337. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02940-8>
- Buzzini, P., Turchetti, B., & Vaughan-Martini, A. E. (2007). The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: The state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Research*, 7(6), 749–760. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00238.x>
- Cabral, E. M., Oliveira, M., Mondala, J. R. M., Curtin, J., Tiwari, B. K., & Garcia-Vaquero, M. (2021). Antimicrobials from seaweeds for food applications. *Marine Drugs*, 19(4), 211. <https://doi.org/10.3390/md19040211>
- Callon, C., Rétureau, E., Didienne, R., & Montel, M.-C. (2014). Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.003>
- Câmara, S., Dapkevicius, A., Riquelme, C., Elias, R., Silva, C., Malcata, F., & Dapkevicius, M. (2019). Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. *Food Science and Technology International*, 25(4), 303–317. <https://doi.org/10.1177/1082013218823129>
- Carafa, I., Stocco, G., Franceschi, P., Summer, A., Tuohy, K. M., Bittante, G., & Franciosi, E. (2019). Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter and non-starter cultures for the production of Traditional Mountain cheese. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 115, 209–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.069>
- Cardin, M., Cardazzo, B., Mounier, J., Novelli, E., Coton, M., & Coton, E. (2022). Authenticity and typicity of traditional cheeses: a review on geographical origin authentication methods. *Foods*, 11(21), 3379. <https://doi.org/10.3390/foods11213379>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370. <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>
- Cavera, V. L., Arthur, T. D., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2015). Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *International Journal*

of *Antimicrobial Agents*, 46(5), 494–501.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.07.011>

Cebrián, E., Núñez, F., Gálvez, F. J., Delgado, J., Bermúdez, E., & Rodríguez, M. (2020). Selection and evaluation of *Staphylococcus xylosus* as a biocontrol agent against toxigenic moulds in a dry-cured ham model system. *Microorganisms*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060793>

Ceugniz, A. (2017). *Recherche de levures antagonistes, à potentiel probiotique, dans les produits du Terroir du Nord-Pas-de-Calais: Étude de Kluyveromyces marxianus et K. lactis, isolées d'un fromage artisanal, la Tomme d'Orchies* [These de doctorat, Lille 1]. <https://www.theses.fr/2017LIL10035>

Ceugniz, A., Coucheney, F., Jacques, P., Daube, G., Delcenserie, V., & Drider, D. (2017). Anti-*Salmonella* activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. *Research in Microbiology*, 168(6), 575–582. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.03.004>

Ceugniz, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, 52, 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>

Ceugniz, A., Taminiou, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017a). Fungal diversity of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process as revealed by a metagenomic study. *International Journal of Food Microbiology*, 258, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.015>

Ceugniz, A., Taminiou, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., & Drider, D. (2017b). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d'Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034>

Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., & Colombo, A. L. (2008). Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia*, 166(3), 121–132. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9136-x>

Chagas-Neto, T. C., Chaves, G. M., Melo, A. S. A., & Colombo, A. L. (2009). Bloodstream infections due to *Trichosporon* spp.: Species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1074–1081. <https://doi.org/10.1128/JCM.01614-08>

- Chaitankar, V., Karakülah, G., Ratnapriya, R., Giuste, F. O., Brooks, M. J., & Swaroop, A. (2016). Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Progress in Retinal and Eye Research*, *55*, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.06.001>
- Chen, L., Wu, J., Li, Z., Liu, Q., Zhao, X., & Yang, H. (2019). Metabolomic analysis of energy regulated germination and sprouting of organic mung bean (*Vigna radiata*) using NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, *286*, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.183>
- Chen, P.-H., & Chou, J.-Y. (2017). Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Polish Journal of Microbiology*, *66*(1). <https://doi.org/10.5604/17331331.1234997>
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, *12*(1), 547–569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- Chiu, Y.-S., Tzean, Y., Chen, Y.-H., Tsai, C.-W., & Yeh, H.-H. (2021). Fungal F8-Culture filtrate induces tomato resistance against tomato yellow leaf curl thailand Virus. *Viruses*, *13*(8), 1434. <https://doi.org/10.3390/v13081434>
- Choi, J., Lee, S. I., Rackerby, B., Goddik, L., Frojen, R., Ha, S.-D., Kim, J. H., & Park, S. H. (2020). Microbial communities of a variety of cheeses and comparison between core and rind region of cheeses. *Journal of Dairy Science*, *103*(5), 4026–4042. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17455>
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., & Håvarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *Journal of Bacteriology*, *180*(8), 1988–1994.
- Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: A novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, *5*(10), 661–669. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00310.x>
- Cogan, T. M. (2011). Cheese | Public Health Aspects. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 645–651). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00078-9>
- Cogan, T. M., Goerges, S., Gelsomino, R., Larpin, S., Hohenegger, M., Bora, N., Jamet, E., Rea, M. C., Mounier, J., Vancanneyt, M., Guéguen, M., Desmasures, N., Swings, J., Goodfellow, M., Ward, A. C., Sebastiani, H., Irlinger, F., Chamba, J.-F., Beduhn, R., & Scherer, S. (2014). Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen Cheeses.



- Colombo, A. L., Padovan, A. C. B., & Chaves, G. M. (2011). Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 682–700. <https://doi.org/10.1128/CMR.00003-11>
- Comitini, F., Canonico, L., Agarbati, A., & Ciani, M. (2023). Biocontrol and probiotic function of non-*Saccharomyces* yeasts: new insights in agri-food industry. *Microorganisms*, 11(6), 1450. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061450>
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Cordeiro, R. de A., Aguiar, A. L. R., da Silva, B. N., Pereira, L. M. G., Portela, F. V. M., de Camargo, Z. P., de Lima-Neto, R. G., Castelo-Branco, D. de S. C. M., Rocha, M. F. G., & Sidrim, J. J. C. (2021). *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 645812. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.645812>
- Correa, F. T., de Souza, A. C., de Souza Júnior, E. A., Isidoro, S. R., Piccoli, R. H., Dias, D. R., & de Abreu, L. R. (2019). Effect of Brazilian green propolis on microorganism contaminants of surface of Gorgonzola-type cheese. *Journal of Food Science and Technology*, 56(4), 1978–1987. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03664-2>
- Corsetti, A., Rossi, J., & Gobetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1–2), 1–10. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00567-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00567-0)
- Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P. E., & Cintas, L. M. (2006). Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by *Enterococcus faecium* L50. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7634–7643. <https://doi.org/10.1128/AEM.00983-06>
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013a). Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica*, 58(4), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0209-3>
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013b). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>

- Damerow, G. (1970). Bactofuge and its uses in the dairy industry. *Deutsche Milchwirtschaft*, 21(20), 832–837.
- Dannemiller, K. C., Mendell, M. J., Macher, J. M., Kumagai, K., Bradman, A., Holland, N., Harley, K., Eskenazi, B., & Peccia, J. (2014). Next-generation DNA sequencing reveals that low fungal diversity in house dust is associated with childhood asthma development. *Indoor Air*, 24(3), 236–247.
- de Abreu, V. A. C., Perdigão, J., & Almeida, S. (2020). Metagenomic Approaches to analyze antimicrobial resistance: an overview. *Frontiers in Genetics*, 11, 575592. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.575592>
- de Almeida Júnior, J. N., & Hennequin, C. (2016). Invasive *Trichosporon* infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1629. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01629>
- de Araújo, V. G., de Oliveira Arruda, M. D., Dantas Duarte, F. N., de Sousa, J. M. B., da Costa Lima, M., da Conceição, M. L., Schaffner, D. W., & de Souza, E. L. (2017). Predicting and modelling the growth of potentially pathogenic bacteria in coalho cheese. *Journal of Food Protection*, 80(7), 1172–1181. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-523>
- De Respinis, S., Caminada, A., Pianta, E., Buetti-Dinh, A., Riva Scettrini, P., Petrini, L., Tonolla, M., & Petrini, O. (2023). Fungal communities on alpine cheese rinds in Southern Switzerland. *Botanical Studies*, 64(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40529-023-00371-2>
- Deetae, P., Bonnarne, P., Spinnler, H. E., & Helinck, S. (2007). Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(5), 1161–1171. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1095-5>
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011a). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 247–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.029>
- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., & Daube, G. (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6046–6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225>
- Delgado, J., Álvarez, M., Cebrián, E., Martín, I., Roncero, E., & Rodríguez, M. (2023). Biocontrol of pathogen microorganisms in ripened foods of animal origin. *Microorganisms*, 11(6), 1578. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061578>

