



HAL
open science

Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium* et étude de leurs interactions biotiques avec *Hafnia alvei* dans un fromage modèle

Nguyen Phuong Pham

► **To cite this version:**

Nguyen Phuong Pham. Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium* et étude de leurs interactions biotiques avec *Hafnia alvei* dans un fromage modèle. Génie des procédés. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLA035 . tel-02136579

HAL Id: tel-02136579

<https://theses.hal.science/tel-02136579v1>

Submitted on 22 May 2019

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

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

Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium* et étude de leurs interactions biotiques avec *Hafnia alvei* dans un fromage modèle

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (l'Institut des sciences
et industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581 Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement et Santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Génie des procédés

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 20 décembre 2018, par

Nguyen-Phuong Pham

Composition du Jury :

Mme Sophie Landaud Professeur, AgroParisTech (UMR GMPA)	Président
Mme Hélène Falentin Ingénieur de Recherche, INRA (UMR STLO)	Rapporteur
Mme Monique Zagorec Directrice de Recherche, INRA (UMR SECALIM)	Rapporteur
Mme Isabelle Martin-Verstraete Professeur, Université Paris Diderot (LPBA)	Examineur
M. Pierre Renault Directeur de Recherche, INRA (UMR MICALIS)	Examineur
M. Christophe Monnet Chargé de Recherche, INRA (UMR GMPA)	Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais commencer ce manuscrit en remerciant mon directeur de thèse, M. Christophe Monnet, qui m'a encadrée et accompagnée tout au long de ce travail. Je tiens à te remercier pour tes conseils, ton soutien, ta disponibilité et ta confiance en moi, ce qui m'a permis d'avancer dans mes travaux de recherche.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Hélène Falentin et Mme Monique Zagorec qui ont accepté d'être mes rapporteurs de thèse. De même, je souhaite remercier Mme Isabelle Martin-Verstraete, Mme Sophie Landaud et M. Pierre Renault pour avoir accepté d'examiner ce travail. Vous me faites l'honneur de votre présence dans le jury.

Je tiens à remercier la Fondation AgroParisTech et le métaprogramme Méta-omiques des Écosystèmes Microbiens (MEM) de l'INRA pour le financement de ma thèse. Je remercie M. François Boué et M. Pascal Bonnarme, respectivement ancien Directeur et Directeur actuel de l'Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires (GMPA) pour m'avoir accueillie au sein de l'Unité.

Je voudrais remercier M. Stéphane Chaillou, M. Pierre Renault, Mme Françoise Irlinger et M. Eric Dugat-Bony pour avoir participé à mon comité de suivi de thèse. Les discussions constructives lors de ces réunions m'ont beaucoup aidée à mener à bien ce travail.

Je remercie profondément Mme Séverine Layec pour m'avoir encadrée en stage de Master 2 de Recherche au GMPA, et m'avoir ainsi ouvert la porte du monde de la recherche scientifique.

Mes remerciements vont aussi à toute l'équipe Écosystème Microbien des Fromages (EcoMic) du GMPA dans laquelle j'ai réalisé mes travaux de recherche depuis mon stage de Master 2 et tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, votre gentillesse et le soutien précieux que vous m'avez apporté, que ce soit professionnel ou personnel. Un grand merci à Séverine Layec pour ton aide exceptionnelle dans la préparation de ma candidature en thèse. Merci à Françoise Irlinger, Sophie Landaud, Sandra Hélinck, Eric Dugat-Bony et Pascal Bonnarme de m'avoir toujours encouragée et de m'avoir posé des questions pertinentes lors des réunions scientifiques de l'équipe. Merci à Anne-Sophie Sarthou et Jessie Castellote pour vos aides continues dans les travaux expérimentaux.

Je tiens également à remercier Mme Sophie Landaud et Mme Pascale Lieben pour m'avoir aidée à réaliser des analyses métabolomiques.

Je remercie l'ensemble des membres du GMPA, présents ou partis, pour leur amitié, leur aide et leur bonne humeur, ce qui fait de la vie au laboratoire un endroit amical et chaleureux.

Finalement, mes remerciements s'adressent à ma famille : mes parents et mon petit frère pour leur amour et leur soutien qui me donnent la force pour aller vers l'avant.

Un grand merci à vous tous,

Liste des publications

Publication dans des revues à comité de lecture

Pham N-P, Layec S, Dugat-Bony E, Vidal M, Irlinger F, Monnet C. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics*. 2017;18:955.

Biotic interaction between *Brevibacterium* and *Hafnia alvei* in cheese. (To be submitted).

Communications lors de congrès

Pham N-P. Quels sont les mécanismes d'adaptation de *Brevibacterium* à l'environnement fromager ? Congrès National de la Société Française de Microbiologie, 1-3 Octobre 2018, Paris, France. Communication orale.

Pham N-P, Dugat-Bony E, Vidal M, Irlinger F, Monnet C, & Layec S. (2017). Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat and generation of functional properties. The 14th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO 14), 4-8 June 2017, Aberdeen, United Kingdom. Affiche.

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGs : Acides gras
ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
 a_w : Activité de l'eau
CoA : Co-enzyme A
CSVs : Composés soufrés volatils
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
FMN : Flavine mononucléotide
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
kDa : Kilodalton
KMBA : Acide α -céto- γ -méthylthiobutyrique
LDH : Lactate déshydrogénase
LH-PCR : Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction
MGL : Méthionine γ -lyase
MTL : Méthanethiol
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria
NRPS : Peptides synthétases non ribosomiques
PCR : Polymerase Chain Reaction
RiPPs : Ribosomally Synthesized and Post-translationally modified Peptides
RNA-seq : RNA sequencing
RT-PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism
TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
UV : Ultraviolet

Liste des figures et des tableaux

Figures	Page
Figure 1. Protocole général de la fabrication de fromage.	18
Figure 2. Diversité des fabrications fromagères.	20
Figure 3. Succession des microorganismes au cours de la fabrication d'un fromage à pâte molle croûte lavée.	21
Figure 4. Changement de forme de <i>Brevibacterium</i> au cours de la croissance.	25
Figure 5. Arbre phylogénétique du genre <i>Brevibacterium</i> basé sur les séquences d'ADNr 16S, utilisant la méthode "Neighbor-Joining".	27
Figure 6. Implication de la protéolyse dans le développement de la flaveur du fromage.	29
Figure 7. Production de pigments caroténoïdes chez <i>Brevibacterium</i> .	36
Figure 8. Voies de biosynthèse de composés soufrés volatils (CSVs) chez <i>Brevibacterium</i> .	38
Figure 9. Réponses adaptatives au stress acide chez les bactéries.	42
Figure 10. Voies du catabolisme du lactose.	47
Figure 11. Principales voies métaboliques du lactate dans les fromages.	49
Figure 12. Principales voies métaboliques des acides aminés dans les fromages.	51
Figure 13. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages.	54
Figure 14. Fonctions chélatrices des sidérophores permettant la fixation du fer.	57
Figure 15. Transport du complexe fer-sidérophore chez les bactéries.	59
Figure 16. Sommaire des interactions interspécifiques.	61
Figure 17. Interactions entre <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> .	63
Figure 18. Classification des bactériocines.	66
Figure 19. Approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes.	69
Figure 20. Représentation schématique de l'organisation de l'ADN ribosomique chez les fungi.	70
Figure 21. Schéma central de la biologie moléculaire.	74
Figure 22. Préparation des ADNc pour le séquençage du transcriptome (RNA-seq).	77

Tableaux	Page
Tableau 1. Principales transformations biochimiques au cours de l'affinage.	19
Tableau 2. Principales bactéries de la classe <i>Actinobacteria</i> retrouvées dans le fromage.	24
Tableau 3. Caractères phénotypiques de 30 espèces du genre <i>Brevibacterium</i> .	28
Tableau 4. Propriétés biochimiques des enzymes protéolytiques caractérisées chez <i>Brevibacterium</i> .	31
Tableau 5. Substances antimicrobiennes produites par <i>Brevibacterium</i> .	33
Tableau 6. Composés soufrés volatils produits par <i>Brevibacterium</i> .	37
Tableau 7. Caractéristiques et conditions d'affinage de certains fromages à croûte lavée.	43
Tableau 8. Mécanismes moléculaires de l'adaptation des microorganismes aux basses températures.	43
Tableau 9. Activité de l'eau (a_w) minimale pour la croissance de certains microorganismes.	45
Tableau 10. Principaux groupes de solutés compatibles.	56
Tableau 11. Interactions microbiennes dans les produits fromagers et laitiers.	62
Tableau 12. Classification des peptides ribosomiques avec modifications post-traductionnelles (RiPPs).	66
Tableau 13. Utilisation de bactériocines ou de souches productrices de bactériocines contre <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage.	67
Tableau 14. Techniques basées sur l'électrophorèse de l'ADN pour l'investigation de la diversité microbienne dans les fromages.	70
Tableau 15. Caractéristiques des technologies de séquençage.	72
Tableau 16. Études métagénomiques des écosystèmes fromagers.	73

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
CHAPITRE I-SYNTÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	17
I. Rôle des bactéries d'affinage du genre <i>Brevibacterium</i> dans la fabrication des fromages.....	17
A. Le fromage – un écosystème complexe et dynamique	17
1. L'aliment fromage en bref.....	17
2. La fabrication de fromage en bref	17
3. Les communautés microbiennes des fromages	19
b. Un bref inventaire des microorganismes du fromage	21
Les fungi.....	21
Les levures	21
Les moisissures	22
Les bactéries	22
Les bactéries lactiques.....	22
Les bactéries propioniques.....	22
Les autres bactéries participant à l'affinage.....	22
Les bactéries à Gram négatif.....	23
<i>Hafnia alvei</i>	23
Les staphylocoques	23
Les bactéries de la classe <i>Actinobacteria</i>	24
B. <i>Brevibacterium</i> – une bactérie d'affinage du fromage	24
1. Propriétés du genre <i>Brevibacterium</i>	25
a. Caractéristiques générales	25
b. Taxonomie et classification.....	26
2. <i>Brevibacterium</i> et le fromage	29
a. Activité protéolytique	29
b. Activité lipolytique et estérasique	32
c. Production de substances antimicrobiennes	32
d. Production de pigments	35
e. Production de composés aromatiques	37
Production de MTL	38
Production de sulfures et de thioesters	39
II. Facteurs impliqués dans la croissance des microorganismes à la surface des fromages.....	40
A. Les facteurs abiotiques	41
1. pH, température, humidité, aération.....	41
a. pH	41
b. Température	42
c. Humidité	44
d. Aération	46
2. Substrats énergétiques	46
a. Lactose et dérivés	46
Le lactose résiduel	48
Le galactose	48
Le lactate	48
b. Protéines et dérivés.....	49
La protéolyse microbienne	50
Le catabolisme des acides aminés	50
La transamination.....	50
La dégradation de la chaîne latérale.....	51
La désamination	52
La décarboxylation.....	52
c. Lipides et dérivés.....	52

La lipolyse microbienne	53
Le catabolisme des acides gras	53
3. Sel.....	54
a. Mécanismes d'adaptation au stress hyperosmotique chez les microorganismes .	54
b. Résistance au sel des microorganismes de la surface du fromage	55
4. Fer.....	56
a. Mécanismes d'acquisition du fer chez les microorganismes	57
La chélation du fer ferrique <i>via</i> des sidérophores.....	57
La réduction du fer ferrique en fer ferreux	58
Le transport du fer	58
Le transport du complexe fer-sidérophore	58
Le transport du fer ferreux	59
b. Acquisition du fer chez les microorganismes de la surface du fromage	60
B. Les facteurs biotiques	60
1. Les principaux types d'interactions entre microorganismes	60
a. Neutralisme.....	62
b. Mutualisme.....	63
c. Commensalisme	64
d. Parasitisme	64
e. Amensalisme	64
Les acides organiques	65
Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	65
Les bactériocines	65
f. Compétition.....	67
2. Les approches d'étude des communautés microbiennes des fromages.....	68
a. Étude de la diversité microbienne	68
Approches culture-dépendantes.....	68
Approches culture-indépendantes.....	69
b. Étude fonctionnelle	74
RT-PCR quantitative	75
Puce à ADN.....	75
RNA-seq	76
CHAPITRE II-RÉSULTATS	81
I. Analyses génomiques comparatives de souches de <i>Brevibacterium</i>	81
A. Résumé	81
B. Publication	82
II. Étude des interactions biotiques entre <i>Brevibacterium</i> et <i>Hafnia alvei</i>	
 dans un fromage modèle	137
A. Résumé	137
B. Publication	137
CHAPITRE III-DISCUSSION ET PERSPECTIVES	251
RÉFÉRENCES	261

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le fromage fait partie du patrimoine traditionnel et gastronomique français. C'est un aliment très apprécié pour sa diversité et ses qualités gustatives. On dénombre à ce jour 1200 variétés de fromages français, dont 45 bénéficiant d'une Appellation d'Origine Protégée (AOP), reflétant toute une richesse de terroirs, de savoir-faire et de qualités organoleptiques. La France se trouve parmi les plus grands producteurs de fromages, et les Français sont les premiers consommateurs de fromages au monde, avec 26,2 kg/hab/an (données du CNIEL, Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière, 2012).

Les communautés microbiennes fromagères sont considérées comme l'un des principaux déterminants de la diversité et de la qualité des fromages. En effet, ces communautés sont composées d'une grande variété de microorganismes (levures, moisissures et bactéries) dont l'importance relative au cours du procédé de fabrication est en constante évolution et qui agissent sur la salubrité et les propriétés sensorielles des fromages. De nos jours, la compréhension et la maîtrise des écosystèmes microbiens fromagers pose un véritable défi scientifique et économique. Depuis une vingtaine d'années, avec les progrès de la biologie moléculaire, notamment l'avènement récent des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) à haut débit, nous avons pu établir une image de plus en plus fine de la biodiversité des communautés microbiennes fromagères. Cependant, la connaissance des mécanismes d'action par lesquels ces microorganismes s'adaptent au milieu fromager et agissent sur la qualité de l'aliment reste encore parcellaire.

Les bactéries d'affinage du genre *Brevibacterium*, appelées par les professionnels "ferment du rouge", sont largement employées en technologie fromagère comme ferment d'affinage pour leur implication dans la maturation des fromages à croûte lavée tels que le Livarot, le Munster et le Reblochon. Ces bactéries, qui se développent à la surface des fromages, participent à la protéolyse et la lipolyse de fromages et produisent des pigments rouges-oranges, des composés soufrés volatils (CSVs) et des substances antimicrobiennes telles que les bactériocines. Cependant, malgré leurs diverses propriétés fonctionnelles d'intérêt technologique, il a été démontré dans certaines études que des souches du genre *Brevibacterium* avaient souvent des difficultés à s'implanter à la surface des fromages, celle-ci étant alors principalement colonisée par des souches adventices ayant une meilleure capacité de colonisation. Le genre bactérien *Brevibacterium* constitue donc un modèle pertinent pour l'étude des mécanismes d'adaptation au milieu fromager.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse, dont l'objectif principal consiste, *via* le modèle de *Brevibacterium* et par des approches de génomique fonctionnelle, à mieux comprendre des mécanismes sous-jacents à l'adaptation microbienne au milieu fromager. Deux axes de recherche ont été explorés dans ce travail : (i) **La génomique comparative**, qui consistait à identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation du genre *Brevibacterium* au milieu fromager *via* l'analyse *in silico* des génomes de différentes souches de *Brevibacterium*, isolées de fromages mais aussi d'autres habitats (par exemple le sol, l'eau, l'Homme) et (ii) **L'étude fonctionnelle**, qui consistait à étudier les interactions biotiques de *Brevibacterium* dans le milieu fromager avec les autres microorganismes présents à la surface du fromage, sachant que dans cette thèse nous avons choisi d'étudier une interaction modèle entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei*. Cette dernière est capable de

produire des composés d'arôme et est parfois associée à des souches de *Brevibacterium* dans les ferments d'affinage.

Ce manuscrit s'articule en trois chapitres. Le premier est consacré à la synthèse bibliographique, qui comporte deux parties. La première partie présente un état de l'art des connaissances sur le genre *Brevibacterium* et notamment son implication dans la fabrication des fromages. La seconde partie porte sur les facteurs biotiques et abiotiques impliqués dans la croissance des microorganismes à la surface des fromages. Le deuxième chapitre du manuscrit présente les résultats obtenus au cours de ce projet, et comporte deux parties qui correspondent aux deux axes de recherches développés : (i) Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium* et (ii) Étude des interactions biotiques entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei* dans un fromage modèle. Ces résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques, rédigés en anglais et précédés d'un résumé en français. Dans le dernier chapitre, les principaux résultats sont récapitulés et discutés de façon globale, en proposant des perspectives pour cette thématique de recherche.