- Denis, C., & Irlinger, F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, *126*(3), 311–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.018>
- Denkovskienė, E., Paškevičius, Š., Misiūnas, A., Stočkūnaitė, B., Starkevič, U., Vitkauskienė, A., Hahn-Löbmann, S., Schulz, S., Giritch, A., Gleba, Y., & Ražanskienė, A. (2019). Broad and efficient control of *Klebsiella* pathogens by peptidoglycan-degrading and pore-forming bacteriocins klebicins. *Scientific Reports*, *9*, 15422. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51969-1>
- Di Bonaventura, G., Pompilio, A., Picciani, C., Iezzi, M., D'Antonio, D., & Piccolomini, R. (2006). Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(10), 3269–3276. <https://doi.org/10.1128/AAC.00556-06>
- Di Minno, A., Gelzo, M., Stornaiuolo, M., Ruoppolo, M., & Castaldo, G. (2021). The evolving landscape of untargeted metabolomics. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *31*(6), 1645–1652. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.01.008>
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, *79*, 103998. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>
- Dos Santos Rosario, A. I. L., da Silva Mutz, Y., Castro, V. S., da Silva, M. C. A., Conte-Junior, C. A., & da Costa, M. P. (2021). Everybody loves cheese: Crosslink between persistence and virulence of Shiga-toxin *Escherichia coli*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *61*(11), 1877–1899. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767033>
- Dufossé, L., & de Echanove, M. C. (2005). The last step in the biosynthesis of aryl carotenoids in the cheese ripening bacteria *Brevibacterium linens* ATCC 9175 (*Brevibacterium aurantiacum* sp. Nov.) involves a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Food Research International*, *38*(8), 967–973. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.017>
- Dugat-Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou, A.-S., Bonnarme, P., & Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, *238*, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>
- Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., & Bonnarme, P. (2015). Overview of a surface-ripened cheese community

- functioning by meta-omics analyses. *PLOS ONE*, *10*(4), e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>
- Duru, I. C., Laine, P., Andreevskaya, M., Paulin, L., Kananen, S., Tynkkynen, S., Auvinen, P., & Smolander, O.-P. (2018). Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *International Journal of Food Microbiology*, *281*, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.017>
- Dutta, T. K., & Harayama, S. (2001). Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *Environmental Science & Technology*, *35*(1), 102–107. <https://doi.org/10.1021/es001165a>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcilli, P. S., Fernández Escámez, P. S., ... Herman, L. (2020). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. *EFSA Journal. European Food Safety Authority*, *18*(7), e06174. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6174>
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *34*(8), 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>
- Essghaier, B., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Hajlaoui, M. R., Boudabous, A., Jijakli, H., & Sadfi-Zouaoui, N. (2009). Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(3), 833–846. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04053.x>
- Falk, R., Wolf, D. G., Shapiro, M., & Polacheck, I. (2003). Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* isolates are susceptible to voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(2), 911. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.911.2003>
- Feng, D., Zhang, A., Yang, Y., & Yang, P. (2020). Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. *Archiv Der Pharmazie*, *353*(6), e1900380. <https://doi.org/10.1002/ardp.201900380>
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G., & Fliss, I. (2017). Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control*, *78*, 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.007>

- Ferraretto, L. F., Shaver, R. D., & Bertics, S. J. (2012). Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 4017–4028. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5190>
- Ferrocino, I., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2022). Investigating dairy microbiome: An opportunity to ensure quality, safety and typicity. *Current Opinion in Biotechnology*, *73*, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.08.009>
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. e., Glaser, P., & Vallaey, T. (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(3), 546–556. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x>
- Ficetola, G. F., Taberlet, P., & Coissac, E. (2016). How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources*, *16*(3), 604–607. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12508>
- Field, D., Fernandez de Ullivarri, M., Ross, R. P., & Hill, C. (2023). After a century of nisin research—Where are we now? *FEMS Microbiology Reviews*, *47*(3), fuad023. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad023>
- Filonow, A. B., Vishniac, H. S., Anderson, J. A., & Janisiewicz, W. J. (1996). Biological Control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. *Biological Control*, *7*(2), 212–220. <https://doi.org/10.1006/bcon.1996.0086>
- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., & De Vuyst, L. (2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, *106*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- Fox, P. F. (2011). Introduction | history of dairy products and processes. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (pp. 12–17). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00541-0>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. H. (2017). Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. In P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 681–713). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_19)
- Fox, P. F., McGuffey, R. K., Shirley, J. E., & Cogan, T. M. (2011). INTRODUCTION | History of dairy science and technology. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)* (p. 1). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00537-9>

- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M., & Guinee, T. P. (2004). Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 1: *General Aspects*. Elsevier.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: Mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast (Chichester, England)*, *36*(3), 129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
- Fukasawa, Y., Ermini, L., Wang, H., Carty, K., & Cheung, M.-S. (2020). LongQC: A Quality Control Tool for Third Generation Sequencing Long Read Data. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *10*(4), 1193–1196. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400864>
- Gan, H. H., Yan, B., Linforth, R. S. T., & Fisk, I. D. (2016). Development and validation of an APCI-MS/GC–MS approach for the classification and prediction of Cheddar cheese maturity. *Food Chemistry*, *190*, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.096>
- Ganz, K., Yamamoto, E., Hardie, K., Hum, C., Hussein, H., Locas, A., & Steele, M. (2020). Microbial safety of cheese in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, *321*, 108521. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108521>
- Garmasheva, I. L., & Oleschenko, L. T. (2023). Screening of bacteriocin-producing dairy *Enterococcus* strains using low-cost culture media. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1168835. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168835>
- Garnier, L., Valence, F., & Mounier, J. (2017). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update. *Microorganisms*, *5*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030042>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017a). 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>
- Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017b). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
- Gaucheron, F., Le Graet, Y., Raulot, K., & Piot, M. (1997). Physicochemical characterization of iron-supplemented skim milk. *International Dairy Journal*, *7*(2), 141–148. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(96\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(96)00054-4)

- Geraldino, B. R., Nunes, R. F. N., Gomes, J. B., da Poça, K. S., Giardini, I., Silva, P. V. B., Souza, H. P., Otero, U. B., & Sarpa, M. (2021). Evaluation of exposure to toluene and xylene in gasoline station workers. *Advances in Preventive Medicine*, *2021*, 5553633. <https://doi.org/10.1155/2021/5553633>
- Gerez, C., Torino, M., Rollán, G., & Font de Valdez, G. (2009). Prevention of bread mould spoilage using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*, *20*, 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.03.005>
- Geronikou, A., Srimahaeak, T., Rantsiou, K., Triantafyllidis, G., Larsen, N., & Jespersen, L. (2020). Occurrence of yeasts in white-brined cheeses: methodologies for identification, spoilage potential and good manufacturing practices. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 582778. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>
- Gésan-Guiziu, G. (2010). 15—Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. In M. W. Griffiths (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk* (pp. 349–372). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845699420.4.349>
- Giraffa, G. (2002). *Enterococci* from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, *26*(2), 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00608.x>
- Giraffa, G. (2003). Functionality of *enterococci* in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, *88*(2–3), 215–222. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00183-1)
- Giraffa, G., Carminati, D., & Neviani, E. (1997). *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. *Journal of Food Protection*, *60*(6), 732–737. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.6.732>
- Giuffrida, D., Monnet, C., Laurent, F., Cacciola, F., Oteri, M., Le Piver, M., Caro, Y., Donato, P., Mondello, L., Roueyre, D., & Dufossé, L. (2020). Carotenoids from the ripening bacterium *Brevibacterium linens* impart color to the rind of the French cheese, Fourme de Montbrison (PDO). *Natural Product Research*, *34*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1622107>
- Giuliano, G., Rosati, C., & Bramley, P. M. (2003). To dye or not to dye: Biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnology*, *21*(12), 513–516. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.001>
- Gkatzionis, K., Yunita, D., Linforth, R. S. T., Dickinson, M., & Dodd, C. E. R. (2014). Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *177*, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016>

- Golubev, W. I., Pfeiffer, I., & Golubeva, E. (2002). Mycocin production in *Trichosporon pullulans* populations colonizing tree exudates in the spring. *FEMS Microbiology Ecology*, *40*(2), 151–157. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00947.x>
- Gómez-Torres, N., Ávila, M., Delgado, D., & Garde, S. (2016). Effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol on the volatile fraction, odour and aroma of semi-hard ewe milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *232*, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.031>
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., Batista-Viera, F., & Brena, B. M. (2011). A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, *46*(1), 385–389.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews. Genetics*, *17*(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gori, K., Ryssel, M., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2013). Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microbial Ecology*, *65*(3), 602–615. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0138-3>
- Gori, K., Sørensen, L. M., Petersen, M. A., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2012). *Debaryomyces hansenii* strains differ in their production of flavor compounds in a cheese-surface model. *MicrobiologyOpen*, *1*(2), 161–168. <https://doi.org/10.1002/mbo3.11>
- Graham, K., Stack, H., & Rea, R. (2020). Safety, beneficial and technological properties of *enterococci* for use in functional food applications—A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(22), 3836–3861. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1709800>
- Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., & Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(12), 22706–22727. <https://doi.org/10.3390/ijms151222706>
- Gruden, Š., & Poklar Ulrih, N. (2021). Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20), 11264. <https://doi.org/10.3390/ijms222011264>
- Gruetzmacher, T. J., & Bradley, R. L. (1999). Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk. *Journal of Food Protection*, *62*(6), 625–631. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-62.6.625>



- Guého, E., de Hoog, G. S., & Smith, M. T. (1992). Neotypification of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *61*(4), 285–288. <https://doi.org/10.1007/BF00713937>
- Guého, E., Smith, M. T., de Hoog, G. S., Billon-Grand, G., Christen, R., & Batenburg-van der Vegte, W. H. (1992). Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *61*(4), 289–316. <https://doi.org/10.1007/BF00713938>
- Gurtler, J. B., Harlee, N. A., Smelser, A. M., & Schneider, K. R. (2018). *Salmonella enterica* contamination of market fresh tomatoes: A review. *Journal of Food Protection*, *81*(7), 1193–1213. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-395>
- Habbu, P., Warad, V., Shastri, R., Madagundi, S., & Kulkarni, V. H. (2016). Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *14*(2), 101–116. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(16\)60003-1](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(16)60003-1)
- Hakimzadeh, A., Abdala Asbun, A., Albanese, D., Bernard, M., Buchner, D., Callahan, B., Caporaso, J. G., Curd, E., Djemiel, C., Brandström Durling, M., Elbrecht, V., Gold, Z., Gweon, H. S., Hajibabaei, M., Hildebrand, F., Mikryukov, V., Normandeau, E., Özkurt, E., M. Palmer, J., ... Anslan, S. (n.d.). A pile of pipelines: An overview of the bioinformatics software for metabarcoding data analyses. *Molecular Ecology Resources*, *n/a*(n/a). <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13847>
- Han, J. W., Choi, G. J., & Kim, B. S. (2018). Antimicrobial aromatic polyketides: A review of their antimicrobial properties and potential use in plant disease control. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *34*(11), 163. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2546-0>
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The Genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, *5*(10), R245-249. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90108-9)
- Hatoum, R. (2013). *Levures laitières à activité antimicrobienne: Une nouvelle génération de cultures protectrices et de probiotiques*. <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/24261>
- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*, *3*, 421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>

- Hatoum, R., Labrie, S., & Fliss, I. (2013). Identification and partial characterization of antilisterial compounds produced by dairy yeasts. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 5(1), 8–17. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9109-8>
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., & Jany, J.-L. (2012). Molecular systematics in the genus *Mucor* with special regards to species encountered in cheese. *Fungal Biology*, 116(6), 692–705. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.04.002>
- Hernández, A., Rodríguez, A., Córdoba, M. G., Martín, A., & Ruiz-Moyano, S. (2022). Fungal control in foods through biopreservation. *Current Opinion in Food Science*, 47, 100904. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2022.100904>
- Herrero-Fresno, A., & Olsen, J. E. (2018). *Salmonella Typhimurium* metabolism affects virulence in the host—A mini-review. *Food Microbiology*, 71, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>
- Hickey, D. K., Kilcawley, K. N., Beresford, T. P., & Wilkinson, M. G. (2006). Starter bacteria are the prime agents of lipolysis in cheddar cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8229–8235. <https://doi.org/10.1021/jf060819h>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Huang, C., Zhang, L., Johansen, P. G., Petersen, M. A., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2021). *Debaryomyces hansenii* strains isolated from danish cheese brines act as biocontrol agents to inhibit germination and growth of contaminating molds. *Frontiers in Microbiology*, 12, 662785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.662785>
- Huang, X., Zhang, X., Feng, F., & Xu, X. (2016). Biodegradation of tetracycline by the yeast strain *Trichosporon mycotoxinivorans* XPY-10. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(1), 15–22. <https://doi.org/10.1080/10826068.2014.970692>
- Ider, S., Belguesmia, Y., Cazals, G., Boukherroub, R., Coucheney, F., Kihal, M., Enjalbal, C., & Drider, D. (2020a). The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*. *Food Bioscience*, 36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100670>

- Ider, S., Belguesmia, Y., Cazals, G., Boukherroub, R., Coucheney, F., Kihal, M., Enjalbal, C., & Drider, D. (2020b). The antimicrobial peptide oranicin P16 isolated from *Trichosporon asahii* ICVY021, found in camel milk's, inhibits *Kocuria rhizophila*. *Food Bioscience*, *36*, 100670. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100670>
- Ider, S., Belguesmia, Y., Coucheney, F., Kihal, M., & Drider, D. (2019). Impact of seasonality and environmental conditions on yeast diversity from camel's milk collected in Algeria. *Archives of Microbiology*, *201*(3), 399–407. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01626-y>
- Ikryannikova, L. N., Kurbatov, L. K., Gorokhovets, N. V., & Zamyatnin, A. A. (2020). Contact-dependent growth inhibition in bacteria: do not get too close! *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21217990>
- Inglin, R. C., Stevens, M. J. A., Meile, L., Lacroix, C., & Meile, L. (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, *114*, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.04.011>
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., & Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: Diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters*, *362*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu015>
- Irlinger, F., & Monnet, C. (2021). Temporal differences in microbial composition of Époisses cheese rinds during ripening and storage. *Journal of Dairy Science*, *104*(7), 7500–7508. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20123>
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: Implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(2), 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.02.016>
- Iturrieta-González, I. A., Padovan, A. C. B., Bizerra, F. C., Hahn, R. C., & Colombo, A. L. (2014). Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. *PLoS One*, *9*(10), e109553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109553>
- Janakiev, T., Berić, T., Stević, T., Stanković, S., Bačić, J., Majstorović, H., Fira, D., & Dimkić, I. (2022). The microbiome of the 'Williams' pear variety grown in the organic orchard and antifungal activity by the autochthonous bacterial and yeast isolates. *Microorganisms*, *10*(7), 1282. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071282>

- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(3), 491–511. <https://doi.org/10.1128/CMR.00056-05>
- Jingkai, J., Jianming, Z., Zhenmin, L., & Huaxi, Y. (2020). Dynamic changes of microbiota and texture properties during the ripening of traditionally prepared cheese of China. *Archives of Microbiology*, *202*(8), 2059–2069. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01921-z>
- Johnson, M. E. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 9952–9965. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12979>
- Jurado, M., & Vicente, C. J. (2020). *Penicillium commune* affects textural properties and water distribution of hard and extra-hard cheeses. *The Journal of Dairy Research*, *87*(1), 117–122. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000906>
- Kamilari, E., Tsalas, D., Stanton, C., & Ross, R. P. (2022). Metataxonomic mapping of the microbial diversity of irish and eastern mediterranean cheeses. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(16), 2483. <https://doi.org/10.3390/foods11162483>
- Kasimin, M. E., Shamsuddin, S., Molujin, A. M., Sabullah, M. K., Gansau, J. A., & Jawan, R. (2022). Enterocin: promising biopreservative produced by *Enterococcus* sp. *Microorganisms*, *10*(4), 684. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040684>
- Katerinopoulou, K., Kontogeorgos, A., Salmas, C. E., Patakas, A., & Ladavos, A. (2020). Geographical Origin Authentication of agri-food products:  $\alpha$  review. *Foods (Basel, Switzerland)*, *9*(4), 489. <https://doi.org/10.3390/foods9040489>
- Khan, H., Flint, S., & Yu, P.-L. (2010). Enterocins in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *141*(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.005>
- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of milk and dairy products: A comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, *18*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12944-019-0969-8>
- Khatab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., & Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
- Kindstedt, P. (2012). *Cheese and Culture: A History of Cheese and Its Place in Western Civilization*. Chelsea Green Publishing.