CHAPITRE I
SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I-SYNTÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Rôle des bactéries d'affinage du genre *Brevibacterium* dans la fabrication des fromages

A. *Le fromage – un écosystème complexe et dynamique*

1. L'aliment fromage en bref

Les fromages sont obtenus à partir de laits fermentés ayant subi un égouttage et éventuellement un affinage. Ils présentent une grande diversité de formes, de textures et de saveurs. Ils sont probablement apparus il y a au moins 8000 ans, peu après la révolution néolithique, c'est-à-dire la première révolution agricole, caractérisée par la domestication des plantes et des animaux [1]. La fabrication fromagère répond au besoin de conserver le lait. En effet, ce dernier possède de hautes valeurs nutritives, mais il est très périssable. Le fromage contient des nutriments du lait sous forme concentrée, ce qui, en combinaison avec l'ajout de sel, favorise sa conservation et génère également des qualités organoleptiques typiques. Au cours du temps, différents types de fromages ont été élaborés, et il en existe actuellement plusieurs milliers de variétés à travers le monde [1]. Les fromages peuvent être classés selon différents critères tels que la teneur en eau, la teneur en matière grasse, le traitement du lait, l'espèce animale d'où provient le lait, les caractéristiques d'affinage, le type de croûte etc. Il existe plusieurs modèles de classification qui sont complémentaires pour décrire la diversité des fromages [2]. Au niveau mondial, la norme du standard 283-1978 du *Codex Alimentarius* [3] (adopté en 1973, révisé en 1999, amendé en 2006, 2008, 2013 et 2018) classe les fromages selon la fermeté de leur pâte (molle, ferme / semi-dure, dure et extra-dure) et les caractéristiques d'affinage (affiné, affiné avec des moisissures, non affiné / frais et en saumure). Celle-ci est complétée par des normes individuelles précisant les caractéristiques particulières de chaque fromage.

2. La fabrication de fromage en bref

En général, la transformation du lait en fromage suit un protocole commun (Figure 1) dont les paramètres varient selon les fromages [4]. Les étapes principales sont les suivantes :

- (1) La sélection, la standardisation et, dans certains cas, la pasteurisation du lait.
- (2) Le caillage, qui consiste à faire coaguler les caséines du lait sous l'effet de l'acide lactique et/ou d'enzymes protéolytiques telles que la chymosine et la pepsine présents dans la présure, d'où la formation du caillé.
- (3) L'égouttage, qui permet de séparer le caillé (phase solide) du lactosérum (phase liquide). Il peut se faire de manière spontanée ou être accéléré par brassage, tranchage et chauffage.
- (4) Le salage, qui correspond à l'incorporation de sel en surface ou dans la masse du fromage. Il est réalisé soit par salage à sec en saupoudrant de sel, soit par saumurage en immergeant les fromages dans de la saumure. Cette étape a plusieurs rôles : (i)

compléter l'égouttage, (ii) former la croûte, (iii) agir sur le processus d'affinage et (iv) participer à la saveur du produit.

- (5) L'affinage, qui se caractérise par des transformations biochimiques de divers constituants du caillé, principalement sous l'action d'enzymes microbiennes. Cet ensemble de transformations joue un rôle décisif pour le développement des caractéristiques du fromage telles que son aspect et ses propriétés organoleptiques. Les grandes transformations biochimiques au cours de l'affinage sont résumées dans le Tableau 1. L'affinage s'effectue dans les caves d'affinage avec des conditions spécifiques (température, humidité...) propres à chaque fromage.

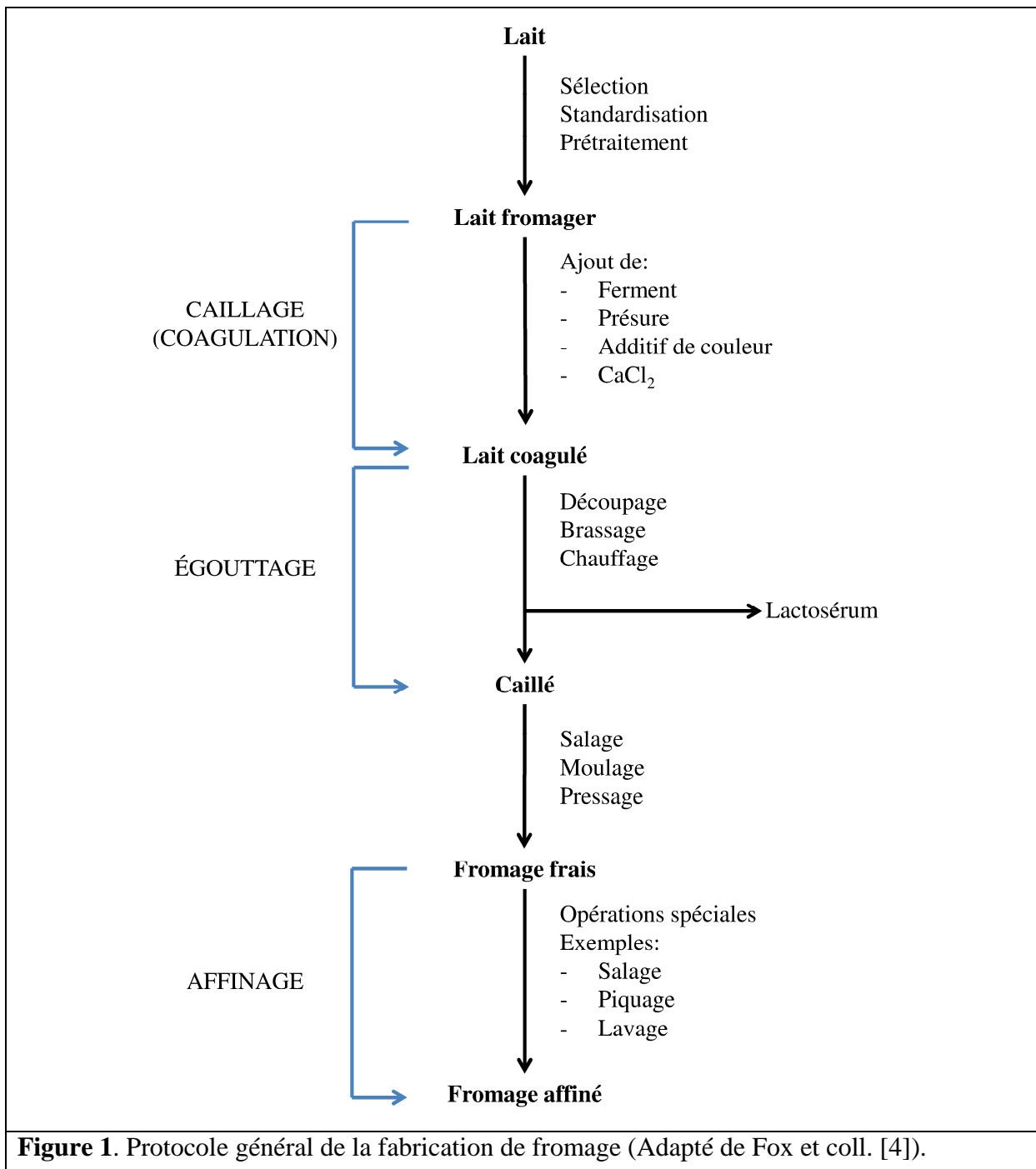


Figure 1. Protocole général de la fabrication de fromage (Adapté de Fox et coll. [4]).

Tableau 1. Principales transformations biochimiques au cours de l’affinage (Adapté de Bertrand [5]).

Substrats	Type de transformation	Principaux produits
Protéines ^a , peptides	Protéolyse	Peptides, acides aminés
Acides aminés	Désamination Décarboxylation Dégradation des chaînes latérales	NH ₃ , CO ₂ , amines, acides α -cétoniques, phénol, indole, méthanethiol et autres composés soufrés volatils
Amines	Désamination oxydative	NH ₃ , aldéhydes
Cétoacides	Réduction	Aldéhydes
Aldéhydes	Réduction Oxydation	Alcools, acides
Lactose ^a	Fermentation lactique homofermentaire	Acide lactique
	Fermentation lactique hétérofermentaire	Acide lactique, éthanol, acide acétique, CO ₂
	Fermentation alcoolique	Éthanol, CO ₂
Acide citrique ^a	Catabolisme de citrate	CO ₂ , acétaldéhyde, acétoïne, diacétyl, 2,3-butanediol
Acide lactique	Fermentation propionique	Acide propionique, acide acétique, CO ₂
	Oxydation	Pyruvate
Triglycérides ^a , glycérides partiels	Lipolyse	Acide gras, glycérides partiels, glycérol
Acides gras	β -oxydation	Méthylcétones, CO ₂
Méthylcétones	Réduction	Alcools secondaires
Acides gras, éthanol, alcools aliphatiques ou aromatiques, thiols	Estérification	Esters, thioesters

^aConstituants originels du lait

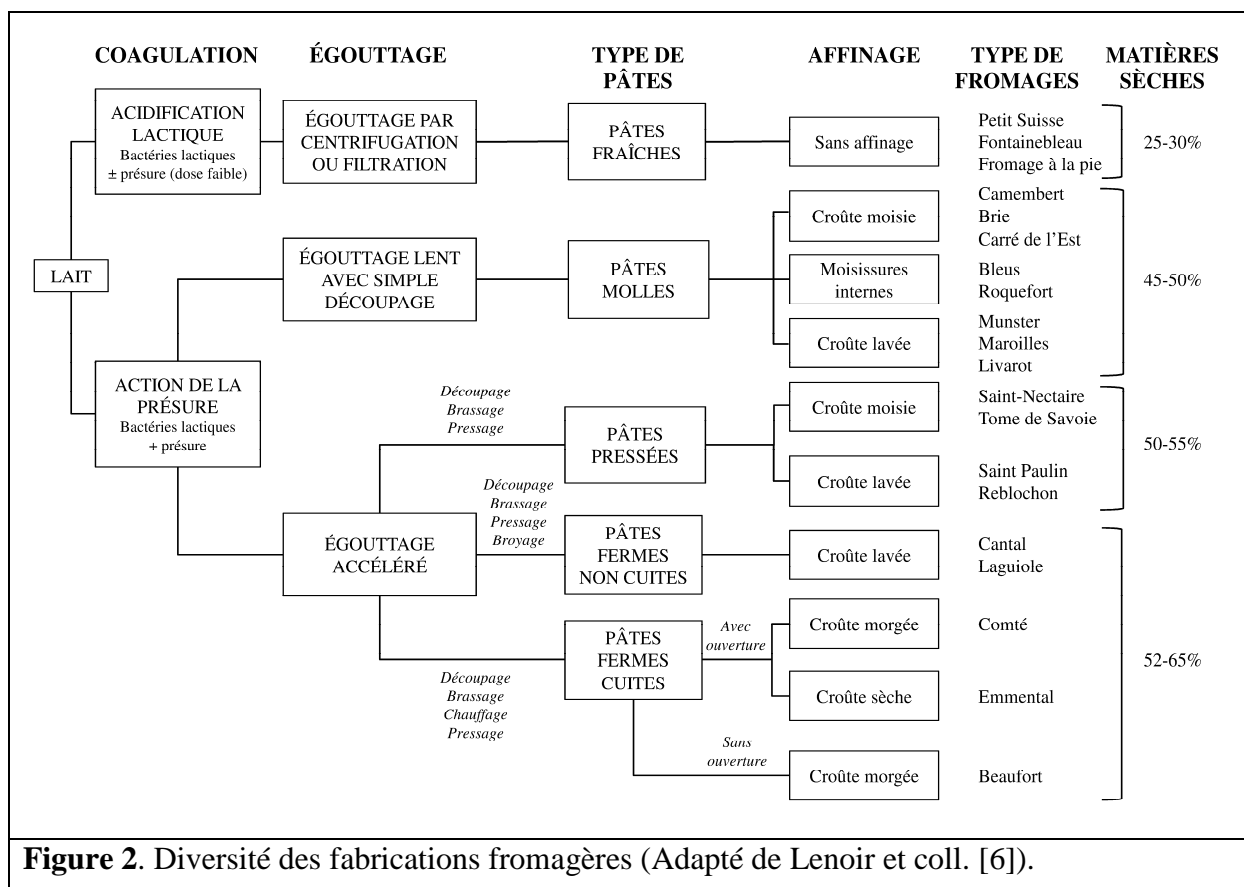
3. Les communautés microbiennes des fromages

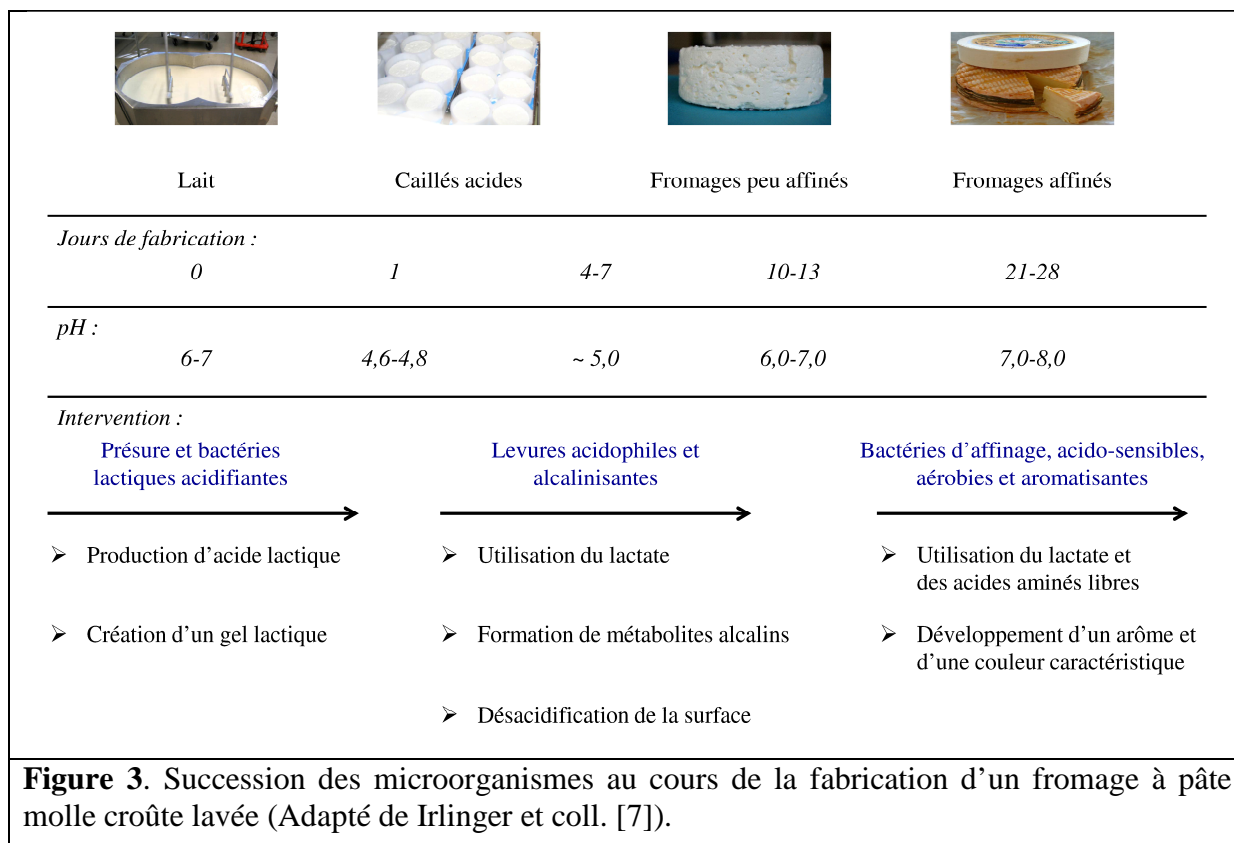
a. Un écosystème complexe et dynamique

À partir d’un principe commun, différents procédés de fabrication de fromage ont été développés. La très grande variété des fromages est en effet due à la multitude de procédés fromagers (Figure 2) couplée à la diversité des communautés microbiennes qui s’y propagent. Au cours de la fabrication d’un fromage, les modifications physico-chimiques du milieu vont avoir un rôle déterminant dans l’implantation ou au contraire la disparition d’un groupe de microorganismes. Ainsi, les communautés microbiennes des fromages sont à la fois complexes et variables selon le procédé technologique, et en constante évolution du fait des

modifications des caractéristiques du caillé et de l'atmosphère dues aux activités microbiennes et aux actions du fromager. La Figure 3 donne un exemple de succession de communautés microbiennes lors de la formation d'un fromage à pâte molle. On peut en distinguer trois phases principales :

- (1) Au début de la fabrication, les bactéries lactiques se multiplient et transforment le lactose du lait en glucose et en galactose, qui seront dégradés à leur tour en acides, essentiellement l'acide lactique. Elles participent donc à la phase d'acidification qui est cruciale dans le processus technologique puisqu'elle permet la formation du caillé.
- (2) Durant les premiers jours de l'affinage, les levures acidophiles se développent en surface. En consommant l'acide lactique du milieu et en produisant des métabolites alcalins, elles permettent la désacidification du caillé.
- (3) La remontée du pH permet ensuite le développement de bactéries acido-sensibles, halotolérantes et aérobies à la surface du fromage. Ces bactéries d'affinage participent fortement à la maturation des fromages, notamment l'aromatisation et la coloration.





b. Un bref inventaire des microorganismes du fromage

Les communautés microbiennes des fromages sont constituées d'un grand nombre de microorganismes, d'origines variées (le lait, les fermentsensemencés, les saumures, le matériel de fromagerie, l'atmosphère des locaux et l'Homme) [8, 9]. L'ensemble de ces microorganismes vit en communauté, soit dans la pâte, soit à la surface du fromage. Les principaux groupes microbiens d'intérêt technologique intervenant dans la fabrication fromagère sont listés ci-dessous.

Les fungi

Les levures

Les levures sont présentes dans le fromage, soit par contamination naturelle (microorganismes du lait cru, de la saumure ou des locaux de fabrication), soit de façon dirigée (à partir des ferments d'affinages) [10]. Les espèces les plus fréquemment isolées des fromages appartiennent aux genres *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Torulaspota* et *Yarrowia* [11]. Dans la fabrication fromagère, l'action des levures commence au cours de l'égouttage et se poursuit pendant l'affinage. Par la consommation du lactate et la production des métabolites alcalins tels que l'ammoniac, ces levures assurent la désacidification du caillé qui est une étape primordiale de l'affinage car elle permet ensuite le développement des bactéries d'affinage acido-sensibles [12]. Cette désacidification contribue également à la modification de la texture, à l'augmentation de certaines activités enzymatiques et à la répartition des minéraux dans le fromage [13–15]. Certaines levures interviennent dans l'affinage par leur activité protéolytique, lipolytique, la fermentation du lactose et la production d'arômes, notamment des composés soufrés volatils (CSVs) [16, 17]. Certaines d'entre elles peuvent aussi être utilisées pour inhiber des microorganismes indésirables [18, 19]. Les levures se développent principalement à la surface des fromages [8].