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Knight, G. (2015). Biofilm Control in dairy manufacturing plants. In *Biofilms in the Dairy Industry* (pp. 229–251). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118876282.ch12>
- Korena, K., Krzyzankova, M., Florianova, M., Karasova, D., Babak, V., Strakova, N., & Juricova, H. (2023). Microbial succession in the cheese ripening process-competition of the starter cultures and the microbiota of the cheese plant environment. *Microorganisms*, *11*(7), 1735. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071735>
- Kregiel, D., Czarnecka-Chrebelska, K. H., Schusterová, H., Vadkertiová, R., & Nowak, A. (2023). The *Metschnikowia pulcherrima* clade as a model for assessing inhibition of *Candida* spp. and the toxicity of its metabolite, pulcherrimin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *28*(13), 5064. <https://doi.org/10.3390/molecules28135064>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 2761–2762. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800476105>
- Kumar, K. R., Cowley, M. J., & Davis, R. L. (2019). Next-Generation Sequencing and emerging technologies. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, *45*(7), 661–673. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1688446>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *128*, 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.002>
- Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J., & Karpíšková, R. (2017). Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(10), 188. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2354-y>
- Ladjouzi, R., Dussert, E., Teiar, R., Belguesmia, Y., & Drider, D. (2023). A Review on Enterocin DD14, the leaderless two-peptide bacteriocin with multiple biological

- functions and unusual transport pathway. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1188. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071188>
- Larsen, N., Moslehi-Jenabian, S., Werner, B. B., Jensen, M. L., Garrigues, C., Vogensen, F. K., & Jespersen, L. (2016). Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.002>
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology*, 92(5), 455–468. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0051-4>
- Lee, E., & Anjum, F. (2023). *Staphylococcus epidermidis*. *StatPearls* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/>
- Lee, J. W., Melcher, G. A., Rinaldi, M. G., Pizzo, P. A., & Walsh, T. J. (1990). Patterns of morphologic variation among isolates of *Trichosporon beigeli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(12), 2823–2827. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.12.2823-2827.1990>
- Lessard, M.-H. (2014). *Le suivi de la croissance et de l'activité spécifique des mycètes pendant l'affinage du Camembert*. <https://corpus.ulaval.ca/jspui/handle/20.500.11794/25102>
- Lessard, M.-H., Bélanger, G., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2012). The composition of camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6), 1813–1819. <https://doi.org/10.1128/AEM.06645-11>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.-B., Valence, F., Coton, E., & Thierry, A. (2019). Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. *Food Chemistry*, 301, 125260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation-a review. *Microorganisms*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Li, H., Guo, M., Wang, C., Li, Y., Fernandez, A. M., Ferraro, T. N., Yang, R., & Chen, Y. (2020). Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiology and Infection*, 148, e169. <https://doi.org/10.1017/S0950268820001624>

- Li, H., Wang, C., Chen, Y., Zhang, S., & Yang, R. (2017). Integrated transcriptomic analysis of *Trichosporon asahii* uncovers the core genes and pathways of fluconazole resistance. *Scientific Reports*, 7(1), 17847. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18072-9>
- Li, S., Li, Y., Du, Z., Li, B., Liu, Y., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, K., Wang, Q., Lu, S., Dong, J., Ji, H., & Li, Y. (2021). Impact of NSLAB on Kazakh cheese flavor. *Food Research International*, 144, 110315. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110315>
- Lin, T.-H., & Pan, T.-M. (2019). Characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus plantarum* NTU 102. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 52(3), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.08.003>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- Liu, S., Wang, H., Leigh, D., Cram, D. S., Wang, L., & Yao, Y. (2021). Third-generation sequencing: Any future opportunities for PGT? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(2), 357–364. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02009-9>
- Liu, Y.-X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00724-8>
- Lo, S. C., Xie, Z.-R., & Chang, K. Y. (2020). Structural and functional enrichment analyses for antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228783>
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2010). Evolution of the aroma composition of wines supplemented with grape precursors from different varieties during accelerated wine ageing. *Food Chemistry*, 120, 205–216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.008>
- Lucas-Elío, P., Gómez, D., Solano, F., & Sanchez-Amat, A. (2006). The antimicrobial activity of marinocine, synthesized by *Marinomonas mediterranea*, is due to hydrogen peroxide generated by its lysine oxidase activity. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2493–2501. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2493-2501.2006>
- Lucas-Elio, P., Hernandez, P., Sanchez-Amat, A., & Solano, F. (2005). Purification and partial characterization of marinocine, a new broad-spectrum antibacterial protein produced by *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1721(1–3), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.11.002>

- Ma, X., Meng, L., Zhang, H., Zhou, L., Yue, J., Zhu, H., & Yao, R. (2020). Sophorolipid biosynthesis and production from diverse hydrophilic and hydrophobic carbon substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(1), 77–100. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10247-w>
- Ma, X., Yang, W., Yang, A., Chen, D., Wang, C., Ling, S., Cao, S., Zuo, Z., Wang, Y., Zhong, Z., Peng, G., He, M., & Gu, Y. (2023). Metabolome and transcriptome combinatory profiling reveals fluconazole resistance mechanisms of *Trichosporon asahii* and the role of farnesol in fluconazole tolerance. *Microorganisms*, *11*(11), 2798. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112798>
- Ma, Y., Wu, M., Qin, X., Dong, Q., & Li, Z. (2023). Antimicrobial function of yeast against pathogenic and spoilage microorganisms via either antagonism or encapsulation: A review. *Food Microbiology*, *112*, 104242. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104242>
- Magangana, T. P., Makunga, N. P., Fawole, O. A., Stander, M. A., & Opara, U. L. (2022). Antioxidant, antimicrobial, and metabolomic characterization of blanched pomegranate peel extracts: effect of cultivar. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *27*(9), 2979. <https://doi.org/10.3390/molecules27092979>
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., Vargas, C. de, & Dunthorn, M. (2014). Swarm: Robust and fast clustering method for amplicon-based studies. *PeerJ*, *2*, e593. <https://doi.org/10.7717/peerj.593>
- Makki, G. M., Kozak, S. M., Jencarelli, K. G., & Alcaine, S. D. (2020). Evaluation of the efficacy of commercial protective cultures against mold and yeast in queso fresco. *Journal of Dairy Science*, *103*(11), 9946–9957. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18769>
- Malmsten, M. (2014). Antimicrobial peptides. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, *119*(2), 199–204. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.899278>
- Manso, T., Vero, S., González, M. B., & Nunes, C. (2010). Study of modes of action of the biocontrol agent *Metschnikowia* and auensis pbc-2. *Environmentally Friendly and Safe Technologies for Quality of Fruit and Vegetables*, 144–150.
- Mao, H., Mao, H., Wang, J. K., Liu, J. X., & Yoon, I. (2013). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on in vitro fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets1. *Journal of Animal Science*, *91*(7), 3291–3298. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5851>
- Marcellino O S B, S. N., & Benson, D. R. (2013). The Good, the bad, and the ugly: tales of mold-ripened cheese. *Microbiology Spectrum*, *1*(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0005-12>



- Marín, P., Ginés, C., Kochaki, P., & Jurado, M. (2017). Effects of water activity on the performance of potassium sorbate and natamycin as preservatives against cheese spoilage moulds. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, *56*(1), 85–92.
- Marín, P., Palmero, D., & Jurado, M. (2015). Occurrence of moulds associated with ovine raw milk and cheeses of the Spanish region of Castilla La Mancha. *International Journal of Dairy Technology*, *68*(4), 565–572. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12208>
- Markakiou, S., Gaspar, P., Johansen, E., Zeidan, A. A., & Neves, A. R. (2020). Harnessing the metabolic potential of *Streptococcus thermophilus* for new biotechnological applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *61*, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.019>
- Martin, N. H., Kent, D. J., Evanowski, R. L., Hrobuchak, T. J. Z., & Wiedmann, M. (2019). Bacterial spore levels in bulk tank raw milk are influenced by environmental and cow hygiene factors. *Journal of Dairy Science*, *102*(11), 9689–9701. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16304>
- Martin, N. H., Ranieri, M. L., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). Reduction of pasteurization temperature leads to lower bacterial outgrowth in pasteurized fluid milk during refrigerated storage: A case study. *Journal of Dairy Science*, *95*(1), 471–475. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4820>
- Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *Journal of Dairy Science*, *104*(2), 1251–1261. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>
- Mažeika, K., Šiliauskas, L., Skridlaitė, G., Matelis, A., Garjonytė, R., Paškevičius, A., & Melvydas, V. (2021). Features of iron accumulation at high concentration in pulcherrimin-producing *Metschnikowia* yeast biomass. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, *26*(2–3), 299–311. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01853-z>
- McCombie, W. R., McPherson, J. D., & Mardis, E. R. (2019). Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036798>
- McIntosh, J. A., Donia, M. S., & Schmidt, E. W. (2009). Ribosomal peptide natural products: Bridging the ribosomal and nonribosomal worlds. *Natural Product Reports*, *26*(4), 537–559. <https://doi.org/10.1039/b714132g>
- Medina-Córdova, N., Rosales-Mendoza, S., Hernández-Montiel, L. G., & Angulo, C. (2018). The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. *Biological Control*, *121*, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.03.002>

- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015). Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed Research International*, 2015, e473050. <https://doi.org/10.1155/2015/473050>
- Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., & Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>
- Mehta, V., Chander, J., Gulati, N., Singla, N., Vasdeva, H., Sardana, R., & Kumar Pandey, A. (2021). Epidemiological profile and antifungal susceptibility pattern of *Trichosporon* species in a tertiary care hospital in Chandigarh, India. *Current Medical Mycology*, 7(1), 19–24. <https://doi.org/10.18502/cmm.7.1.6179>
- Mehta, V., Nayyar, C., Gulati, N., Singla, N., Rai, S., & Chandar, J. (2021). A Comprehensive review of *Trichosporon* spp.: An Invasive and Emerging Fungus. *Cureus*, 13(8), e17345. <https://doi.org/10.7759/cureus.17345>
- Middelhoven, W. J., Scorzetti, G., & Fell, J. W. Y. 2004. (n.d.). Systematics of the anamorphic basidiomycetous yeast genus *Trichosporon behrend* with the description of five novel species: *Trichosporon vadense*, *T. smithiae*, *T. dehoogii*, *T. scarabaeorum* and *T. gamsii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 975–986. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02859-0>
- Millan, A. F.-S., Gamir, J., Farran, I., Larraya, L., & Veramendi, J. (2022). Identification of new antifungal metabolites produced by the yeast *Metschnikowia pulcherrima* involved in the biocontrol of postharvest plant pathogenic fungi. *Postharvest Biology and Technology*, 192, 111995. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.111995>
- Millet, L., Saubusse, M., Didienné, R., Tessier, L., & Montel, M. C. (2006). Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1), 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.004>
- Mohamed, H. M., Barzideh, Z., Siddiqi, M., & LaPointe, G. (2023). Taxonomy, sequence variance and functional profiling of the microbial community of long-ripened cheddar cheese using shotgun metagenomics. *Microorganisms*, 11(8), 2052. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082052>
- Monnet, C., Back, A., & Irlinger, F. (2012). Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3185–3192. <https://doi.org/10.1128/AEM.00085-12>

- Monnet, C., Lандаud, S., Bonnarme, P., & Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiology Letters*, 362(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Morikawa, M. (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 1–8. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.1>
- Moubasher, A.-A. H., Abdel-Sater, M. A., & Soliman, Z. S. M. (2018). Yeasts and filamentous fungi associated with some dairy products in Egypt. *Journal de Mycologie Médicale*, 28(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.003>
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Lандаud, S., & Bonnarme, P. (2017). Chapter 38—smear-ripened cheeses. In P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, & D. W. Everett (Eds.), *Cheese (Fourth Edition)* (pp. 955–996). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00038-7>
- Muccilli, S., & Restuccia, C. (2015). Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, 3(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3040588>
- Mukherjee, A., Verma, J. P., Gaurav, A. K., Chouhan, G. K., Patel, J. S., & Hesham, A. E.-L. (2020). Yeast a potential bio-agent: Future for plant growth and postharvest disease management for sustainable agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1497–1510. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10321-3>
- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128–10149. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>
- Murphy, S. I., Kent, D., Martin, N. H., Evanowski, R. L., Patel, K., Godden, S. M., & Wiedmann, M. (2019). Bedding and bedding management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6885–6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16022>
- Nájera, A. I., Nieto, S., Barron, L. J. R., & Albisu, M. (2021). A review of the preservation of hard and semi-hard cheeses: quality and safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(18), 9789. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189789>

- Nascimento, B. L., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Junges, D. S. B., Paris, A. P., Persel, C., & Gandra, R. F. (2020). Yeast mycocins: A great potential for application in health. *FEMS Yeast Research*, 20(3), foaa016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa016>
- Nhi-Cong, L. T., Mai, C. T. N., Minh, N. N., Ha, H. P., Lien, D. T., Tuan, D. V., Quyen, D. V., Ike, M., & Uyen, D. T. T. (2016). Degradation of sec-hexylbenzene and its metabolites by a biofilm-forming yeast *Trichosporon asahii* B1 isolated from oil-contaminated sediments in Quangninh coastal zone, Vietnam. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 51(3), 267–275. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1094351>
- Nikitin, D. A., Sadykova, V. S., Kuvarina, A. E., Dakh, A. G., & Biryukov, M. V. (2022). Enzymatic and antimicrobial activities in polar strains of microscopic soil fungi. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections*, 507(1), 380–393. <https://doi.org/10.1134/S0012496622060151>
- Nobrega de Almeida, J., Jimenez-Ortigosa, C., Francisco, E. C., Colombo, A. L., & Perlin, D. S. (2022). ERG11 analysis among clinical isolates of *Trichosporon asahii* with different azole susceptibility profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, e0110122. <https://doi.org/10.1128/aac.01101-22>
- Nuñez, M., Calzada, J., & Olmo, A. del. (2020). High pressure processing of cheese: Lights, shadows and prospects. *International Dairy Journal*, 100, 104558. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104558>
- Nyiew, K.-Y., Kwong, P. J., & Yow, Y.-Y. (2022). An overview of antimicrobial properties of kombucha. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1024–1053. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12892>
- Ochi, H., Bamba, T., Naito, H., Iwatsuki, K., & Fukusaki, E. (2012). Metabolic fingerprinting of hard and semi-hard natural cheeses using gas chromatography with flame ionization detector for practical sensory prediction modeling. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(5), 506–511. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.06.002>
- Ochi, H., Sakai, Y., Koishihara, H., Abe, F., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2013). Monitoring the ripening process of Cheddar cheese based on hydrophilic component profiling using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7427–7441. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6897>
- Ogunseitan, O. A. (2002). Caffeine-inducible enzyme activity in *Pseudomonas putida* ATCC 700097. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 423–428. <https://doi.org/10.1023/A:1015583316426>

- Ojala, T., Laine, P. K. S., Ahlroos, T., Tanskanen, J., Pitkänen, S., Salusjärvi, T., Kankainen, M., Tynkkynen, S., Paulin, L., & Auvinen, P. (2017). Functional genomics provides insights into the role of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* JS in cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology*, *241*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.022>
- Olm, M. R., West, P. T., Brooks, B., Firek, B. A., Baker, R., Morowitz, M. J., & Banfield, J. F. (2019). Genome-resolved metagenomics of eukaryotic populations during early colonization of premature infants and in hospital rooms. *Microbiome*, *7*, 26. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0638-1>
- Ozturkoglu-Budak, S., Wiebenga, A., Bron, P. A., & de Vries, R. P. (2016). Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *237*, 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.007>
- Padovan, A. C. B., Rocha, W. P. da S., Toti, A. C. de M., Freitas de Jesus, D. F., Chaves, G. M., & Colombo, A. L. (2019). Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. *Fungal Genetics and Biology*, *133*, 103267. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103267>
- Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Georgalaki, M., Bounenni, R., Paximadaki, A., Charmpi, C., Alexandraki, V., Kazou, M., & Tsakalidou, E. (2022). Comparison of the microbiome of artisanal homemade and industrial feta cheese through amplicon sequencing and shotgun metagenomics. *Microorganisms*, *10*(5), 1073. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051073>
- Parida, A. K., Panda, A., & Rangani, J. (2018). Chapter 5—Metabolomics-Guided elucidation of abiotic stress tolerance mechanisms in plants. In P. Ahmad, M. A. Ahanger, V. P. Singh, D. K. Tripathi, P. Alam, & M. N. Alyemeni (Eds.), *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress* (pp. 89–131). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00005-4>
- Park, S.-Y., Han, N., Kim, S.-Y., Yoo, M.-Y., Paik, H.-D., & Lim, S.-D. (2016). Evaluation of natural food preservatives in domestic and imported cheese. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*(4), 531–537. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.4.531>
- Paserakung, A., Pattarajinda, V., Vichitphan, K., & Froetschel, M. a. (2015). Selection and identification of oleaginous yeast isolated from soil, animal feed and ruminal fluid for use as feed supplement in dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*, *61*(4), 325–332. <https://doi.org/10.1111/lam.12475>