Les moisissures

Les moisissures sont des microorganismes présentant un développement filamenteux. La présence de moisissures internes ou superficielles caractérise certains types de fromage. *Penicillium* est le genre le plus décrit dans les fromages, notamment les espèces *P. camemberti* à la surface des fromages à croûte fleurie (par exemple le Camembert, le Brie) et *P. roqueforti* dans les cavités internes des fromages à pâte persillée (par exemple le Roquefort, le Bleu). D'autres genres tels que *Mucor*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Sporotrichum* sont également identifiés dans différents fromages [20]. Les moisissures contribuent, en métabolisant l'acide lactique, à la désacidification du caillé et produisent de nombreuses enzymes (par exemple les protéases, les lipases) qui participent activement à l'affinage du fromage [21, 22].

Les bactéries

Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques du fromage comprennent les ferments lactiquesensemencés volontairement lors du processus de fabrication et les bactéries lactiques dites "non ferment" (NSLAB en Anglais : Non Starter Lactic Acid Bacteria), naturellement présentes dans le lait ou apportées par l'ambiance de fabrication. Ce sont des bactéries à Gram positif, microaérophiles ou anaérobies facultatives, généralement non sporulantes, en forme de coques ou de bâtonnets, capables de fermenter des carbohydrates en acide lactique [23]. Les bactéries lactiques peuvent être mésophiles (par exemple *Lactococcus*, *Leuconostoc*) ou thermophiles (par exemple *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*). Leur rôle principal est de participer à la coagulation du lait par leur activité acidifiante, c'est-à-dire la transformation du lactose en acide lactique. Les bactéries lactiques contribuent également à l'affinage par leur activité protéolytique, estérasique (elles sont toutefois considérées comme faiblement lipolytiques) et par l'autolyse qui conduit à la libération des enzymes intracellulaires dans la matrice fromagère [24]. Elles produisent aussi des composés aromatiques tels que le diacétyle ou l'acétaldéhyde *via* le métabolisme du lactose et/ou du citrate [25]. Un autre rôle des bactéries lactiques concerne l'inhibition des microorganismes altérants et/ou pathogènes par l'acidification du lait et la production de bactériocines [24]. Les bactéries lactiques constituent le groupe microbien dominant du cœur de la plupart des fromages [8].

Les bactéries propioniques

Les bactéries du genre *Propionibacterium* sont essentielles dans l'affinage des fromages à pâte pressée cuite (par exemple le Gruyère, l'Emmental). En transformant l'acide lactique en acide propionique, acide acétique et CO₂, elles participent à la formation des trous (ouverture à l'intérieur de la pâte) et de la saveur caractéristique de ce type de fromage [20].

Les autres bactéries participant à l'affinage

De nombreuses espèces de bactéries sont retrouvées à la surface de plusieurs types de fromages, comme les fromages à pâte molle (par exemple le Camembert, le Munster, le Livarot), les fromages à pâte persillée (par exemple le Roquefort) ou les fromages à pâte pressée (par exemple le Comté, le Beaufort, le Saint-Nectaire). Ces bactéries sont en général aérobies, halotolérantes mais acido-sensibles, d'où leur implantation après la désacidification

du milieu par les levures et/ou les moisissures [26]. Elles appartiennent principalement à trois groupes : les bactéries à Gram négatif, les staphylocoques et les *Actinobacteria* [27, 28].

Les bactéries à Gram négatif

La présence des bactéries à Gram négatif dans le fromage a été longtemps considérée comme le résultat d'un manque d'hygiène. Cependant, des études récentes montrent que ces bactéries peuvent avoir un impact positif sur l'affinage du fromage *via* la production d'arômes, la protéolyse ou la lipolyse [29–31]. Les genres les plus souvent retrouvés sont *Psychrobacter*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* et *Vibrio* [9], mais également *Hafnia* et *Pseudomonas* [32], tous appartenant au phylum *Proteobacteria*. À ce jour, *Hafnia alvei* est la seule bactérie à Gram négatif utilisée comme ferment d'affinage [9].

Hafnia alvei

Hafnia alvei est l'espèce type du genre *Hafnia* qui appartient à la famille *Enterobacteriaceae*, à l'ordre *Enterobacteriales*, à la classe *Gammaproteobacteria*, au phylum *Proteobacteria*. Cette bactérie est à Gram négatif, anaérobie facultative, catalase positive, généralement mobile par des flagelles péritriches, non sporulante, en forme de bâtonnet (~1,0 x 2,0 – 5,0 µm). Elle est capable de croître en présence de 2 à 5% NaCl, entre pH 4,9 à 8,25 et à des températures comprises entre 4 et 44°C. En général, *H. alvei* ne fermente pas le lactose, mais des souches lactose-positives ont été identifiées. La plupart des souches d' *H. alvei* peuvent utiliser le citrate. Chez *H. alvei*, les tests de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'ornithine décarboxylase (ODC) sont positifs, mais le test de l'argine dihydrolase (ADH) est négatif [33, 34].

Hafnia alvei a été isolé de différents habitats tels que l'Homme et d'autres animaux, le sol, l'eau, des aliments et des produits laitiers. Des analyses génétiques révèlent que cette espèce est constituée de différents groupes d'homologie d'ADN (genomospecies). Différents biotypes au sein de l'espèce ont été mis en évidence [33]. Deux plasmides qui codent pour les bactériocines Alveicine A et B ont été isolés chez certaines souches d'*H. alvei* [35].

Hafnia alvei a été identifié comme une des espèces bactériennes dominantes chez les fromages de type Camembert, notamment des fromages au lait cru [36, 37]. Elle a été également isolée chez d'autres types de fromage tels que le Livarot ou le Munster [38, 39]. Certaines souches sont commercialisées en tant que ferment d'affinage [40]. La présence d'*H. alvei* augmente la protéolyse et l'aromatisation du fromage, en particulier la production des CSVs [29, 30]. La capacité de produire des CSVs chez *H. alvei* a été démontrée dans un substrat carné [41]. Néanmoins, différentes études ont montré que *H. alvei* peut produire des amines biogènes dans le fromage [39, 42, 43]. La souche *H. alvei* B16 possède une activité antagoniste vis-à-vis *Escherichia coli* O26:H11 et O157:H7 qui font partie des *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC), cependant le mécanisme d'action de cette activité n'est pas encore déterminé [44, 45].

Les staphylocoques

Les staphylocoques correspondent aux espèces du genre *Staphylococcus*, dont le nom vient du grec *staphyle* qui signifie grappe de raisin et du latin *coccus* qui signifie grain [46]. Ce genre appartient au phylum *Firmicutes* qui regroupe les bactéries à Gram positif à bas contenu en G+C % [47]. Certaines espèces productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines sont potentiellement pathogènes (par exemple *S. aureus*, *S. epidermidis*). D'autres espèces non-pathogènes à coagulase négative telles que *S. equorum*, *S. vitulinus*, *S. xylosus* sont fréquemment retrouvées dans les fromages [48]. Ces espèces sont halo- et acido-tolérantes,

principalement retrouvées en début d'affinage et en minorité par rapport aux *Actinobacteria* [49, 50]. Certaines souches possèdent des activités protéolytiques, lipolytiques et estérasiques qui peuvent contribuer au processus d'affinage [51, 52].

Les bactéries de la classe Actinobacteria

Les bactéries de la classe *Actinobacteria* étaient autrefois appelées "bactéries corynéformes". Le terme de bactérie corynéforme, introduit en 1952, désigne un groupe de bactéries dont la morphologie décrite "en forme de massue" (en grec *koryne* signifie massue) [53]. Appartenant au phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif à haute teneur en G+C %), les bactéries de la classe *Actinobacteria* sont généralement aérobies, non mobiles, non sporulantes et capables d'effectuer un cycle de transformation de bacille en coque en fonction du stade de croissance [54, 55]. La taxonomie du groupe a beaucoup évolué, notamment suite aux travaux de Stackebrandt et coll. [56] qui sont basés sur des données de séquençage de l'ADNr/ARNr 16S. Les bactéries de la classe *Actinobacteria* isolées du milieu fromager appartiennent souvent aux ordres *Micrococcales* ou *Corynebacterales* qui comprennent plusieurs genres dont les plus fréquemment retrouvés dans les fromages sont *Glutamicibacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium* et *Micrococcus* (Tableau 2) [55, 57]. Ces bactéries représentent une part importante de la communauté microbienne de la surface de divers types de fromages [38, 50, 58]. Elles jouent un rôle majeur dans l'affinage des fromages en participant activement à la pigmentation et à la production des CSVs qui renforcent les propriétés organoleptiques d'un fromage affiné [59, 60]. De nombreuses souches produisent des protéases, des peptidases, des lipases, libérant ainsi des acides aminés et des acides gras qui sont des précurseurs de composés aromatiques du fromage [20]. De nouvelles espèces d'*Actinobacteria* isolées des fromages ont été décrites ces dernières années, telles que *Glutamicibacter arilaitensis*, *Glutamicibacter bergerei*, *Corynebacterium casei*, *Corynebacterium mooreparkense*, *Microbacterium gubbeenense* et *Brevibacterium aurantiacum* [61–64].

Tableau 2. Principales bactéries de la classe *Actinobacteria* retrouvées dans le fromage (Adapté de Bockelmann et Hoppe-Seyler [58] ; Denis et Irlinger [55]).

Ordre	Famille	Genre
<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Glutamicibacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Renibacterium</i>
	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>
	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i> , <i>Clavibacter</i> , <i>Curtobacterium</i>
	<i>Dermabacteriaceae</i>	<i>Brachybacterium</i> , <i>Dermabacter</i>
<i>Corynebacterales</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i> , <i>Turicella</i>
	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i> , <i>Nocardia</i>

B. Brevibacterium – une bactérie d'affinage du fromage

Parmi les bactéries de la classe *Actinobacteria* présentes dans le fromage, *Brevibacterium* est le genre le plus étudié. Les premières publications concernant la présence de *Brevibacterium* dans les fromages datent du début du XX^e siècle [65]. Appelées par les professionnels "ferment du rouge", les espèces du genre *Brevibacterium* sont très souvent utilisées en fromagerie comme ferment d'affinage pour leur implication dans la maturation de nombreux fromages à pâtes molles (par exemple le Livarot, le Munster, le Reblochon).

1. Propriétés du genre *Brevibacterium*

a. Caractéristiques générales

Les espèces du genre *Brevibacterium* sont des bactéries à Gram positif à haute teneur en G+C % (55-70 %), aérobies, catalase positive, non mobiles (à l'exception de *B. album*, *B. iodinum* et *B. samyangense*), non sporulantes, généralement halotolérantes (jusqu'à 20% NaCl chez certaines souches). Elles suivent un cycle bacille-coque durant leur croissance : elles sont en forme de bacille en phase exponentielle, puis se transforment en coque en phase stationnaire (3-7 jours) (Figure 4). Leur longueur est variable et leur diamètre varie généralement entre 0,6 et 1,0 μm . On observe souvent des formes en "V" correspondant à l'association de deux cellules. La température optimale de croissance varie entre 20 et 37°C en fonction de l'espèce et de la souche (par exemple *B. linens* entre 20 et 25°C, *B. iodinum* 28°C et *B. avium* 37°C). Les souches de *Brevibacterium* sont généralement capables de croître à pH 5,8, mais le pH optimal de croissance est proche de 7,0. Elles peuvent alcaliniser le milieu jusqu'à pH 9,5 [66, 67].

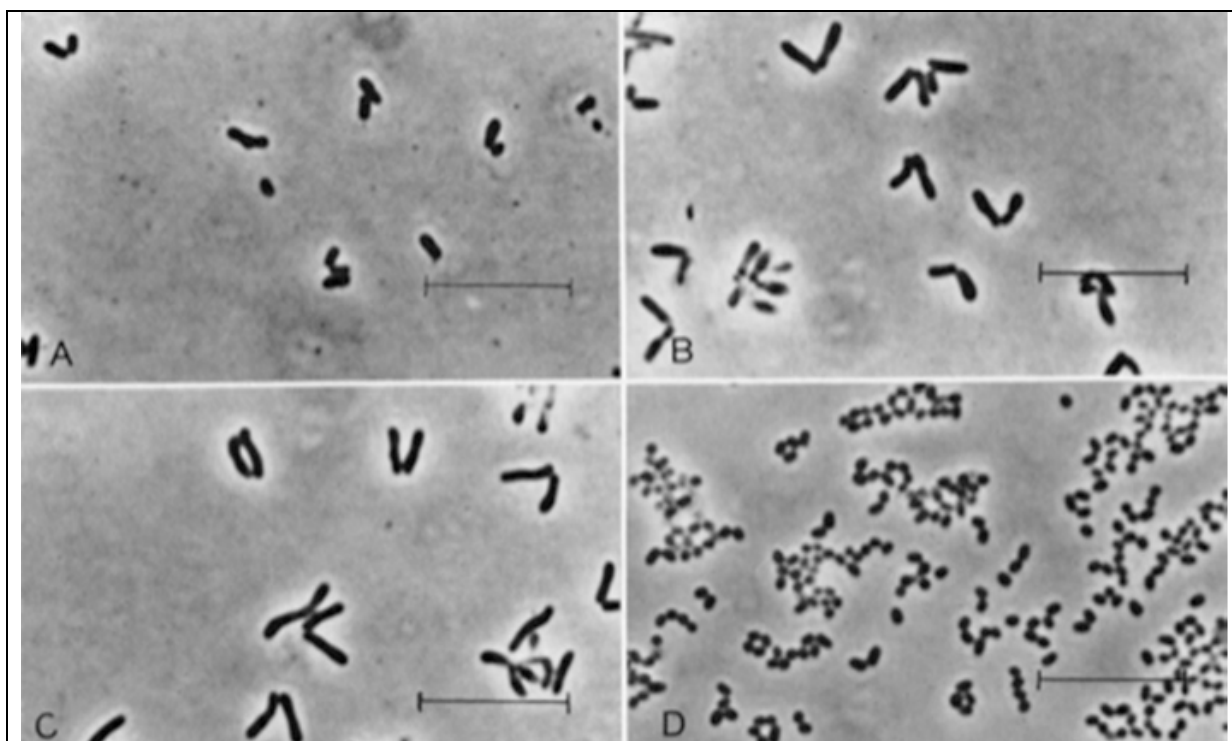


Figure 4. Changement de forme de *Brevibacterium* au cours de la croissance (Goodfellow et coll. [68]).

La souche *B. aurantiacum* ATCC 9175 est inoculée en milieu EYGA à 25°C. (A) Après 6h ; (B) Après 12h ; (C) Après 24h ; (D) Après 3 jours. Barres = 10 μm .

Des études sur la composition de la paroi des bactéries du genre *Brevibacterium* ont révélé la présence d'acide méso-diaminopimélique (méso-DAP) et d'acides téichoïques. Ces bactéries contiennent en grande partie des acides gras à chaîne branchée dont les majoritaires sont les acides 14-méthyl hexadécanoïque (antéiso-C17) et 12-méthyl tétradécanoïque (antéiso-C15). Contrairement à de nombreux *Actinobacteria*, les bactéries du genre *Brevibacterium* ne contiennent pas d'acide mycolique. Les ménaquinones sont les seules quinones respiratoires détectées chez *Brevibacterium* [66, 67].

Les bactéries du genre *Brevibacterium* sont capables d'utiliser différentes sources de carbone et d'azote [66]. Elles sont parfois protéolytiques, capables de métaboliser la caséine

et la gélatine [67]. Historiquement, les études sur le métabolisme du genre *Brevibacterium* sont liées en grande partie à l'espèce *B. linens*, considérée comme un agent essentiel intervenant dans l'affinage des fromages [66]. L'acétate et le lactate sont les substrats les mieux assimilés chez *B. linens*. *B. linens* peut aussi utiliser le glucose et le glycérol, mais n'utilise pas l'amidon ni le citrate [69, 70]. Les acides aminés tyrosine, phénylalanine, arginine, proline, acide glutamique et histidine sont des facteurs limitants pour la croissance de *B. linens* [71].

La production des CSVs constitue une caractéristique majeure chez les bactéries du genre *Brevibacterium*, y compris des souches isolées du milieu fromager comme *B. linens* et *B. aurantiacum*, des souches isolées de l'Homme comme *B. epidermidis* et *B. mcbrellneri* ou des souches environnementales comme *B. marinum* [66, 67]. Plusieurs souches produisent des pigments de type caroténoïde, d'où la couleur jaune-orange des colonies [66]. La couleur bleu-violet typique chez *B. iodinum* est due à la sécrétion de cristaux d'iodinine qui est un dérivé de phénazine, ce qui donne le nom à cette espèce [67].

b. Taxonomie et classification

Selon le Manuel de Systématique Archéale et Bactérienne de Bergey (BMSAB en Anglais : Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria), le genre *Brevibacterium* est l'unique genre de la famille *Brevibacteriaceae* [72]. Deux genres récemment décrits, *Spelaiococcus* et *Sediminivirga*, sont également attribués à cette famille [73, 74]. La famille *Brevibacteriaceae* appartient à l'ordre *Micrococcales*, à la classe *Actinobacteria*, au phylum *Actinobacteria*. Le genre *Brevibacterium* a été établi en 1953 par Breed, avec *B. linens* comme espèce type [75]. Le nom du genre vient du latin *brevis* qui signifie court et du grec ancien βακτηρία (*baktêria*) qui signifie bâton.

La classification et l'identification des espèces du genre *Brevibacterium* ont été longtemps confuses et difficiles en raison de leur similarité morphologique avec d'autres genres tels que *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*. Cependant, les méthodes modernes de taxonomie telles que la taxonomie numérique, la chimiotaxonomie et récemment le typage moléculaire ont démontré que *Brevibacterium* constitue un genre distinct [65, 68, 76]. À ce jour, le séquençage de l'ADNr/ARNr 16S est considéré comme une méthode rapide et efficace pour différencier les bactéries du genre *Brevibacterium* des autres *Actinobacteria* [67].

La taxonomie du genre *Brevibacterium* a été révisée ces dernières années en se basant sur des données de séquençage de l'ADNr/ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN [66]. En 2004, selon des données d'hybridation ADN-ADN, l'espèce *B. linens* a été divisée en trois espèces distinctes : *B. linens*, *B. antiquum* et *B. aurantiacum* [64]. Certaines espèces ont été retirées du genre *Brevibacterium*, par exemple *Brevibacterium stationis*, reclassifié en 2010 comme *Corynebacterium stationis* [77]. En 2018, le genre *Brevibacterium* est constitué de 30 espèces, isolées de divers habitats tels que des produits laitiers (lait, fromages), le sol, l'eau et l'Homme (Figure 5). Ces espèces représentent une très grande hétérogénéité de propriétés physiologiques, chimiques et biochimiques (Tableau 3) [66]. En pratique, la différenciation entre les espèces du genre *Brevibacterium* se fait en utilisant des données de séquençage de l'ADNr/ARNr 16S couplées aux données phénotypiques [67].

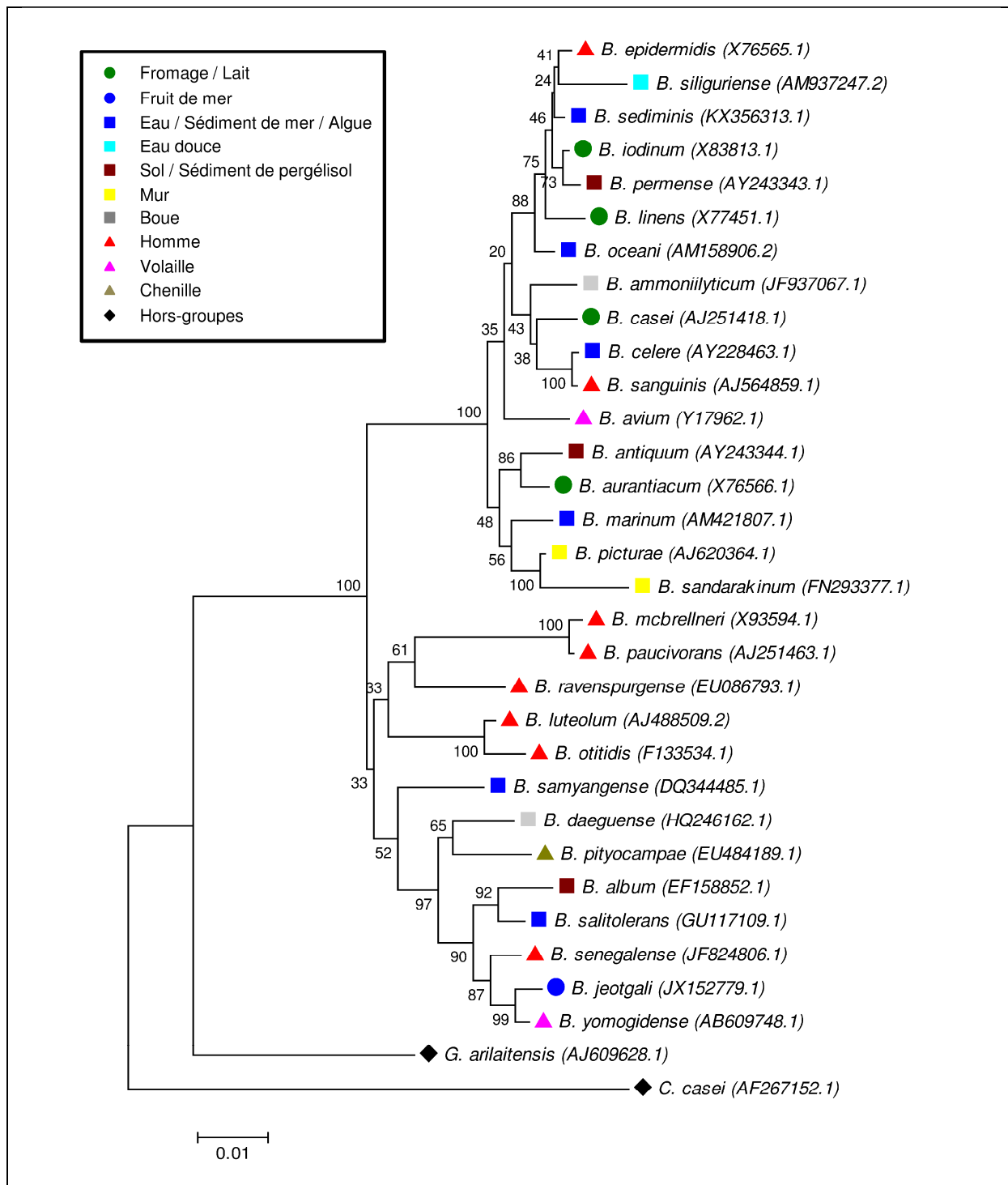


Figure 5. Arbre phylogénétique du genre *Brevibacterium* basé sur les séquences d'ADNr 16S, utilisant la méthode "Neighbor-Joining".

L'arbre a été enraciné en utilisant 2 espèces *Glutamicibacter arilaitensis* et *Corynebacterium casei* comme hors-groupes (◆). Les espèces de *Brevibacterium* sont marquées selon l'habitat où la souche type a été isolée, les numéros d'accèsion sont indiqués entre parenthèses. La valeur du "Bootstrap" est indiquée en pourcentage avant le nœud correspondant ; la barre d'échelle représente 1% de différence dans les séquences nucléotidiques.

Tableau 3. Caractères phénotypiques de 30 espèces du genre *Brevibacterium*^a.

Espèce	Souche type	Source d'isolation	Couleur de la colonie	Morphologie de colonie	Température de croissance			Tolérance en NaCl (%)	Ref.
					<12°C	25°C	37°C		
<i>B. album</i>	DSM 18261	Sol salin	Blanc	Rond, lisse	-	nd	+	15	[78]
<i>B. ammoniilyticum</i>	JCM 17537	Boue d'eau usée	Crème	Rond, convexe	-	+	+	11	[79]
<i>B. antiquum</i>	VKM Ac-2118	Sédiment de pergélisol	Orange	Lisse	+	+	-	18	[64]
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9175	Fromage	Orange	Lisse	+	+	-	15	[64]
<i>B. avium</i>	NCIMB 703055	Peau de volaille	Gris crème	Lisse	nd	+	+	nd	[80]
<i>B. casei</i>	CIP 102111	Lait fermenté	Gris crème	Lisse	nd	nd	+	15	[81]
<i>B. celere</i>	DSM 15453	Algue brune	Jaune crème	Lisse	+	+	+	15	[82]
<i>B. daeguense</i>	JCM 17458	Boue d'eau usée	Jaune pâle	Rond	+	+	+	5	[83]
<i>B. epidermidis</i>	DSM 20660	Homme (peau)	Jaune crème	Lisse	nd	nd	+	15	[81]
<i>B. iodium</i>	ATCC 49514	Lait	Crème avec points violets	Lisse	-	+	+	12	[84]
<i>B. jeotgali</i>	SJ5-8	Fruit de mer fermenté	Jaune	Rond, convexe	+	+	+	14	[85]
<i>B. linens</i>	ATCC 9172	Fromage	Orange	Lisse	f	+	f	10	[75]
<i>B. luteolum</i> ^b	DSM 15022	Homme (liquide péritonéal)	Jaune crème	Lisse	-	+	+	10	[86]
<i>B. marinum</i>	DSM 18964	Eau de mer	Jaune	Lisse	+	+	-	10	[87]
<i>B. mcbrellneri</i>	ATCC 49030	Homme (poils génitaux infectés)	Gris crème	Sec	-	f	+	6,5	[88]
<i>B. oceani</i>	BBH7	Sédiment de mer profonde	Orange	Visqueux	+	+	-	12	[89]
<i>B. otitidis</i>	ATCC 700348	Homme (oreille infectée)	Jaune crème	Lisse	-	nd	+	nd	[90]
<i>B. paucivorans</i>	DSM 13657	Homme (sang)	Gris crème	Lisse	-	nd	+	nd	[91]
<i>B. permense</i>	VKM Ac-2280	Sédiment de pergélisol	Orange	Lisse	f	+	+	18	[64]
<i>B. picturae</i>	DSM 16132	Peinture murale	Blanc	Rond, lisse	nd	+	v	15	[92]
<i>B. pityocampae</i>	DSM 21720	Chenille	Jaune	Rond	nd	+	+	10	[93]
<i>B. ravenspurghense</i> ^c	DSM 21258	Homme (blessure)	nd	Convexe	nd	nd	nd	nd	[94]
<i>B. salitolerans</i>	TRM 415	Sédiment de lac salé	Jaune blanc	Rond, lisse	-	+	+	18	[95]
<i>B. samyangense</i>	SST-8	Sédiment de plage	Crème	Lisse	+	+	+	15	[96]
<i>B. sandarakinum</i>	DSM 22082	Mur intérieur	Orange	nd	+	+	-	10	[97]
<i>B. sanguinis</i>	DSM 15677	Homme (sang)	Gris crème	Visqueux ou lisse	nd	+	+	10	[98]
<i>B. sediminis</i>	DSM 102229	Sédiment de mer profonde	Jaune pâle	Rond, lisse, convexe	+	+	+	20	[99]
<i>B. senegalense</i>	JC43	Homme (fèces)	Translucide	Lisse	nd	f	+	nd	[100]
<i>B. siliguriense</i>	DSM 23676	Eau de rivière	Blanc	Rond, convexe	-	+	f	15	[101]
<i>B. yomogidense</i>	DSM 24850	Fumier de volaille	Jaune pâle	Rond, lisse, convexe	+	+	+	17	[102]

+ positif ; - négatif ; nd non déterminé ; f faiblement positif ; v variable

^aD'après la base de données LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) [103]; URL <http://www.bacterio.net/brevibacterium.html> (date 23/01/2018)

^bDans la publication originale, *B. luteolum* est nommé *B. lutescens*

^cD'après Bernard et coll. [104], *B. massiliense* est un synonyme hétérotypique de *B. ravenspurghense*

2. *Brevibacterium* et le fromage

Le genre *Brevibacterium* est étudié depuis longtemps pour son implication dans la production fromagère. *B. linens* est resté pendant longtemps le seul ferment d'affinage bactérien utilisé dans la fabrication des fromages à croûte lavée [105]. Différentes espèces de *Brevibacterium* sont retrouvées dans les fromages : *B. antiquum*, *B. aurantiacum*, *B. linens*, *B. casei* et également des *Brevibacterium* spp. Ces bactéries, par leurs activités métaboliques, participent activement au processus d'affinage.

a. Activité protéolytique

Les bactéries du genre *Brevibacterium* peuvent produire différents types d'enzymes protéolytiques qui sont extracellulaires, intracellulaires ou membranaires. Ces enzymes jouent un rôle important dans le développement des propriétés organoleptiques du fromage (Figure 6).

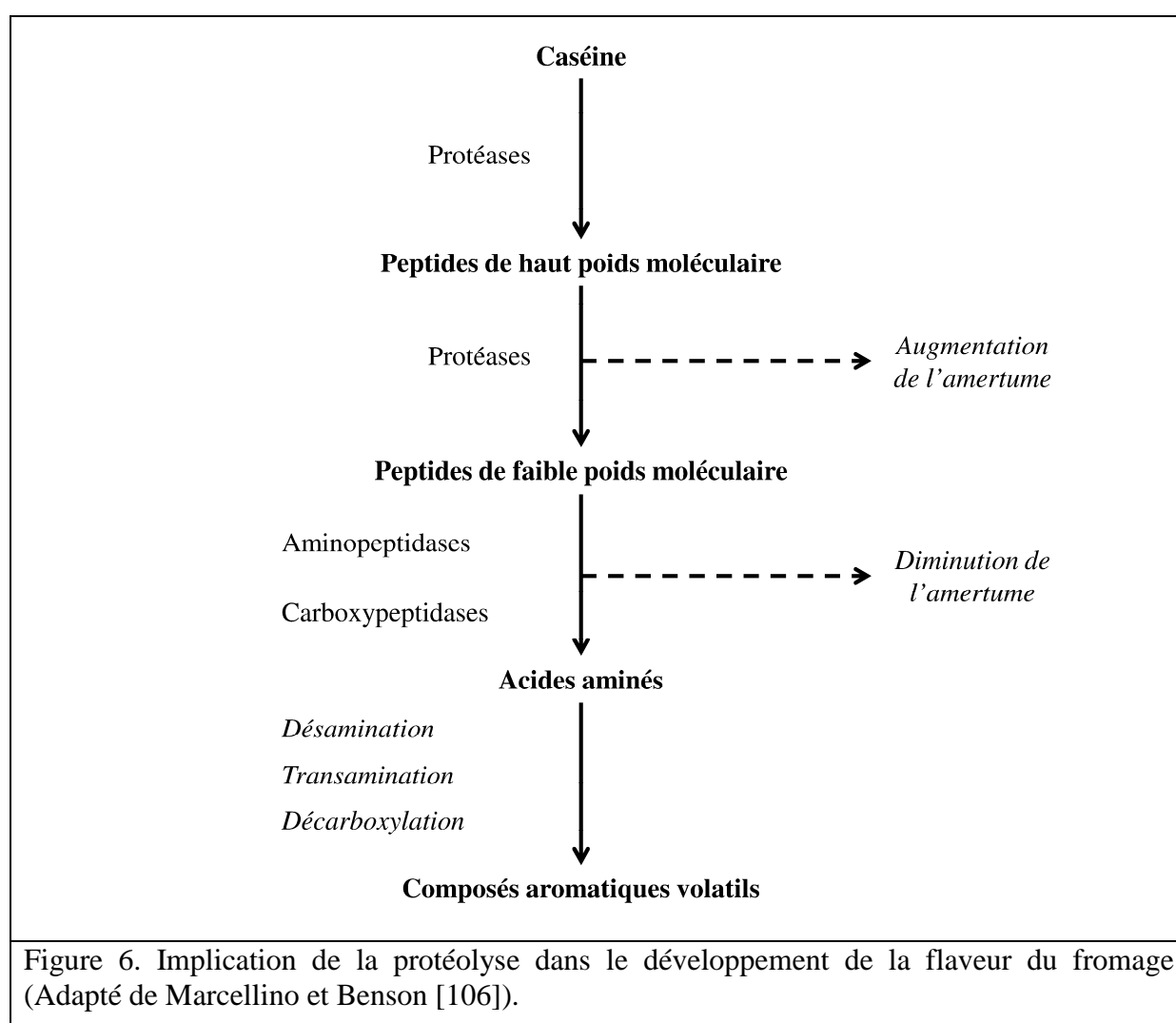


Figure 6. Implication de la protéolyse dans le développement de la saveur du fromage (Adapté de Marcellino et Benson [106]).

Plusieurs études ont montré la capacité et la diversité des bactéries du genre *Brevibacterium* dans la protéolyse, notamment dans l'hydrolyse des caséines du lait. Les premières études ont été menées par Albert et coll. [107] qui ont détecté la protéolyse par *B. linens* dans le lait tournesolé et le lait écrémé. Foissy [108], en utilisant un zymogramme électrophorétique, a mis en évidence l'activité protéolytique extracellulaire chez 15 souches de *Brevibacterium* et a noté une grande variation dans les profils d'électrophorèse entre les

souches. Frings et coll. [109] ont caractérisé l'hydrolyse de la caséine α_{S1} et de la caséine β par les 5 souches de *Brevibacterium* (ATCC 9174, DSM 20158, DSM 20425, DSM 20426 et LBT 102) en utilisant les techniques de SDS-PAGE et de HPLC. Différents profils d'hydrolyse ont été observés, mais dans tous les cas, la caséine β a été hydrolysée plus rapidement et complètement que la caséine α_{S1} . Inversement, l'étude menée par Coskun et Sienkiewicz [110] sur la souche *B. linens* FLK-61 a noté une hydrolyse plus rapide et complète pour la caséine α_{S1} .