- Patel, S., & Akhtar, N. (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): The quintessential ‘offense and defense’ molecules are more than antimicrobials. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *95*, 1276–1283. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.042>
- Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, *79*(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Pawlikowska, E., James, S. A., Breierova, E., Antolak, H., & Kregiel, D. (2019). Biocontrol capability of local *Metschnikowia* sp. isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *112*(10), 1425–1445. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01272-w>
- Pei, S., Liu, T., Ren, X., Li, W., Chen, C., & Xie, Z. (2020). Benchmarking variant callers in next-generation and third-generation sequencing analysis. *Briefings in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa148>
- Pereira, P. C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*, *30*(6), 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.10.011>
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. ul, Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022). A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. *BioMed Research International*, *2022*, 3457806. <https://doi.org/10.1155/2022/3457806>
- Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K. J. (2020). Strain-Dependent cheese spoilage potential of *Clostridium tyrobutyricum*. *Microorganisms*, *8*(11), 1836. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111836>
- Polke, M., Hube, B., & Jacobsen, I. D. (2015). Chapter Three—*Candida* survival strategies. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 91, pp. 139–235). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.12.002>
- Qian, C., Martin, N. H., Wiedmann, M., & Trmčić, A. (2022). Development of a risk assessment model to predict the occurrence of late blowing defect in Gouda cheese and evaluate potential intervention strategies. *Journal of Dairy Science*, *105*(4), 2880–2894. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21206>
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(16), 5717–5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- Quigley, L., O’Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, *37*(5), 664–698. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030>

- Rai, A. K., Kumari, R., Sanjukta, S., & Sahoo, D. (2016). Production of bioactive protein hydrolysate using the yeasts isolated from soft chhurpi. *Bioresource Technology*, 219, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.129>
- Rajalaxmi, M., Beema Shafreen, R., Iyer, P. M., Sahaya Vino, R., Balamurugan, K., & Pandian, S. K. (2016). An in silico, in vitro and in vivo investigation of indole-3-carboxaldehyde identified from the seawater bacterium *Marinomonas* sp. As an anti-biofilm agent against *Vibrio cholerae* O1. *Biofouling*, 32(4), 1–12. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1154545>
- Raju, D. S., Sugunan, A., Keechilattu, P., Philip, A., & Reghu, R. (2020). Chemoport-related fungemia caused by *Trichosporon asahii*. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 42(3), e193–e194. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001420>
- Rakowska, R., Sadowska, A., Dybkowska, E., & Świdorski, F. (2017). Spent yeast as natural source of functional food additives. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 68(2), 115–121.
- Ramirez, D., & Giron, M. (2023). *Enterobacter* Infections. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559296/>
- Ramírez, I., & Moncada, D. (2020). Fatal disseminated infection by *Trichosporon asahii* under voriconazole therapy in a patient with acute myeloid leukemia: a review of breakthrough infections by *Trichosporon* spp. *Mycopathologia*, 185(2), 377–388. <https://doi.org/10.1007/s11046-019-00416-w>
- Ramírez-Nuñez, J., Romero-Medrano, R., Nevárez-Moorillón, G. V., & Gutiérrez-Méndez, N. (2011). Effect of pH and salt gradient on the autolysis of *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1495–1499. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000036>
- Ranieri, M. L., Huck, J. R., Sonnen, M., Barbano, D. M., & Boor, K. J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4823–4832. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2144>
- Raymond-Fleury, A., Lessard, M.-H., Chamberland, J., Pouliot, Y., Dugat-Bony, E., Turgeon, S. L., St-Gelais, D., & Labrie, S. (2022). Analysis of microbiota persistence in Quebec’s terroir cheese using a metabarcoding approach. *Microorganisms*, 10(7), 1381. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071381>
- Reyes, M. E. Q., Rohrbach, K. G., & Paull, R. E. (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 33(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.003>

- Rezki, M. A., Benbadis, L., DeBillerbeck, G., Benbayer, Z., Franccedil, J. M., & ois. (2013). Isolation and physiological characterization of indigenous yeasts from some Algerian agricultural and dairy products. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 4(6), 75–83. <https://doi.org/10.5897/JYFR2013.0117>
- Rinschen, M. M., Ivanisevic, J., Giera, M., & Siuzdak, G. (2019). Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(6), 353–367. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>
- Ritschard, J. S., Amato, L., Kumar, Y., Müller, B., Meile, L., & Schuppler, M. (2018). The role of the surface smear microbiome in the development of defective smear on surface-ripened red-smear cheese. *AIMS Microbiology*, 4(4), 622–641. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.622>
- Rittmann, B. E., Krajmalnik-Brown, R., & Halden, R. U. (2008). Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(8), 604–612. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1939>
- Robson, K., Dean, M., Haughey, S., & Elliott, C. (2021). A comprehensive review of food fraud terminologies and food fraud mitigation guides. *Food Control*, 120, 107516. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107516>
- Rocchetti, G., & O’Callaghan, T. F. (2021). Application of metabolomics to assess milk quality and traceability. *Current Opinion in Food Science*, 40, 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.04.005>
- Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584. <https://doi.org/10.7717/peerj.2584>
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., & Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005>
- Rouhani, A., Javadzadeh, A., Tanhaeian, A., & Navabi, S. (2022). A comparison of antibacterial properties of tachyplesin, thanatin, and enterocin P on *Enterococcus faecalis*. *European Endodontic Journal*, 7(1), 67–72. <https://doi.org/10.14744/ej.2021.04696>
- Rouxel, M., Barthe, M., Marchand, P., Juin, C., Mondamert, L., Berges, T., Blanc, P., Verdon, J., Berjeaud, J.-M., & Aucher, W. (2020). Characterization of antifungal compounds produced by lactobacilli in cheese-mimicking matrix: Comparison between active and inactive strains. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108798. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108798>



- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>
- Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., Ottesen, A., & Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1323-4>
- Savary, O., Coton, E., Maillard, M.-B., Gaucheron, F., Le Meur, C., Frisvad, J., Thierry, A., Jany, J.-L., & Coton, M. (2023). Functional diversity of *Bisifusarium domesticum* and the newly described *Nectriaceae* cheese-associated species. *Food Research International*, 112691. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112691>
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: From molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 257–276. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x>
- Schmitz-Esser, S., Dzieciol, M., Nischler, E., Schornsteiner, E., Bereuter, O., Mann, E., & Wagner, M. (2018). Abundance and potential contribution of Gram-negative cheese rind bacteria from Austrian artisanal hard cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.013>
- Sękowska, A. (2017). Raoultella spp.—Clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica*, 62(3), 221–227. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0490-7>
- Shi, C., & Maktabdar, M. (2021). Lactic acid bacteria as biopreservation against spoilage molds in dairy products—A Review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 819684. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.819684>
- Shikha, Singh, S., & Shankar, S. (2021). Chapter 8 - Microbial metagenomics: Potential and challenges. In S. Mondal & R. L. Singh (Eds.), *Advances in Animal Genomics* (pp. 109–122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820595-2.00008-4>
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6), 1449–1465. <https://doi.org/10.1111/jam.13033>
- Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunsbjerg, S. D., Bosma, E. F., McNair, L. M., Beisel, C. L., & Neves, A. R. (2020). Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of *Lactobacilli* against fungal spoilage in fermented

- milk products. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), e02312-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19>
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural colorants: food colorants from natural sources. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 261–280. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Singh, A., Nyati, A., Mohta, A., Kushwaha, R. K., & Jain, S. K. (2019). A Case of scalp white piedra caused by *Trichosporon ovoides*. *International Journal of Trichology*, 11(3), 134–137. [https://doi.org/10.4103/ijt.ijt\\_19\\_19](https://doi.org/10.4103/ijt.ijt_19_19)
- Singh, A., Yadav, V., & Prasad, R. (2012). Comparative lipidomics in clinical isolates of *Candida albicans* reveal crosstalk between mitochondria, cell wall integrity and azole resistance. *PLOS ONE*, 7(6), e39812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039812>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation—A review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104–111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Sipiczki, M. (2006). *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6716–6724. <https://doi.org/10.1128/AEM.01275-06>
- Sipiczki, M. (2020). *Metschnikowia pulcherrima* and related pulcherrimin-producing yeasts: fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. *Microorganisms*, 8(7), E1029. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071029>
- Sipiczki, M. (2023). Identification of antagonistic yeasts as potential biocontrol agents: Diverse criteria and strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 406, 110360. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110360>
- Sørensen, L., Gori, K., Petersen, M., Jespersen, L., & Arneborg, N. (2011). Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International Dairy Journal - INT DAIRY J*, 21, 970–978. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.005>