Différentes protéases extracellulaires ont été caractérisées chez *Brevibacterium*, présentant une grande hétérogénéité de propriétés biochimiques entre les différentes souches et même au sein d'une seule souche (Tableau 4). La plupart de ces protéases sont des protéases à sérine et thermolabiles, à l'exception de la protéase caractérisée chez *B. linens* IMD 376 par Clancy et O'Sullivan [111], qui est une protéase à cystéine et thermostable. Rattray et coll. [112] ont purifié jusqu'à homogénéité une protéase extracellulaire chez *B. aurantiacum* ATCC 9174. Ses pH et températures optimaux sont respectivement de 8,5 et 50°C. Sa masse moléculaire a été estimée à 56 kDa par SDS-PAGE et à 126 kDa par filtration de gel, suggérant que l'enzyme native existe sous forme de dimère. L'ordre des 20 premiers acides aminés N-terminaux de la protéase a été déterminé. L'activité enzymatique est stimulée par Mg^{2+} , Ca^{2+} , NaCl et fortement inhibée par Hg^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} . La spécificité de cette protéase sur les caséines α_{S1} et β a été caractérisée [113, 114]. Elle présente une large spécificité pour les résidus d'acides aminés en positions P_1 et P'_1 (le site de clivage se situe entre P_1 et P'_1 , les positions P_n correspondent à la direction N-terminale et les positions P'_n à la direction C-terminale) mais a une préférence pour les résidus hydrophobes en positions P_2 , P_3 , P_4 , P'_2 , P'_3 et P'_4 . Tomaschova et coll. [115] ont purifié et caractérisé une protéase extracellulaire chez *B. linens* ATCC 9172. Cette dernière présente des caractéristiques similaires à celle caractérisée par Rattray et coll. [112] chez *B. aurantiacum* ATCC 9174 (en terme de pH et températures optimaux, de la masse moléculaire etc.). Différentes études ont été menées pour stimuler la production de protéases extracellulaires par *Brevibacterium* en modifiant les conditions de culture (par exemple la composition du milieu, la température, le pH) [116–120]. En utilisant une approche multifactorielle, Shabbiri et coll. [121] ont augmenté de deux fois la production de protéase extracellulaire par *B. linens* DSM 20158.

Certaines aminopeptidases extracellulaires ont été mises en évidence chez *Brevibacterium*, possédant des propriétés biochimiques différentes (Tableau 4). Les études d'inhibition et de spécificité ont montré que ces aminopeptidases sont des métalloenzymes et dans plusieurs cas, ont une forte préférence pour les dipeptides possédant un résidu leucine en position N-terminale [122–124].

Les bactéries du genre *Brevibacterium* produisent aussi des enzymes protéolytiques intracellulaires et membranaires, dont les activités sont relativement limitées par rapport à celles des enzymes extracellulaires [125]. Néanmoins, les enzymes intracellulaires peuvent être libérées lors de l'autolyse des cellules et ainsi participer au processus d'affinage. L'activité protéolytique intracellulaire chez *Brevibacterium* a été démontrée par Foissy [108], ainsi que Torgersen et Sørhaug [126]. Différentes aminopeptidases intracellulaires ont été caractérisées chez *Brevibacterium* (Tableau 4). Rattray et Fox [127] ont purifié et caractérisé une aminopeptidase intracellulaire chez *B. aurantiacum* ATCC 9174. Ses pH et températures optimaux sont respectivement de 8,5 et 35°C. Sa masse moléculaire a été estimée à 59 kDa par SDS-PAGE et à 69 kDa par filtration de gel, suggérant que l'enzyme native existe sous forme de monomère. L'ordre des 19 premiers acides aminés N-terminaux de cette aminopeptidase a été déterminé. L'activité enzymatique est fortement inhibée par l'agent bloquant les groupements thiols, le p-hydroxymercuribenzoate et les ions Co^{2+} , Zn^{2+} . Cette aminopeptidase hydrolyse les dipeptides possédant un résidu alanine en N-terminal mais est inactive sur les tripeptides. Enfin, la présence de protéases associées à la paroi chez

Brevibacterium a été mise en évidence par Ezzat et coll. [128], ainsi que Buchinger et coll. [129].

Tableau 4. Propriétés biochimiques des enzymes protéolytiques caractérisées chez *Brevibacterium*.

Classe	Souches	Nombre d'enzymes	Type	Température optimale (°C)	pH optimal	Masse moléculaire (kDa)	Ref.
Protéase extracellulaire	<i>B. linens</i> 450	2 ^a	nd ^b	38	7,2	nd	[116]
	<i>B. linens</i> (non spécifié)	1	nd	25	7,0	nd	[117]
	<i>B. linens</i> (Laktoflora 200)	4	Protéase à sérine	50	5,0-8,0	nd	[123]
	<i>B. linens</i> (Laktoflora 200)	1	Protéase à sérine	45	7,0-8,5	52-55 ^c	[130]
	<i>B. linens</i> F	5	Protéase à sérine	40	11,0	37 ^d	[131]
				40	11,0	37 ^d	
				55	11,0	44 ^d	
				55	11,0	127 ^d	
				55	11,0	325 ^d	
	<i>B. linens</i> IMD 376	1	Protéase à cystéine	67,5	7,5	18,5 ^d	[111]
<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174 ^e	1	Protéase à sérine	50	8,5	56 ^c ; 126 ^d	[112]	
<i>B. linens</i> ATCC 9172	5 ^f	Protéase à sérine	50	8,0	56 ^c	[115]	
Aminopeptidase extracellulaire	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174 ^e	1	Métalloprotéase	26-30	9,6	48 ^c	[122]
	<i>B. linens</i> (Laktoflora 200)	3	Métalloprotéase	30	7,0-9,0	nd	[123]
	<i>B. linens</i> F	2	Métalloprotéase	40	9,3	36 ^c ; 150 ^d	[124]
40				9,3	26 ^c ; 110 ^d		
Aminopeptidase intracellulaire	<i>B. linens</i> HS	1	nd	30	7,5	nd	[132]
	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174 ^e	1	Protéase à cystéine	35	8,5	59 ^c ; 69 ^d	[127]
	<i>B. linens</i> SR3	2	Métalloprotéase	45	8,5	14 ^c ; 80 ^d	[133]
				37	8,0	18 ^c ; 220 ^d	
<i>B. sp</i> E531	1	nd	nd	7,7-7,9	43 ^c ; >250 ^d	[134]	
Protéase membranaire	<i>B. linens</i> CNRZ 944	1	nd	40	6,5	nd	[128]

^aUne des deux protéases détectées a été caractérisée

^bNon déterminée

^cDéterminée par SDS-PAGE

^dDéterminée par filtration de gel

^ePrécédemment nommée *B. linens* ATCC 9174

^fUne des cinq protéases détectées a été purifiée et caractérisée

b. Activité lipolytique et estérasique

Les bactéries du genre *Brevibacterium* participent à la lipolyse du fromage en produisant différents types d'enzymes lipolytiques extracellulaires, intracellulaires ou membranaires. Les lipases constituent une sous-classe d'estérase, capables de libérer des acides gras à longue chaîne à partir des lipides [135]. Les activités lipolytiques et/ou estérasiques extracellulaires chez *Brevibacterium* ont été démontrées par Foissy [108], et San Clemente et Vadehra [136] ; alors que les activités intracellulaires et/ou membranaires ont été mises en évidence par Ezzat et coll. [128], Sørhaug et Ordal [137], El-Shafei et coll. [138], Lambrechts et Galzy [139], Adamitsch et Hampel [140], et Adamitsch et coll. [141]. Différents substrats ont été testés, tels que le α -naphtyle acétate, le β -naphtyle butyrate et la tributyrine. Le nombre de lipases et/ou d'estérases est très souche-dépendant. Par exemple, El-Shafei et coll. [138] ont testé l'activité estérasique intracellulaire chez 18 souches de *B. linens* en utilisant un zymogramme électrophorétique et ont détecté entre deux à six bandes d'estérase en fonction de la souche. L'influence des conditions de culture sur la biosynthèse de lipases et/ou d'estérases chez *Brevibacterium* a été étudiée par Lambrechts et Galzy [139], Adamitsch et Hampel [140], et Weimer et coll. [142].

Jusqu'à présent, seules les estérases intracellulaires ont été purifiées et caractérisées chez *Brevibacterium*. Lambrechts et coll. [143] ont détecté huit estérases intracellulaires de la souche *B. sp.* R312, dont trois ont été purifiées jusqu'à homogénéité. Ces estérases, appelées 4a, 2 et 4b, sont différentes l'une de l'autre au niveau de la température optimale (30°C, 36°C et 43°C, respectivement), la thermostabilité, la masse moléculaire (56 kDa, 45 kDa et 38 kDa, respectivement) et la spécificité de substrats. Toutes ces trois estérases sont plus spécifiques pour les esters courts. Une estérase de la souche *B. aurantiacum* ATCC 9174 a été purifiée par Rattray et Fox [144]. Ses pH et températures optimaux sont respectivement de 7,5 et 35°C. Sa masse moléculaire a été estimée à 54 kDa par SDS-PAGE et à 201 kDa par filtration de gel, suggérant que l'enzyme native existe sous forme de tétramère. L'ordre des 19 premiers acides aminés N-terminaux de l'estérase a été déterminé. Cette estérase hydrolyse les esters β -naphtyle des acides acétiques (C2:0), butyriques (C4:0), caproïques (C6:0), capryliques (C8:0) et capriques (C10:0), mais pas des acides lauriques (C12:0), myristiques (C14:0), palmitiques (C16:0) et oléiques (C18:1).

c. Production de substances antimicrobiennes

Les bactéries du genre *Brevibacterium* peuvent produire des substances antimicrobiennes qui inhibent différents microorganismes dont des microorganismes d'altération et/ou pathogènes. Des capacités antibactériennes ou antifongiques chez différentes souches de *Brevibacterium* ont été mises en évidence par plusieurs études (Tableau 5).

Les premières études concernant l'activité antibactérienne de *Brevibacterium* ont été menées par Grecz et coll. [145]. Ces auteurs ont trouvé que les surnageants de culture des deux souches *B. aurantiacum* ATCC 9174 et ATCC 9175 pouvaient inhiber le développement de spores de *Clostridium botulinum* type A. L'agent inhibiteur a été partiellement caractérisé mais il n'a pas été purifié. C'est une substance thermostable qui reste toujours active après un traitement thermique de 121°C pendant 25 minutes.

Martin et coll. [146] ont détecté un agent antibactérien produit par trois souches de *B. linens* isolées de la saumure utilisée pour le salage. Cet agent est actif contre *Listeria monocytogenes*, et l'effet est bactériostatique ou bactéricide selon les souches de *L. monocytogenes* testées. L'agent antibactérien est capable de traverser une membrane de 1 kDa

et reste actif après un traitement thermique de 80°C pendant 30 minutes à pH acide. Il reste aussi actif après un traitement par une protéase, une lipase ou une catalase.

Tableau 5. Substances antimicrobiennes produites par *Brevibacterium*.

Classe	Agent antimicrobien	Souche productrice	Effet ou mode d'action	Spectre antimicrobien	Masse moléculaire (kDa)	Ref.
Bactériocine	Linecine A	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	nd ^a	<i>Brevibacterium</i>	95 ^b	[147]
	Linocine M18	<i>B. linens</i> M18	nd	<i>Listeria spp.</i> , <i>Actinobacteria</i> , d'autres bactéries à Gram positif	>2000 ^b ; 31 ^c	[148]
	Sans nom	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^d	Bactériostatique à faible dose ; Bactéricide à dose élevée	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>B. linens</i> , <i>Corynebacterium fimi</i>	nd	[149]
Autre substance antibactérienne	Sans nom	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174 et ATCC 9175 ^d	nd	<i>Clostridium botulinum</i>	nd	[145]
	Sans nom	3 souches de <i>B. linens</i> (isolées de la saumure)	Bactériostatique ou bactéricide en fonction de la souche de <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<1	[146]
	Linenscine OC2	<i>B. linens</i> OC2	Formation de pores dans la membrane cytoplasmique ; Perturbation de la biosynthèse de peptidoglycane ; Induction de l'autolyse	Bactéries à Gram positif, y compris <i>Listeria spp.</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	>285 ^b ; 2,412 ^c ; 1,196 ^e	[150– 152]
Substance antifongique	Méthanethiol	<i>B. linens</i> ATCC 8377	Inhibition de la sporulation	<i>Penicillium expansum</i> ,	48,11 g/mol ^f	[153]
		<i>B. linens</i> ATCC 8377, ATCC 9172, PKS	nd	<i>Penicillium roqueforti</i>		[154]
	Sans nom	<i>B. linens</i> (isolée du fromage Domiat)	Inhibition de la croissance et de la sporulation	<i>Aspergillus flavus</i>	nd	[155]

^aNon déterminée

^bDéterminée par filtration de gel

^cDéterminée par SDS-PAGE

^dPrécédemment nommée *B. linens* ATCC 9174 et/ou ATCC 9175

^eDéterminée par spectrométrie de masse

^fMasse molaire

Ryser et coll. [156] ont isolé de la surface du fromage Gruyère de Comté la souche *B. linens* OC2 qui montre une forte inhibition contre 21 souches de *Listeria spp.*, y compris 14

souches de *Listeria monocytogenes*. La substance inhibitrice a été ensuite purifiée jusqu'à homogénéité et nommée la linenscine OC2 par Maisnier-Patin et Richard [150]. Il s'agit d'une molécule hydrophobe, thermostable, résistante aux enzymes protéolytiques et stable sur une large gamme de pH. Sa masse moléculaire a été estimée à 2412 Da par SDS-PAGE, 1196,7 Da par spectrométrie de masse et 285 kDa par filtration de gel, suggérant que la substance native existe sous forme de polymère et/ou associée avec d'autres macromolécules. D'après l'analyse par HPLC, la linenscine OC2 est un peptide qui comporte entre 11 à 12 résidus d'acides aminés, riche en proline (4 à 5 résidus) et dont la majorité des résidus (90%) sont hydrophobes et non chargés. La linenscine OC2 n'est pas une bactériocine *sensu stricto* en raison de sa résistance aux enzymes protéolytiques, cependant vu sa nature peptidique, elle est parfois classée comme une bactériocine [125]. Elle inhibe de nombreuses bactéries à Gram positif dont les pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, mais elle n'a pas d'effet sur les bactéries à Gram négatif. Elle exerce aussi un effet hémolytique sur les érythrocytes de mouton [151]. Le mode d'action de cette substance a été déterminé par Boucabeille et coll. [151, 152]. La linenscine OC2 interagit avec la membrane cytoplasmique des cellules cibles pour former des structures poreuses qui entraînent la fuite des cations (K^+) et des anions (HPO_4^{2-}). Elle inhibe également la biosynthèse de peptidoglycane et induit l'autolyse des cellules cibles. Cependant, l'existence d'une sous-population de l'ordre de 10^{-4} de cellules résistantes à la linenscine OC2 au sein des souches de *L. innocua* ou de *S. aureus* a été observée par Siswanto et coll. [157].

Différentes bactériocines (c'est-à-dire des peptides ou protéines antimicrobiens synthétisés par des bactéries) ont été purifiées et caractérisées chez *Brevibacterium*. Kato et coll. [158] ont découvert la linecine, produite par *B. aurantiacum* ATCC 9175 et une souche de *B. linens* (non spécifiée). Elle est capable d'inhiber la croissance d'autres souches de *Brevibacterium* telles que *B. linens* ATCC 8377 et *B. linens* ATCC 9172. La bactériocine produite par *B. aurantiacum* ATCC 9175 a été ensuite purifiée jusqu'à homogénéité et nommée la linecine A [147]. Cette bactériocine est thermolabile (inactivation à 45°C pendant 60 minutes) et sensible à certaines enzymes protéolytiques (la protéinase K et la pronase E) mais assez résistante à la trypsine. Sa masse moléculaire a été estimée à 95 kDa par filtration de gel. La linecine A est riche en glycine (16,8%) et en alanine (11,4%) et contient une faible teneur en acides aminés basiques (environ 9%). La bactériocine existe sous forme extracellulaire et intracellulaire, l'ajout de la mitomycine C dans le milieu de culture induit la libération de la linecine A et augmente la quantité de la forme extracellulaire jusqu'à 15 fois.

La deuxième bactériocine identifiée chez *Brevibacterium* est la linocine M18, découverte par Valdes-Stauber et Scherer [148]. Elle a été purifiée du surnageant de culture de *B. linens* M18, une souche isolée du fromage. La bactériocine est thermolabile (inactivation à 80°C pendant 5 minutes), sensible à plusieurs enzymes protéolytiques y compris la trypsine et stable sur une large gamme de pH. Sa masse moléculaire a été estimée à 31 kDa par SDS-PAGE, mais la bactériocine native existe sous forme de grand agrégat (>2000 kDa). La séquence d'acides aminés N-terminale de la linocine M18 a été déterminée, ce qui a ensuite permis l'identification du gène de structure *lin* codant pour la bactériocine [159]. Ce gène se trouve sur le chromosome de *B. linens* M18 en une seule copie, il s'agit d'un cadre de lecture ouvert (ORF en Anglais : Open Reading Frame) de 798 paires de base codant pour un peptide de 266 acides aminés. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR en Anglais : Polymerase Chain Reaction) a montré sa large distribution parmi les bactéries de la classe *Actinobacteria*. La linocine M18 présente un large spectre d'activité antibactérienne contre différentes espèces des genres *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus* et *Listeria* [148, 160]. Son activité contre *Listeria* spp. est particulièrement intéressante pour l'industrie fromagère. Eppert et coll. [161] ont démontré dans un fromage modèle l'effet de la linocine M18 dans l'inhibition contre la croissance de *Listeria ivanovii* et *Listeria monocytogenes*.

Motta et Brandelli [149] ont identifié une troisième bactériocine chez *Brevibacterium* dans le surnageant de culture de la souche *B. aurantiacum* ATCC 9175. Elle est thermolabile (inactivation à 50°C pendant 30 minutes), sensible à plusieurs enzymes protéolytiques (la trypsine, la pronase E et la papaïne) et n'est stable que dans la gamme de pH 6,0 à 9,0. Cette bactériocine inhibe la croissance de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Corynebacterium fimi* NCTC 7547 et *B. linens* ATCC 9172. Son effet sur *L. monocytogenes* est bactériostatique à faible dose (20 AU/ml) et bactéricide à dose élevée (40 AU/ml). La production de la bactériocine est stimulée en présence de sel dans le milieu de culture (40 à 80 g/l) et par une température de croissance de 25°C [162].