- Sriswasdi, S., Takashima, M., Manabe, R.-I., Ohkuma, M., & Iwasaki, W. (2019). Genome and transcriptome evolve separately in recently hybridized *Trichosporon* fungi. *Communications Biology*, 2, 263. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0515-2>
- Staats, M., Arulandhu, A. J., Gravendeel, B., Holst-Jensen, A., Scholtens, I., Peelen, T., Prins, T. W., & Kok, E. (2016). Advances in DNA metabarcoding for food and wildlife forensic species identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(17), 4615–4630. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9595-8>
- Stellato, G., De Filippis, F., La Storia, A., & Ercolini, D. (2015). Coexistence of lactic acid bacteria and potential spoilage microbiota in a dairy processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(22), 7893–7904. <https://doi.org/10.1128/AEM.02294-15>
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2–4), 331–345. <https://doi.org/10.1007/BF00395940>
- Stubbendieck, R. M., & Straight, P. D. (2016). Multifaceted interfaces of bacterial competition. *Journal of Bacteriology*, 198(16), 2145–2155. <https://doi.org/10.1128/JB.00275-16>
- Stubbendieck, R. M., Vargas-Bautista, C., & Straight, P. D. (2016). Bacterial communities: interactions to scale. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1234. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>
- Suárez, N., Weckx, S., Minahk, C., Hebert, E. M., & Saavedra, L. (2020). Metagenomics-based approach for studying and selecting bioprotective strains from the bacterial community of artisanal cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 335, 108894. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108894>
- Sugita, T., Ikeda, R., & Nishikawa, A. (2004). Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5467–5471. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5467-5471.2004>
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., & Shinoda, T. (2002). Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1826–1830. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1826-1830.2002>
- Sugita, T., & Nishikawa, A. (2004). Molecular taxonomy and identification of pathogenic fungi based on DNA sequence analysis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi = Japanese Journal of Medical Mycology*, 45(2), 55–58. <https://doi.org/10.3314/jjmm.45.55>

- Sun, Z., Harris, H. M. B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I. B., Cooney, J. C., Kagawa, T. F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M. C., O’Sullivan, O., Ritari, J., ... O’Toole, P. W. (2015). Expanding the biotechnology potential of *lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Communications*, 6, 8322. <https://doi.org/10.1038/ncomms9322>
- Sundh, I., & Melin, P. (2011a). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9528-z>
- Sundh, I., & Melin, P. (2011b). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(1), 113–119. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9528-z>
- Suzzi, G., Schirone, M., Martuscelli, M., Gatti, M., Fornasari, M. E., & Neviani, E. (2003). Yeasts associated with Manteca. *FEMS Yeast Research*, 3(2), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(02\)00183-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(02)00183-6)
- Tan, Y., Ma, S., Leonhard, M., Moser, D., & Schneider-Stickler, B. (2018).  $\beta$ -1,3-glucanase disrupts biofilm formation and increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* DAY185. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 942–946. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.003>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Cajthaml, T., Põlme, S., Hiiesalu, I., Anslan, S., Harend, H., Buegger, F., Pritsch, K., Koricheva, J., & Abarenkov, K. (2016). Tree diversity and species identity effects on soil fungi, protists and animals are context dependent. *The ISME Journal*, 10(2), 346–362. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.116>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tidona, F., Francolino, S., Ghiglietti, R., Locci, F., Carminati, D., Laforce, P., & Giraffa, G. (2020). Characterization and pre-industrial validation of *Streptococcus thermophilus* strains to be used as starter cultures for Crescenza, an Italian soft cheese. *Food Microbiology*, 92, 103599. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103599>
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Roncada, P., & Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210, 103534. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>

- Toriumi, Y., Sugita, T., Nakajima, M., Matsushima, T., & Shinoda, T. (2002). Antifungal pharmacodynamic characteristics of amphotericin B against *Trichosporon asahii*, using time-kill methodology. *Microbiology and Immunology*, *46*(2), 89–93. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02663.x>
- Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A.-E., Rodríguez-Hernández, A.-I., Del Rocío López-Cuellar, M., & Chavarría-Hernández, N. (2022). Bacteriocins produced by LAB isolated from cheeses within the period 2009-2021: A Review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *14*(2), 238–251. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09825-0>
- Tsai, M. S., Yang, Y. L., Wang, A. H., Wang, L. S., Lu, D. C. T., Liou, C. H., Hsieh, L. Y., Wu, C. J., Cheng, M. F., Shi, Z. Y., & Lo, H. J. (2012). Susceptibilities to amphotericin B, fluconazole and voriconazole of *Trichosporon* clinical isolates. *Mycopathologia*, *174*(2), 121–130. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9525-z>
- Türkel, S., & Ener, B. (2009). Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *64*(5–6), 405–410. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-5-618>
- Tzora, A., Nelli, A., Kritikou, A. S., Katsarou, D., Giannenas, I., Lagkouvardos, I., Thomaidis, N. S., & Skoufos, I. (2022). The “Crosstalk” between microbiota and metabolomic profile of kefalograviera cheese after the innovative feeding strategy of dairy sheep by omega-3 fatty acids. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(20), 3164. <https://doi.org/10.3390/foods11203164>
- van den Tempel, T., & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, *10*(4), 263–270. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00053-4)
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third revolution in sequencing technology. *Trends in Genetics*, *34*(9), 666–681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
- Vargas, M. C. A., & Simsek, S. (2021). Clean label in bread. *Foods*, *10*(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods10092054>
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1525*, 3–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1)
- Vicente, J., Ruiz, J., Belda, I., Benito-Vázquez, I., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Benito, S. (2020). The genus *Metschnikowia* in enology. *Microorganisms*, *8*(7), 1038. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071038>

- Vorbeck, M. L., & Cone, J. F. (1963). Characteristics of an intracellular proteinase system of a *Trichosporon* species isolated from Trappist-type cheese. *Applied Microbiology*, *11*, 23–27. <https://doi.org/10.1128/am.11.1.23-27.1963>
- Walcher, G., Gonano, M., Kümmler, J., Barker, G. C., Lebl, K., Bereuter, O., Ehling-Schulz, M., Wagner, M., & Stessl, B. (2014). *Staphylococcus aureus* reservoirs during traditional Austrian raw milk cheese production. *The Journal of Dairy Research*, *81*(4), 462–470. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000417>
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D1087–D1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>
- Wang, Y., Kang, W., Xu, Y., & Li, J. (2011). Effect of different indigenous yeast  $\beta$ -glucosidases on the liberation of bound aroma compounds. *Journal of the Institute of Brewing*. <http://www.scientificsocieties.org/jib/>
- Wang, Y., Li, J., & Xu, Y. (2011). Characterization of novel  $\beta$ -glucosidases with transglycosylation properties from *Trichosporon asahii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(20), 11219–11227. <https://doi.org/10.1021/jf203693v>
- Wang, Y., Xu, Y., & Li, J. (2012). A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichosporon asahii*: Yield prediction, evaluation and application for aroma enhancement of Cabernet Sauvignon. *Journal of Food Science*, *77*(8), M505-515. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02705.x>
- Wang, Y., Zhang, C., Li, J., & Xu, Y. (2013). Different influences of  $\beta$ -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. *Food Chemistry*, *140*(1), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.044>
- Weckwerth, W., & Fiehn, O. (2002). Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(2), 156–160. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00299-9)
- Weirather, J. L., de Cesare, M., Wang, Y., Piazza, P., Sebastiano, V., Wang, X.-J., Buck, D., & Au, K. F. (2017). Comprehensive comparison of Pacific Biosciences and Oxford Nanopore Technologies and their applications to transcriptome analysis. *F1000Research*, *6*. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10571.2>
- Weiss, W. P., & Pinos-Rodríguez, J. M. (2009). Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. *Journal of Dairy Science*, *92*(12), 6144–6155. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2558>

- Wen, R., Li, X., Han, G., Chen, Q., & Kong, B. (2021). Fungal community succession and volatile compound dynamics in Harbin dry sausage during fermentation. *Food Microbiology*, *99*, 103764. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103764>
- White TJ., Bruns T. , Lee S., TaylorJ. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Pakjas*, *Vol. 56*, 577–585.
- Whon, T. W., Kim, H. S., & Bae, J.-W. (2018). Complete genome sequence of *Kocuria rhizophila* BT304, isolated from the small intestine of castrated beef cattle. *Gut Pathogens*, *10*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0270-9>
- Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., & Dutton, R. J. (2014). Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell*, *158*(2), 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>
- Wu, Y., Pang, X., Wu, Y., Liu, X., & Zhang, X. (2022). Enterocins: Classification, synthesis, antibacterial mechanisms and food applications. *Molecules*, *27*(7), 2258. <https://doi.org/10.3390/molecules27072258>
- Yang, R., Ao, J., Wang, W., Song, K., Li, R., & Wang, D. (2003). Disseminated trichosporonosis in China. *Mycoses*, *46*(11–12), 519–523. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00920.x>
- Yang, R. Y., Li, H. T., Zhu, H., Zhou, G. P., Wang, M., & Wang, L. (2012). Genome sequence of the *Trichosporon asahii* environmental strain CBS 8904. *Eukaryotic Cell*, *11*(12), 1586–1587. <https://doi.org/10.1128/EC.00264-12>
- Yavuz, M., Kasavi, C., & Toksoy Öner, E. (2021). Developments in effective use of volatile organic compound analysis to assess flavour formation during cheese ripening. *The Journal of Dairy Research*, *88*(4), 461–467. <https://doi.org/10.1017/S0022029921000790>
- Yoon, S.-H., Ha, S.-M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., & Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Zadoks, R. N., Griffiths, H. M., Munoz, M. A., Ahlstrom, C., Bennett, G. J., Thomas, E., & Schukken, Y. H. (2011). Sources of *Klebsiella* and *Raoultella* species on dairy farms: Be careful where you walk. *Journal of Dairy Science*, *94*(2), 1045–1051. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3603>
- Zha, M., Yu, J., Zhang, Y., Wang, H., Bai, N., Qin, Y., Liangliang, D., Liu, W., Zhang, H., & Bilige, M. (2015). Study on *Streptococcus thermophilus* isolated from Qula and associated characteristic of acetaldehyde and diacetyl in their fermented milk. *The*

*Journal of General and Applied Microbiology*, 61(2), 50–56.  
<https://doi.org/10.2323/jgam.61.50>

- Zhang, F., Zhao, M., Braun, D. R., Ericksen, S. S., Piotrowski, J. S., Nelson, J., Peng, J., Ananiev, G. E., Chanana, S., Barns, K., Fossen, J., Sanchez, H., Chevrette, M. G., Guzei, I. A., Zhao, C., Guo, L., Tang, W., Currie, C. R., Rajski, S. R., ... Bugni, T. S. (2020). A marine microbiome antifungal targets urgent-threat drug-resistant fungi. *Science (New York, N.Y.)*, 370(6519), 974–978.  
<https://doi.org/10.1126/science.abd6919>
- Zhang, Y., Li, H., Yang, R., & Wang, C. (2016). Study on antioxidant enzymatic activities of *Trichosporon asahii*. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4), 445–450.  
<https://doi.org/10.1007/s12088-016-0593-5>
- Zheng, X., Shi, X., & Wang, B. (2021). A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. *Frontiers in Microbiology*, 12, 703284.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284>
- Zhimo, V. Y., Biasi, A., Kumar, A., Feygenberg, O., Salim, S., Vero, S., Wisniewski, M., & Droby, S. (2020). Yeasts and bacterial consortia from kefir grains are effective biocontrol agents of postharvest diseases of fruits. *Microorganisms*, 8(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030428>
- Zotta, T., Ricciardi, A., Condelli, N., & Parente, E. (2021). Metataxonomic and metagenomic approaches for the study of undefined strain starters for cheese manufacture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–15.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870927>



## Annexes

### Annexe 1: Souches issues des fromages québécois

Souches	n°souche	Fromage
<i>Brevibacterium linens</i>	LMA-1272	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1465	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Corynebacterium casei</i>	LMA-1345	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1444	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Staphylococcus equorum</i>	LMA-1258	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1399	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1443	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1455	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Halomonas venusta</i>	LMA-1412	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Halomonas</i> sp.	LMA-1359	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1365	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1451	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1460	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Psychrobacter glacincola</i>	LMA-1398	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Psychrobacter celer</i>	LMA-1377	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1378	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Psychrobacter</i> sp.	LMA-1431	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
	LMA-1450	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Glutamicibacter arilaitensis</i>	LMA-1446	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Cobetia marina</i>	LMA-1370	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Cobetia</i> sp.	LMA-1287	Fromage à pâte semi-ferme à croûte lavée
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	LMA-1802	Cheddar
	LMA-1803	Cheddar
	LMA-1804	Cheddar
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LMA-7	Cheddar
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LMA-1A	Cheddar
	LMA-1C	Cheddar
	LMA-1B	Cheddar
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LMA-2A	Cheddar
	LMA-2C	Cheddar
	LMA-2B	Cheddar
<i>Lactococcus lactis lactis</i>	LMA-1263	Ferment
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	LMA-1264	Ferment
<i>Lactococcus lactis lactis</i> biovar. <i>Diacetylactis</i>	LMA-1265	Ferment
<i>Leuconostoc</i> sp.	LMA-1266	Ferment
<i>Brevibacterium linens</i>	LMA-1267	Ferment

**Annexe 2: Activités antifongiques des souches fromagères**

Genre, espèce	Code	Échantillon	<i>Yarrowia lipolytica</i> LMA-800	<i>Candida parapsilosis</i> LMA-804	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> LMA-808	<i>Cladosporium cladosporioides</i> LMA-31	<i>Penicillium commune</i> LMA-72	<i>Mucor racemosus</i> LMA-722	<i>Cladosporium herbarum</i> LMA-929
<i>Corynebacterium casei</i>	LMA-2003	CV-C	-	-	+	-	-	-	-
<i>Klebsellia</i> sp.	LMA-2004, ICVB520	CV-C	-	-	+	-	+	+	-
<i>Marinomonas</i> sp.	ICVB510, LMA-2007	CV-C	-	-	+	-	-	-	+
<i>Marinomonas</i> sp.	LMA-2039, LMA-2040	CV-C	-	-	-	+	+	-	-
<i>Marinomonas</i> sp.	LMA-2042	CV-C	-	-	-	+	-	-	-
<i>Halomonas</i> sp.	LMA-2041	CV-C	-	-	-	+	+	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	LMA-2038	CV-C	+	+	+	+	+	-	+
<i>Raoultella planticola</i>	LMA-2002	CV-C	+	+	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter</i> sp.	LMA-2008	CV-R	+	+	+	-	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2009, LMA-2010, LMA-2011, LMA-2012, LMA-2018, LMA-2019	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-1999	BR-R	+	-	-	-	+	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2035	BR-C	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2043, LMA-1997	BR-C	-	-	-	-	+	-	-

<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-2025, LMA-2028, LMA-2032	BR-C	+	-	-	-	-	-	-
<i>Candida atlantica</i>	LMA-2014	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-2013, LMA-2015, LMA-2016, LMA-2017, LMA-2000, LMA-1998, LMA-2020	BR-R	+	-	-	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-2021, LMA-2022, LMA-2023, LMA-2033, LMA-2034, LMA-2037, LMA-2024, LMA-2026, LMA-2027, LMA-2029, LMA-2030, LMA-2031, LMA-2036	BR-C	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	LMA-810	Rose Blanche	+		+			+	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-1019	Ferment québécois	+						
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-1244	Fromage à croûte lavée	+						

**Annexe 3 : Activités antibactériennes des souches fromagères**

Genre, espèce	Code	Échantillon	<i>Clostridium tyrobutiricum</i> (LMG 1285)	<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	<i>Listeria monocytogenes</i> (CIP 105459)	<i>Listeria monocytogenes</i> (CIP 82.110T)	<i>Salmonella enterica</i> serovar typhimurium (ATCC 53648)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13709)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ICVB515, ICVB519	CV-C	+	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB516, ICVB517, ICVB518	CV-C	+	-	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	LMA-2038	CV-C	+	+	+	+	-	+
<i>Marinomonas</i> sp.	ICVB510	CV-C	-	-	-	-	+	-
<i>Klebsiella</i> sp.	ICVB520	CV-C	-	-	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB521	CV-R	+	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB522	CV-R	+	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ICVB523	CV-R	-	+	+	+	-	-
<i>Trichoderma</i> sp.	ICVY047, ICVY048, ICVY049	BR-C	-	-	+	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	ICVY050	BR-C	-	-	+	-	-	-
<i>Trichosporon asahii</i>	LMA-810	Rose Blanche	+	-	-	-	-	-