En plus des activités antibactériennes, les bactéries du genre *Brevibacterium* présentent aussi des activités antifongiques. L'effet inhibiteur du méthanthiol produit par *Brevibacterium* sur différentes espèces du genre *Penicillium* a été mis en évidence par Lewis [154], et Beattie et Torrey [153]. Osman [155] a démontré l'inhibition contre *Aspergillus flavus* par une souche de *B. linens* isolée du fromage Domiati. L'influence de différents facteurs tels que la température, le pH, la lumière, les enzymes protéolytiques, le milieu de culture etc. sur l'activité antifongique a été caractérisée. L'agent antifongique est thermostable, résistant aux enzymes protéolytiques et il est plus actif au pH alcalin.

d. Production de pigments

La couleur rouge orangé caractéristique de la croûte fromagère de plusieurs variétés de fromage telles que le Munster, le Livarot et le Limburger est principalement due aux pigments produits par des bactéries de surface, y compris différentes espèces du genre *Brevibacterium* [163]. Kohl et coll. [164] ont identifié par spectrométrie de masse les trois pigments produits par *B. linens* : l'isorenieratène, le 3-hydroxy-isorenieratène et le 3,3'-dihydroxy-isorenieratène, ce dernier étant le produit majoritaire (Figure 7). L'isorenieratène et ses dérivés hydroxylés sont des caroténoïdes aromatiques relativement rares, d'où leur utilisation comme un marqueur chimiotaxonomique [125, 164]. Les pigments caroténoïdes jouent un rôle important dans la protection de la cellule contre la photo-oxydation [165]. Les gènes codant pour la voie de biosynthèse de ces pigments chez *B. aurantiacum* ATCC 9175 ont été identifiés et caractérisés par Krubasik et Sandmann [166]. Ces gènes font partie du cluster *crt*, codant pour toutes les enzymes nécessaires à la formation de ces pigments à partir de l'isopentényl-pyrophosphate (IPP). Cela implique l'action successive d'une IPP isomérase, Idi ; d'une géranyl-géranyl-pyrophosphate (GGPP) synthase, CrtE ; d'une phytoène synthase, CrtB ; d'une phytoène désaturase, CrtI ; d'une lycopène cyclase, CrtYcd ; d'une β -carotène désaturase, CrtU et enfin d'une cytochrome P450 (Figure 7) [166, 167]. Le cluster *crt* contient aussi un gène probablement lié à la régulation lumière-dépendante de la biosynthèse des pigments, *crtK*, et un gène probablement lié à la protection de l'ADN contre les rayons d'UV, *phr* [166].

Plusieurs études ont montré l'influence de différents facteurs sur la production des pigments chez *Brevibacterium*, tels que la composition du milieu de culture [107, 168], l'oxygénation [168], la concentration en NaCl et le pH [169]. L'effet de la lumière sur la pigmentation de *Brevibacterium* a été mis en évidence par Mulder et coll. [69], et De Valdez et coll. [170], ce qui a permis de distinguer deux groupes : le premier groupe contient les souches qui sont de couleur crème quand elles croissent à l'obscurité mais se colorent en orange à la lumière, alors que le deuxième regroupe les souches qui sont de couleur orange dans les deux cas. Guyomarc'h et coll. [171] ont caractérisé la pigmentation chez différentes souches de *Brevibacterium* par spectrocolorimétrie. En comparant les paramètres colorimétriques de chacune des souches dans les deux conditions, à l'obscurité et à la lumière, les auteurs ont distingué trois groupes de *Brevibacterium*. Le premier contient des souches non sensibles à la lumière, c'est-à-dire leurs pigmentations sont similaires dans les deux cas

(par exemple la souche *B. linens* ATCC 19391). Le deuxième regroupe des souches positivement sensibles à la lumière, c'est-à-dire que leurs pigmentations sont plus intenses en présence de lumière (par exemple la souche *B. linens* ATCC 9172). Le troisième groupe comprend des souches négativement sensibles à la lumière, c'est-à-dire leurs pigmentations sont plus intenses lorsqu'elles croissent à l'obscurité (par exemple la souche *B. aurantiacum* ATCC 9175). D'autres études ont montré que la pigmentation chez *Brevibacterium* est également influencée par la présence des autres microorganismes, tels que la levure *Debaryomyces hansenii* [169, 172].

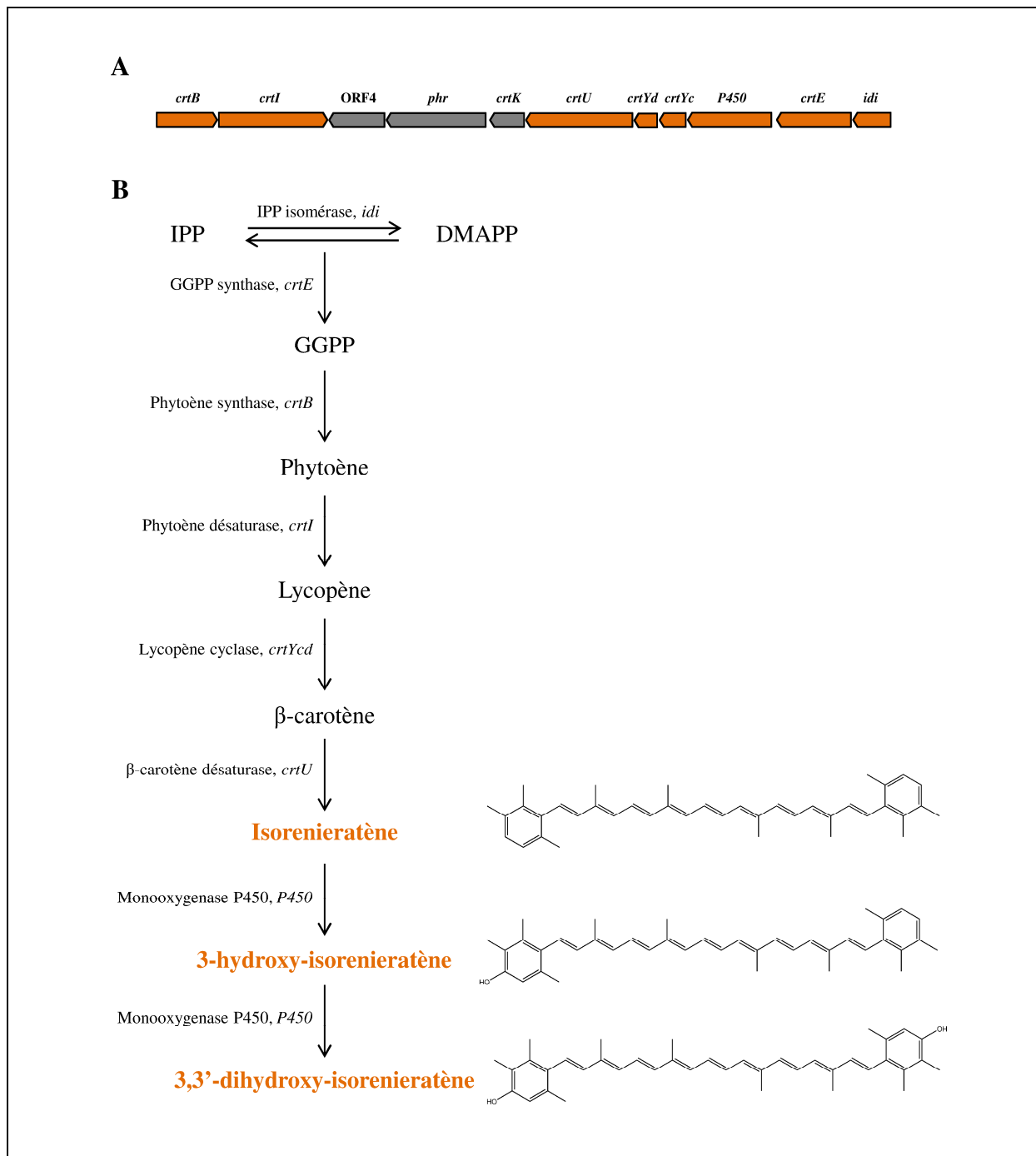


Figure 7. Production de pigments caroténoïdes chez *Brevibacterium*.

A. Organisation du cluster *crt* chez *B. aurantiacum* ATCC 9175. Les gènes codant pour la biosynthèse des pigments sont colorés en orange. **B.** Voie de biosynthèse des pigments chez *Brevibacterium* à partir de l'IPP. La structure chimique de chacun des 3 pigments, l'isorenieratène, le 3-hydroxy-isorenieratène et le 3,3'-dihydroxy-isorenieratène, est indiquée. IPP : isopentényl-pyrophosphate ; DMAPP : diméthylallyl-pyrophosphate ; GGPP : géranylgeranyl-pyrophosphate.

La pigmentation chez différentes souches de *Brevibacterium* est aussi très hétérogène en terme de quantité de pigments produits [173, 174]. La spectrocromimétrie s'est révélée une méthode adéquate pour une estimation rapide de la production de pigments par *Brevibacterium* [174].

e. Production de composés aromatiques

Les bactéries du genre *Brevibacterium* participent activement au développement des saveurs caractéristiques dans différents fromages en produisant une large gamme de composés aromatiques, en particulier les CSVs [175]. Les CSVs comprennent plusieurs molécules de structures diverses et qui ont des bas seuils de détection olfactive. Ils contribuent à l'odeur "fromage" mais peuvent aussi générer des notes aromatiques spécifiques telles que "ail", "chou" ou "oignon". La production de différents CSVs a été mise en évidence chez les bactéries du genre *Brevibacterium* (Tableau 6), qui sont, parmi les bactéries d'intérêt technologique, celles qui produisent les plus grandes quantités et variétés de CSVs [176]. La production de CSVs chez *Brevibacterium* est aussi très souche-dépendante [177, 178]. La plupart de ces composés sont issus de la dégradation de la L-méthionine en méthanthiol (MTL), ce dernier est le précurseur commun d'autres classes de CSVs telles que les sulfures ou les S-méthylthioesters (Figure 8). La L-méthionine peut être synthétisée *de novo* ou incorporée à partir du milieu par *Brevibacterium* [179]. Un transporteur de la L-méthionine a été caractérisé chez *B. antiquum* CNRZ 918, il est constitutif et stimulé en présence de Na⁺ [180, 181].

Tableau 6. Composés soufrés volatils produits par *Brevibacterium*.

Classe	Composé	Espèce productrice	Note aromatique	Ref.
Thiol	Méthanthiol	<i>B. linens</i> , <i>B. antiquum</i> , <i>B. aurantiacum</i>	Chou cuit / fermenté ^a	[176, 178, 182–185]
Sulfure	Sulfure d'hydrogène	<i>B. linens</i>	Œuf pourri ^a	[186]
	Sulfure de diméthyle (DMS)	<i>B. aurantiacum</i>	Chou ^a	[176, 183]
	Disulfure de diméthyle (DMDS)	<i>B. linens</i> , <i>B. antiquum</i> , <i>B. aurantiacum</i>	Chou-fleur, ail, fromage très affiné ^a	[176, 178, 182–185]
	Trisulfure de diméthyle (DMTS)			
Thioéther	2,4-dithiapentane (DTP)	<i>B. aurantiacum</i>	Ail, soufré ^b	[175, 182, 183]
	2,3,5-trithiahexane (TTH)		Épicé ^b	[175, 182]
Thioester	S-méthylthioacetate (MTA)	<i>B. linens</i> , <i>B. antiquum</i> , <i>B. aurantiacum</i>	Chou-fleur cuit ^a	[176, 178, 184, 185, 187, 188]
	S-méthylthiopropionate (MTP)		Fromage ^a	
	S-méthylthiobutyrate (MTB)		Ciboulette ^a	
	S-méthylthioisovalérate (MTiV)		Laitier ^b	
	S-méthylthioisobutyrate (MTiB)		Fruité ^b	

^aD'après Weimer et coll. [189]

^bD'après les descriptions sur PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

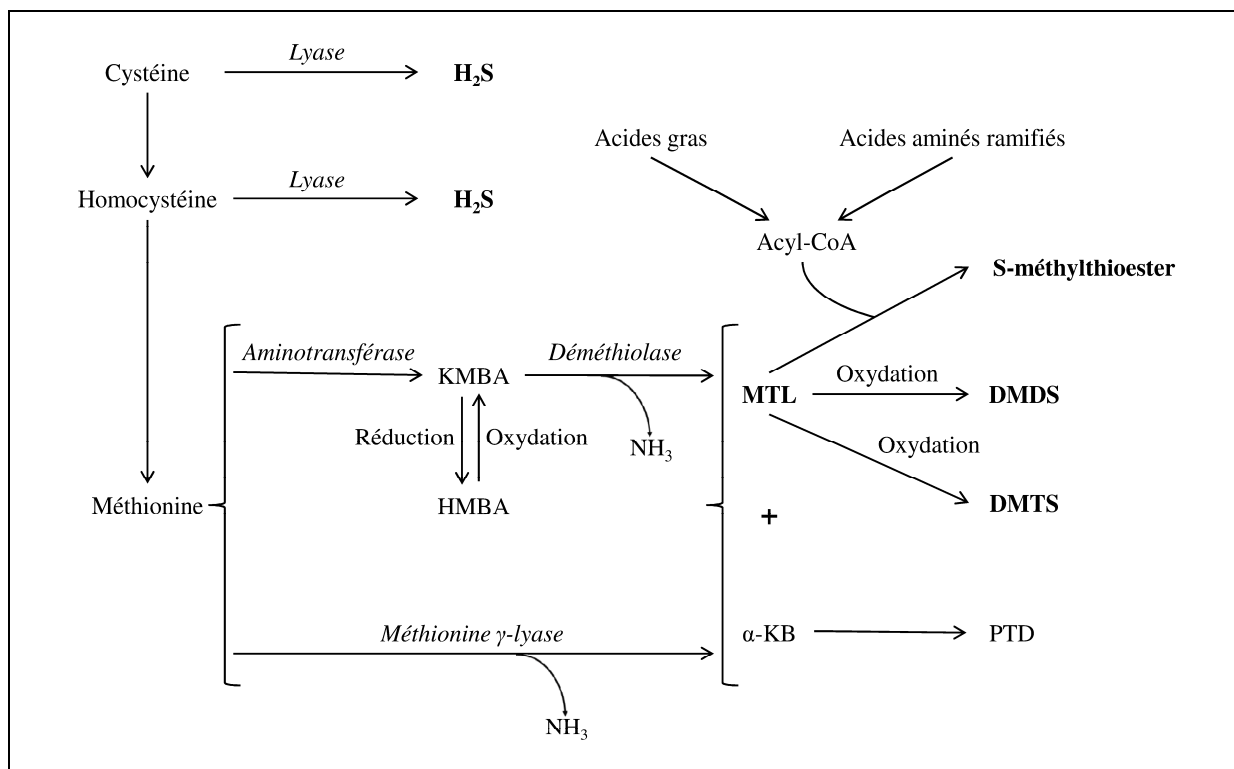


Figure 8. Voies de biosynthèse de composés soufrés volatils (CSVs) chez *Brevibacterium*.

Les CSVs sont indiqués en gras. KMBA : acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique ; HMBA : acide α-hydroxy-γ-méthylthiobutyrique ; MTL : méthanthiol ; DMDS : disulfure de diméthyle ; DMTS : trisulfure de diméthyle ; α-KB : α-céto-butyrates ; PTD : 2,3-pentanedione.

Production de MTL

Le MTL est considéré comme un constituant essentiel de l'arôme caractéristique du fromage Cheddar [190]. Son point d'ébullition est de 6,2°C, il est souvent associé aux odeurs "chou cuit" ou "chou fermenté" [189]. La production de MTL par *Brevibacterium* a été l'objet de plusieurs études. Il a été observé que la quantité maximum de MTL est produite en phase exponentielle de croissance, lorsque les cellules de *Brevibacterium* sont en forme de bacille [191, 192]. La production de MTL chez *Brevibacterium* augmente en présence de la L-méthionine ou de peptides contenant des résidus de méthionine, suggérant une induction du système de biosynthèse de MTL sous ces conditions [142, 180, 184, 193]. Le glucose favorise la croissance mais inhibe la production de MTL chez *B. antiquum* CNRZ 918, alors que le lactate favorise en même temps la croissance et la production de MTL [192].

Chez *Brevibacterium*, deux voies de dégradation de la L-méthionine en MTL ont été identifiées : une voie directe par une désamination et une déméthylation simultanées de la L-méthionine sous l'action d'une L-méthionine γ-lyase (MGL, EC 4.4.1.11), et une deuxième voie en deux étapes qui implique successivement une transamination de la L-méthionine pour former l'acide α-céto-γ-méthylthiobutyrique (KMBA) puis une déméthylation de ce dernier en MTL (Figure 8) [194].

La voie directe impliquant la MGL est majoritaire chez *Brevibacterium* et a été bien caractérisée [178]. La MGL est une enzyme dépendante du phosphate de pyridoxal (PLP), elle catalyse l'élimination α,γ de la L-méthionine pour former le MTL, l'α-céto-butyrates (α-KB) et l'ammoniac [195]. L'α-KB peut être converti en propionyl-CoA et en succinyl-CoA, ainsi être métabolisé par le cycle de Krebs [183] ; ou être dégradé en 2,3-pentanedione (PTD), un composé aromatique qui donne des notes "fromage", "caramel" ou encore "fruit" [185]. La MGL est également active sur d'autres substrats tels que l'éthionine, la L-cystéine,

l'homocystéine, la S-méthylcystéine ou la O-acétylsérine [195]. Collin et Law [196] ont partiellement purifié et caractérisé une MGL chez *B. linens* NCDO 739. Ses pH et températures optimaux sont respectivement de 8,0 et 20°C, sa masse moléculaire a été estimée à 175 kDa par filtration de gel. Ensuite, Dias et Weimer [197] ont purifié une MGL chez *B. linens* BL2. Ses pH et températures optimaux sont respectivement de 7,5 et 25°C, l'enzyme native existe sous forme de tétramère de quatre sous-unités identiques de 43 kDa. Elle est active dans les conditions physico-chimiques proches de celles de l'affinage des fromages (température, pH, concentration en NaCl), mais sensible à la protéolyse. Le gène *mgl* codant pour une MGL chez *B. aurantiacum* ATCC 9175 a été identifié et caractérisé par Amarita et coll. [183], ce gène présente des similitudes de séquence avec d'autres familles de gènes codant pour des cystathionines γ -synthases (CGSs) ou des cystathionines γ -lyases (CGLs). L'expression du gène *mgl* est induite en présence de la L-méthionine, ce qui implique une augmentation significative de la production de CSVs [179, 182].

D'autre part, l'existence de la voie de production du MTL en deux étapes *via* l'intermédiaire métabolique qui est le KMBA chez *Brevibacterium* reste encore incertaine. Même si l'activité de la L-méthionine aminotransférase a été détectée chez *Brevibacterium* [175, 194], l'absence du KMBA et de sa forme réduite, l'acide α -hydroxy- γ -méthylthiobutyrique (HMBA) suggère que l'étape de transamination de la L-méthionine est inactive, au moins dans les conditions expérimentales [178, 185]. Trois aminotransférases ont été détectés chez *B. linens* 47, deux d'entre elles ont été partiellement purifiées et classées comme une aminotransférase d'acides aminés aromatiques (EC 2.6.1.57) et une aspartate aminotransférase (EC 2.6.1.1) [198]. Aucune de ces aminotransférases n'a été testée avec la L-méthionine comme substrat. Concernant l'étape de la déméthiolation du KMBA, l'activité de la KMBA déméthiolase chez *Brevibacterium* a été mise en évidence [178, 194]. Elle représente environ 90% de la conversion du KMBA en MTL, contre 10% de façon spontanée par la voie chimique [194]. Il a été suggéré que, même si les bactéries du genre *Brevibacterium* ne produisent pas de KMBA et de HMBA, elles pourraient utiliser ces intermédiaires métaboliques produits par d'autres microorganismes présents dans le fromage (par exemple la levure *Geotrichum candidum*) comme précurseurs pour la production de CSVs [178, 185].

Production de sulfures et de thioesters

Arfi et coll. [185] ont démontré par un traçage au carbone 13 que des sulfures tels que le disulfure de diméthyle (DMDS), le trisulfure de diméthyle (DMTS) et des S-méthylthioesters produits par *Brevibacterium* ont pour précurseur commun le MTL. Parmi les sulfures, le DMDS et le DMTS sont issus d'une auto-oxydation non enzymatique, ascorbate- et fer-dépendante du MTL [199]. Ils ont des notes aromatiques de type "chou-fleur", "ail" ou "fromage très affiné", alors que le sulfure de diméthyle (DMS) possède des notes de type "chou" [189]. La production de DMS a aussi été détectée chez *Brevibacterium* [176], mais il est probablement généré *via* une voie métabolique différente de celle qui implique le MTL, par exemple *via* la dégradation de la S-méthylméthionine (SMM) ou *via* la méthylation du sulfure d'hydrogène (H₂S) [200]. Le DMDS a été identifié dans de nombreuses études comme le CSV principal produit par *Brevibacterium* [175, 176, 178, 194].

Certaines souches de *Brevibacterium* sont aussi capables de produire les S-méthylthioesters, tels que le S-méthylthioacetate (MTA), S-méthylthiopropionate (MTP), le S-méthylthiobutyrate (MTB) et le S-méthylthioisovalerate (MTiV) [178, 184, 185]. Ils possèdent des notes aromatiques de type "chou-fleur cuit", "fromage", "ciboulette" etc. ; l'odeur spécifique de chaque composé dépend de la longueur de la chaîne carbonée et de la configuration de la molécule [189]. Les voies de biosynthèse de S-méthylthioesters chez *Brevibacterium* ont été mises en évidence : ces composés ont pour précurseurs le MTL, des

acides gras et des acides aminés ramifiés comme la leucine ou la valine [188]. La formation des acyl-CoAs est l'étape primordiale de la biosynthèse des S-méthylthioesters : elle est catalysée par des acyl-CoA synthases en présence des acides gras et/ou des aminotransférases et des α -cétoacides déshydrogénases en présence des acides aminés. Différents acyl-CoAs peuvent être générés sous l'action des enzymes de la β -oxydation. La dernière étape est une réaction chimique et/ou enzymatique entre l'acyl-CoA et le MTL pour former le S-méthylthioester correspondant (Figure 8).

Les bactéries du genre *Brevibacterium* sont aussi capables de produire des composés volatils autres que les CSVs. Ceux-ci incluent des acides gras volatils (par exemple l'acide acétique, l'acide n-butyrique et l'acide isovalérique), des composés carbonylés volatils (par exemple la formaldéhyde, l'acétaldéhyde et l'acétone) et des alcools (par exemple l'éthanol, l'isobutanol et l'isopropanol) [175, 201–203].

Dans la première section, notamment la partie I-B-2, nous avons vu en quoi les bactéries d'affinage du genre *Brevibacterium* sont particulièrement intéressantes pour l'industrie fromagère. Elles participent au développement des propriétés organoleptiques de différents fromages *via* la protéolyse, la lipolyse, la production de pigments caroténoïdes et de CSVs, et elles contribuent également à la limitation des microorganismes indésirables *via* la production de substances antimicrobiennes. Cependant, malgré leurs diverses propriétés fonctionnelles d'intérêt technologique, de nombreuses études ont montré que les bactéries du genre *Brevibacterium*, volontairement inoculées comme ferment d'affinage, ont des difficultés à s'implanter à la surface des fromages, celle-ci étant alors principalement colonisée par des souches adventices qui ont une meilleure capacité d'adaptation [28, 50, 204–206]. D'où l'importance de la compréhension des facteurs qui influencent la croissance des microorganismes à la surface des fromages, ce qui fait l'objet de la section suivante.

II. Facteurs impliqués dans la croissance des microorganismes à la surface des fromages

On distingue deux groupes de facteurs qui agissent sur la croissance des microorganismes à la surface des fromages : les facteurs abiotiques (non vivants) et les facteurs biotiques (vivants).

Les facteurs abiotiques représentent les conditions physico-chimiques du fromage, soit intrinsèques telles que le pH, la teneur en eau et les substrats énergétiques présents dans le fromage, soit extrinsèques telles que la température, l'humidité relative et l'aération de la cave d'affinage. On parle donc de la réponse des microorganismes aux conditions environnementales du milieu fromager.

Les facteurs biotiques, quant à eux, signifient la présence des autres microorganismes que celui en question, ce qui exerce sur lui une influence bénéfique, néfaste ou encore neutre. On parle donc des interactions microbiennes dans le fromage. Il faut également tenir compte

que, dans plusieurs cas, l'influence qu'exerce une population ou communauté sur une autre population ou communauté se fait *via* les transformations physico-chimiques que la première apporte au milieu. La discrimination entre les facteurs abiotiques et biotiques n'est donc pas toujours très explicite.

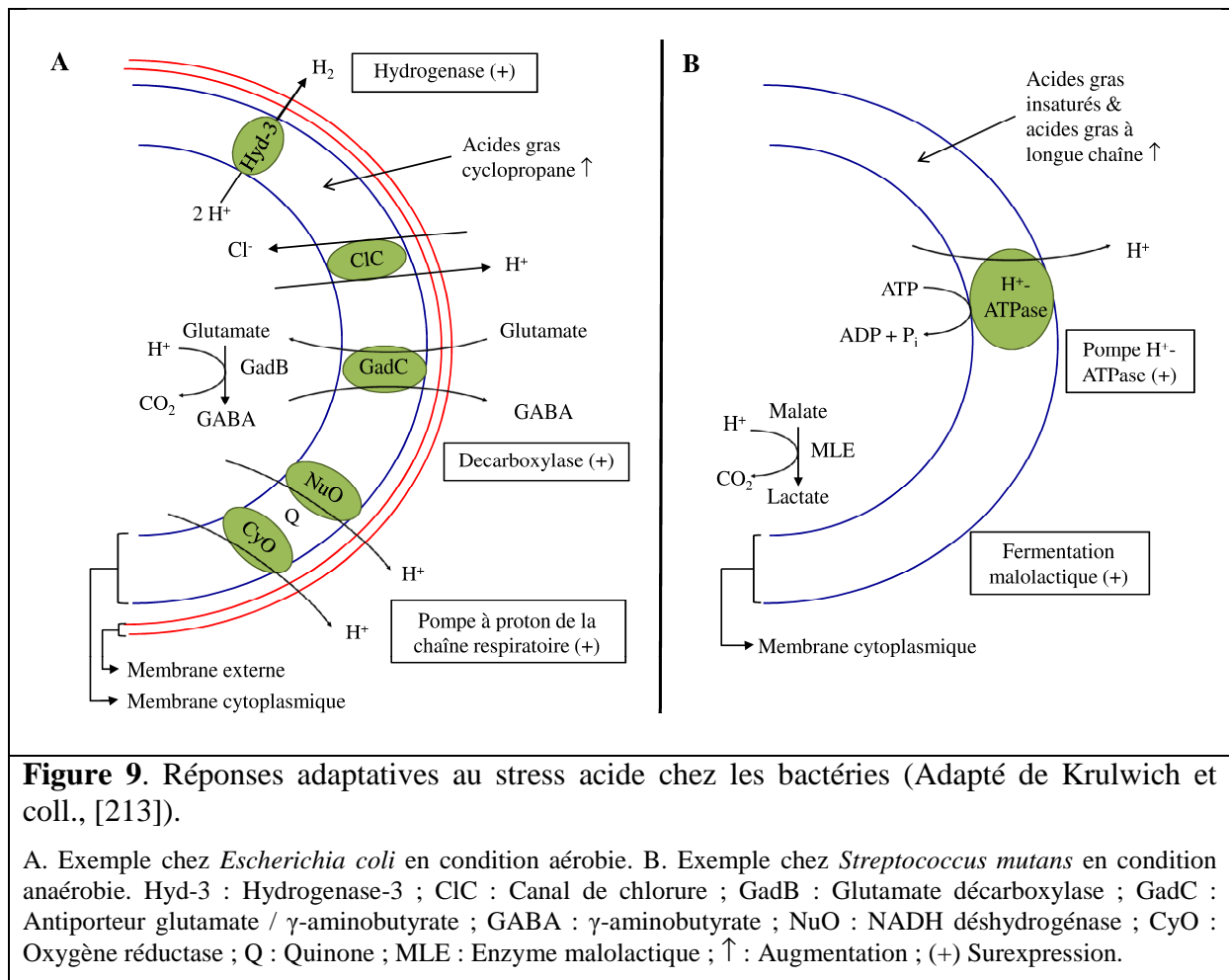
A. Les facteurs abiotiques

1. pH, température, humidité, aération

a. pH

Le pH est un paramètre crucial qui régule la succession des communautés microbiennes lors de la fabrication du fromage (Figure 3). Au début de l'affinage, le pH bas (~5) résultant de l'action des bactéries lactiques lors de la phase d'acidification favorise la croissance des microorganismes acidophiles ou acido-tolérants. Alors que le caillé acide est essentiellement peuplé de bactéries lactiques, des communautés aérobies et acidophiles, principalement formées de levures et/ou de moisissures, se développent en surface. Ces dernières, en consommant l'acide lactique dans le milieu et en produisant des métabolites alcalins tels que l'ammoniac, contribuent à la remontée du pH à la surface du fromage, ce qui permet ensuite le développement des communautés bactériennes qui sont plus acido-sensibles [12]. Des staphylocoques à coagulase négative telles que *Staphylococcus equorum*, *S. sciuri*, *S. xylosus* peuvent croître à pH 5,5 ou même inférieur, d'où leur développement plus tôt pendant l'affinage par rapport à d'autres bactéries de surface comme *Glutamicibacter* spp., *Corynebacterium* spp. et *Brevibacterium* spp. [207]. En général, les bactéries de surface commencent à se développer à pH compris entre 5,5 et 6,0 ; dès leur implantation elles participent activement à la maturation du fromage (Partie I-A-3-b et I-B-2). La neutralisation de la surface du fromage a aussi un effet positif sur l'activité des enzymes protéolytiques et lipolytiques, dont le pH optimum est souvent proche de la neutralité [208]. À la fin de l'affinage, le pH à la surface du fromage peut atteindre une valeur supérieure à 7,5 [209]. L'évolution de la composition microbienne à la surface des fromages est donc très largement influencée par la sensibilité des différents groupes microbiens au pH ainsi que par leurs capacités de désacidification.

L'adaptation à un stress pH nécessite le maintien de l'homéostasie du pH, c'est-à-dire le maintien du niveau du pH interne [210]. Dans les conditions de stress acide, le Δ pH existant entre le pH externe et le pH interne favorise l'entrée de protons H^+ dans le cytoplasme par diffusion passive. La stratégie majeure de l'homéostasie du pH consiste donc à exporter des protons hors de la cellule. Chez les fungi, cette fonction est réalisée par un transporteur membranaire, la pompe H^+ -ATPase, qui utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour exporter les protons, et ainsi stabiliser le pH intracellulaire [211, 212]. Chez les bactéries, l'excrétion de protons est faite soit par la pompe à proton de la chaîne respiratoire chez les aérobies, soit par la pompe H^+ -ATPase chez les anaérobies [213] (Figure 9). D'autres stratégies concernent la régulation des voies métaboliques, par exemple la surexpression des enzymes consommatrices de protons telles que les hydrogénases et les décarboxylases, ou inversement la sous-expression des enzymes qui importent les protons telles que l'ATP-synthase [214]. La diminution de la perméabilité membranaire aux protons *via* un changement de la composition lipidique membranaire et/ou de protéines de surface, participe également à la résistance au stress acide [213]. Il est généralement admis que les levures et les moisissures sont mieux adaptées au pH acide que les bactéries, ce qui pourrait être dû au fait que les premières possèdent des systèmes de réponse au stress acide qui sont plus efficaces et/ou plus stables [209]. Il est aussi observé que les mécanismes de réponse au stress acide chez les bactéries leur permettent de survivre plutôt que de croître [215].



b. Température

La température dans les caves d'affinage diffère selon les procédés de fabrication de fromage mais varie généralement entre 10 et 15°C (Tableau 7). Cette condition favorise la croissance des microorganismes psychrophiles ou psychrotrophes. Un microorganisme est dit "psychrophile" quand il a besoin de basses températures pour assurer son cycle de vie, alors que le terme "psychrotrophe" est utilisé pour désigner un microorganisme qui est capable de croître à de basses températures mais sans avoir besoin de ces conditions pour survivre. En autre terme, un psychrotrophe est un mésophile capable de se développer à basses températures. Les microorganismes psychrophiles sont souvent isolés de milieux extrêmes tels que des mers polaires ou des pergélisols, alors que les psychrotrophes sont beaucoup plus répandus [216].

L'adaptation aux basses températures chez ces microorganismes implique plusieurs mécanismes qui varient selon l'espèce et dont les plus documentés sont : (i) les changements dans la composition de la membrane cytoplasmique, (ii) les modifications de structure des enzymes, (iii) la production des cryoprotecteurs et (iv) la synthèse des protéines spécifiques, destinées à améliorer l'efficacité des processus métaboliques de la cellule en conditions froides (Tableau 8) [217]. La température optimale de croissance des levures se situe en général entre 20°C et 30°C, mais plusieurs souches sont psychrotrophes, ce qui leur permet de s'implanter à la surface des fromages aux températures d'affinage (10-15°C) [218–220]. Dans certains procédés de fabrication fromagère, la température au début de l'affinage est réglée à 20°C afin de favoriser la croissance et l'activité désacidifiante des levures [209], et on parle alors de phase de levurage. L'action sur la température est considéré comme la stratégie la plus simple et économique pour accélérer l'affinage [221]. En général, une montée en

température d'affinage entraîne une augmentation des activités microbiennes, modifiant ainsi les caractéristiques du fromage telles que sa texture et son goût [222, 223].

Tableau 7. Caractéristiques et conditions d'affinage de certains fromages à croûte lavée [27].

Fromage	Caractéristiques			Conditions d'affinage		
	Humidité (%)	Sel (%)	a_w^a	HR ^b	Température (°C)	Temps d'affinage (jours)
Munster	56			~90	18-20	14-21
Port-Salut	56			~90	12-18	42-56
Reblochon	55			~90	15	35-42
Taleggio	48-50	1,1-1,3	0,98		3-4	42-56
Pont-l'Évêque	45-50	2,0	0,98	80-85	12-13	28-42
Limburger	45-48	1,8-3,0	0,97	~90	10-15	14-21
					4-10	42-56
Tilsit	45-55	2,5	0,96	90	15	30
Brick	40-42	1,8-2,5	0,98	~90	8-12	14
Beaufort	38-40	1,1-1,3	~0,97	~92	8-12	120

^aActivité de l'eau

^bHumidité relative

Tableau 8. Mécanismes moléculaires de l'adaptation des microorganismes aux basses températures [217, 224].

Adaptation	Mécanisme moléculaire	Effet / Remarque
Membranes cytoplasmiques	Modification en acides gras membranaires : - Augmentation de l'insaturation - Diminution de la longueur de chaîne - Augmentation de la ramification méthyle - Changement de la ramification <i>iso</i> en <i>ante-iso</i>	- Augmentation de la fluidité membranaire
Cryoprotection	- Biosynthèse de cryoprotecteurs (par exemple le tréhalose, le glycérol, les bêtaïnes) - Biosynthèse de protéines antigél	- Abaissement du point de congélation du cytoplasme - Stabilisation des macromolécules
Synthèse de protéines spécifiques – CIPs ^a ou CAPs ^b	- CSPs ^c : Chaperonnes pour les ARNm - Protéine de transduction de signal - Promoteurs d'autres protéines - Régulateurs de transcription ou de traduction	- Redémarrage de la croissance cellulaire

Tableau 8. (suite)

Adaptation	Mécanisme moléculaire	Effet / Remarque
Structure des enzymes	Flexibilité conformationnelle de la molécule : - Meilleure accessibilité des sites actifs - Diminution de liaisons hydrogènes et ioniques intramoléculaires - Réduction de résidus prolines et arginines - Diminution d'interactions hydrophobes internes - Allongement de boucles externes - Augmentation de résidus hydrophobes exposés au solvant- - Augmentation de résidus chargés en surface	- Maintien d'efficacité catalytique à basse température
Protection contre les DROs ^d	Augmentation d'activité des enzymes antioxydantes (par exemple les catalases, les peroxydases, les superoxydes dismutases)	Les basses températures augmentent la solubilité de l'oxygène, d'où l'augmentation des DROs
Plasticité génomique	Implication des éléments génétiques mobiles (par exemple les transposases, les prophages)	

^aProtéines induites par le froid (CIPs en anglais : Cold Induced Proteins), leur synthèse est inductible

^bProtéines d'adaptation au froid (CAPs en anglais : Cold Acclimation Proteins), leur synthèse est constitutive

^cProtéines de choc froid (CSPs en anglais : Cold Shock Proteins)

^dDérivés réactifs de l'oxygène

c. Humidité

La teneur en eau du fromage dépend largement du procédé de fabrication. Les principaux facteurs qui l'influencent comprennent le type de caillé, l'intensité de l'égouttage, le lavage (pour les fromages à croûte lavée) et l'humidité relative de la cave d'affinage. La teneur en eau du fromage est un des facteurs qui modulent l'activité de l'eau (a_w) qui est un paramètre clé de la croissance des microorganismes. L' a_w représente la quantité d'eau libre, disponible pour la croissance microbienne et pour la réalisation de certaines réactions enzymatiques qui nécessitent un milieu aqueux. L' a_w est calculé selon la formule suivante :

$$a_w = P / P_0$$

où :

- P : Pression de vapeur de la solution ou de l'aliment
- P₀ : Pression de vapeur de l'eau pure à la même température

Dans le cas des fromages, l' a_w dépend de : (i) la teneur en eau, et (ii) la nature et la quantité des substances en solution de la phase aqueuse, telles que les petits peptides, les acides aminés, les acides, le phosphate de calcium et en particulier le sel. L' a_w du fromage évolue au cours de l'affinage du fait de l'évaporation superficielle de l'eau et de la transformation biochimique des constituants du caillé - principalement sous l'action des communautés microbiennes (Tableau 1). Chaque microorganisme a une valeur d' a_w limite,

en-dessous de laquelle il ne se développe pas (Tableau 9). En général, les bactéries nécessitent une valeur d' a_w plus élevée que les levures et les moisissures.

Tableau 9. Activité de l'eau (a_w) minimale pour la croissance de certains microorganismes [225].

Microorganisme	a_w minimale
<i>Shigella</i> spp.	0,96
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,96
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,95
<i>Escherichia coli</i>	0,95
<i>Clostridium botulinum</i>	0,94
<i>Salmonella</i> spp.	0,94
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92
<i>Micrococcus</i> spp.	0,87
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
Levures et moisissures	0,80
Levures et moisissures osmophiles	0,55

Dans cette partie nous nous concentrons d'abord sur l'effet de la teneur en eau du fromage sur la croissance des microorganismes (l'effet du sel sera analysé plus tard, dans la partie II-A-3). Selon les procédés de fabrication, chaque variété de fromage possède une humidité typique (Tableau 7), ce qui favorise l'implantation des microorganismes adaptés. Une étude récente sur la diversité des communautés microbiennes à la surface de 137 différents fromages a montré que l'humidité en surface est corrélée avec la structure et la composition des communautés microbiennes [32]. Selon cette étude *in situ*, l'abondance des levures du genre *Galactomyces* et des bactéries des genres *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Pseudomonas* et *Pseudoalteromonas* est positivement corrélée avec la teneur en eau en surface, alors que celle des moisissures des genres *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, des bactéries du genre *Staphylococcus* et des bactéries du phylum *Actinobacteria* est négativement corrélée. Les auteurs ont également mené des expériences *in vitro* et montré un enrichissement des genres *Debaryomyces* (levure), *Penicillium* (moisissure) et *Staphylococcus* (bactérie) quand l'environnement est plus sec.

La teneur en eau du fromage dépend aussi de l'humidité relative de l'air (HR), ou degré hygrométrique, qui représente le rapport entre la quantité de vapeur d'eau présente dans l'air et la quantité de vapeur d'eau maximale que peut contenir cet air à la même température. L'humidité relative de la cave d'affinage régule donc le niveau de dessèchement du fromage : en effet quand l'air au contact du fromage n'est pas saturé en vapeur d'eau, une partie d'eau du fromage sera transférée dans l'air, ce qui provoque une perte de matière du fromage. Mirade et coll. [226] ont observé qu'une baisse de l'humidité relative de 98 à 95% augmentait la perte d'eau d'un facteur de 2,5. L'humidité relative représente un des trois paramètres d'ambiance locale les plus importants qui influencent la croissance des microorganismes pendant l'affinage, les deux autres étant la température et la composition gazeuse de l'atmosphère [223, 227]. Cet effet est très variable selon l'espèce et a été objet de plusieurs études. Par exemple, d'après Lenoir et coll. [6], la croissance de la moisissure *Penicillium*

camemberti est inhibée quand l'humidité relative est au-dessus de 95%. Bonaïti et coll. [228] ont montré dans un modèle de fromage à pâte molle que la levure *Debaryomyces hansenii* est inhibée à une humidité relative de 85% et sa croissance est optimale à une humidité relative de 95% et une température de 16°C. Leclercq-Perlat et coll. [229] ont examiné l'influence de l'humidité relative et de la température sur la croissance de différents microorganismes dans un fromage de type Camembert : alors que la croissance des levures (*Kluyveromyces marxianus* et *Geotrichum candidum*) dépend seulement de la température, celle de la moisissure *Penicillium camemberti* et de la bactérie *Brevibacterium aurantiacum* dépend en même temps de l'humidité relative et de la température. Callon et coll. [230] ont trouvé qu'une diminution de l'humidité relative de 97 à 93% a un effet inhibiteur sur la croissance de la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* dans le fromage.

d. Aération

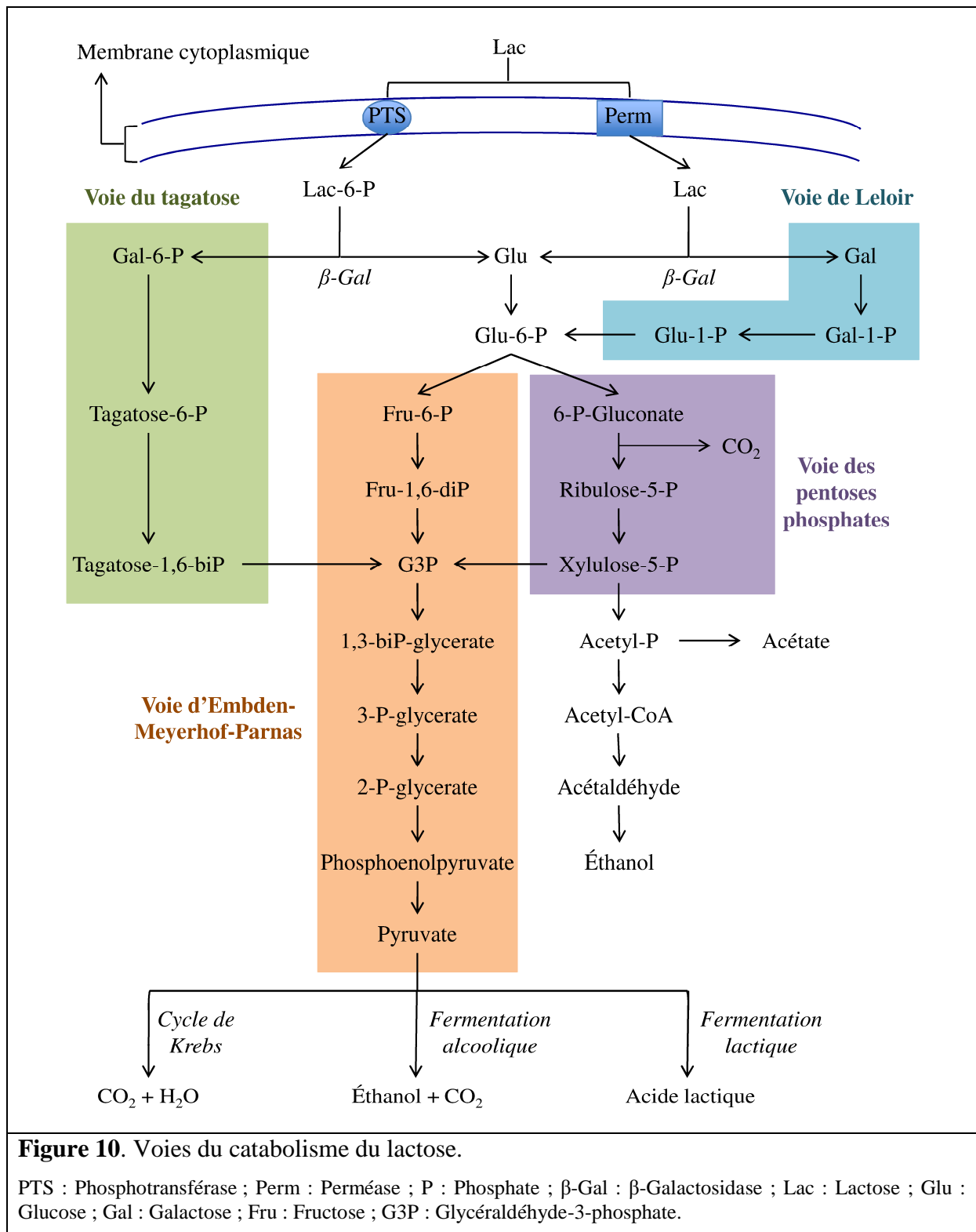
Les communautés microbiennes aérobies se développent à la surface du fromage et forment sa croûte, alors que son cœur est dominé par les communautés anaérobies, notamment les bactéries lactiques. Le retournement des fromages pendant l'affinage a pour but d'homogénéiser le développement des microorganismes à la surface : en effet, la partie en contact avec les supports est moins en contact avec l'air et le développement des communautés aérobies y est donc ralenti. Certaines études ont montré l'impact de la composition de l'air sur le développement des microorganismes dans le fromage [231–233]. Or la composition de l'air dans la cave d'affinage varie en fonction du renouvellement de l'air et des dégagements gazeux des fromages. Durant l'affinage, les communautés microbiennes de surface consomment de l'O₂ et rejettent du CO₂, du NH₃ et de l'eau. L'aération assure l'homogénéité de l'ambiance et le renouvellement de l'air au contact avec les fromages. Elle agit aussi sur l'évaporation de l'eau contenue dans les fromages. Mirade et coll. [226] ont constaté que quand la vitesse d'aération passe de 0 à 0,5 m/s, la perte de poids des fromages augmente d'un facteur de 6.

2. Substrats énergétiques

Les substrats énergétiques présents dans les fromages comprennent les constituants originels du lait et leurs dérivés issus des activités microbiennes. On en distingue les groupes principaux : (i) le lactose et ses dérivés, (ii) les protéines et leurs dérivés et (iii) les lipides et leurs dérivés, et (iv) les autres substrats. Cette disponibilité en substrats énergétiques impose une pression sélective sur les microorganismes qui vivent à la surface des fromages.

a. Lactose et dérivés

Le lactose est le principal sucre du lait. C'est un disaccharide, composé d'une molécule de β -D-galactose et d'une molécule de α - ou β -D-glucose, reliées entre elles par une liaison osidique $\beta(1-4)$. Les voies du catabolisme du lactose sont présentées dans la Figure 10.



Dans la fabrication fromagère, le lactose est d'abord utilisé par les bactéries lactiques dans la phase d'acidification. Le catabolisme du lactose implique tout d'abord une lactose perméase qui permet le transport du lactose à travers la membrane cytoplasmique, et puis une β-galactosidase qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Le glucose est ensuite catabolisé par une fermentation lactique, soit homofermentaire (donnant l'acide lactique comme produit unique de la dégradation du glucose *via* la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas), soit hétérofermentaire (produisant, outre l'acide lactique, des quantités significatives de CO₂ et d'éthanol ou d'acétate *via* la voie des pentoses phosphates). L'acide lactique issu de la

fermentation lactique contribue à la coagulation du lait et constitue également un substrat énergétique pour d'autres microorganismes. Le galactose, quant à lui, doit être préalablement transformé, *via* soit la voie de Leloir, soit celle du tagatose, en glucose-6-phosphate et glycéraldéhyde-3-phosphate, respectivement, avant d'être métabolisé *via* la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas [234]. Les souches qui ne peuvent pas assimiler le galactose l'expulsent hors de la cellule. Le galactose peut-être aussi impliqué dans le transport du lactose : en cas de forte accumulation intracellulaire du galactose, la lactose perméase agit en antiport avec expulsion du galactose parallèlement à l'entrée du lactose [235].

Ainsi, en début d'affinage, le lactose résiduel, le galactose, le lactate, l'acétate et l'éthanol constituent d'importants substrats énergétiques pour les communautés microbiennes de la surface du fromage.

Le lactose résiduel

Le lactose résiduel est métabolisé par les bactéries lactiques, les levures ou les moisissures. Certaines levures appartenant aux genres *Kluyveromyces* et *Debaryomyces* sont capables de cataboliser le lactose résiduel au cours des premiers jours d'affinage grâce à la présence d'une β -galactosidase. Cette enzyme a été identifiée chez *K. lactis*, *K. marxianus* et *D. hansenii* [236–238]. Le glucose issu de l'hydrolyse du lactose par la β -galactosidase est catabolisé *via* la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas, donnant le pyruvate qui va être soit complètement oxydé en CO₂ et en eau *via* le cycle de Krebs (par exemple chez *D. hansenii*), soit réduit en éthanol *via* la fermentation alcoolique (par exemple chez *K. lactis* et *K. marxianus*) (Figure 10) [209]. Les levures *Yarrowia lipolytica* et *Geotrichum candidum* ne métabolisent pas le lactose [239, 240]. L'activité β -galactosidase a été mise en évidence chez les moisissures du genre *Penicillium* [238]. Il a été proposé que le lactose soit la source d'énergie principale pour le développement du mycélium de *P. camemberti* en début d'affinage et la déplétion du lactose déclenche sa sporulation [241]. La plupart des bactéries d'affinage n'assimilent pas le lactose, ce qui pourrait être dû au fait qu'elles se développent après l'épuisement du lactose dans le milieu [242].

Le galactose

Le galactose fait partie des substrats énergétiques présents à la surface du fromage en début d'affinage, notamment lors des fabrications fromagères qui utilisent des bactéries lactiques thermophiles qui n'assimilent pas le galactose et l'expulsent dans le milieu, par exemple certaines souches appartenant aux espèces *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis* ou *Lactobacillus acidophilus* [209, 235, 243]. Différentes levures sont capables de cataboliser le galactose, comme par exemple *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii* et *Geotrichum candidum* [238, 240, 244]. Le galactose sert aussi de substrat pour diverses bactéries lactiques et bactéries d'affinage [245, 246].

Le lactate

Le lactate constitue une source d'énergie importante utilisée par la plupart des fungi et des bactéries de surface du fromage *via* un catabolisme oxydatif [50, 208, 242, 247]. Le transport du lactate par les transporteurs dédiés et l'oxydation du lactate en pyruvate par les lactates déshydrogénases (LDHs) constituent les étapes clés de ce catabolisme [248]. Les LDHs catalysent la transformation du pyruvate en lactate et *vice versa*. Il existe différents types de LDH, qui diffèrent selon le stéréoisomère du lactate (L(+) ou D(-)) et selon la nature

du cofacteur de la réaction. Selon la nature du cofacteur, les LDHs sont classées en deux grands groupes : les LDHs NAD-dépendantes (nLDHs), qui utilisent le NADH comme cofacteur, et les LDHs NAD-indépendantes (iLDHs), qui utilisent le FMN comme cofacteur. Les iLDHs sont généralement considérées comme enzymes responsables de l'oxydation du lactate chez les microorganismes [248]. Des gènes candidats codant pour les transporteurs de lactate et les LDHs ont été identifiés dans les génomes de différents microorganismes du fromage [209, 239, 249]. Des études métatranscriptomiques ont confirmé l'expression précoce des gènes liés au catabolisme du lactate chez les fungi en début d'affinage, ce qui est concomitant avec la désacidification du caillé [234, 249]. Outre le catabolisme oxydatif par des fungi et des bactéries de surface, le lactate peut être aussi métabolisé par des bactéries lactiques (notamment des bactéries du genre *Pediococcus*) ou par des bactéries propioniques en différents produits tels que l'acétate, l'éthanol, le formate, le propionate et le CO₂ [250] (Figure 11).

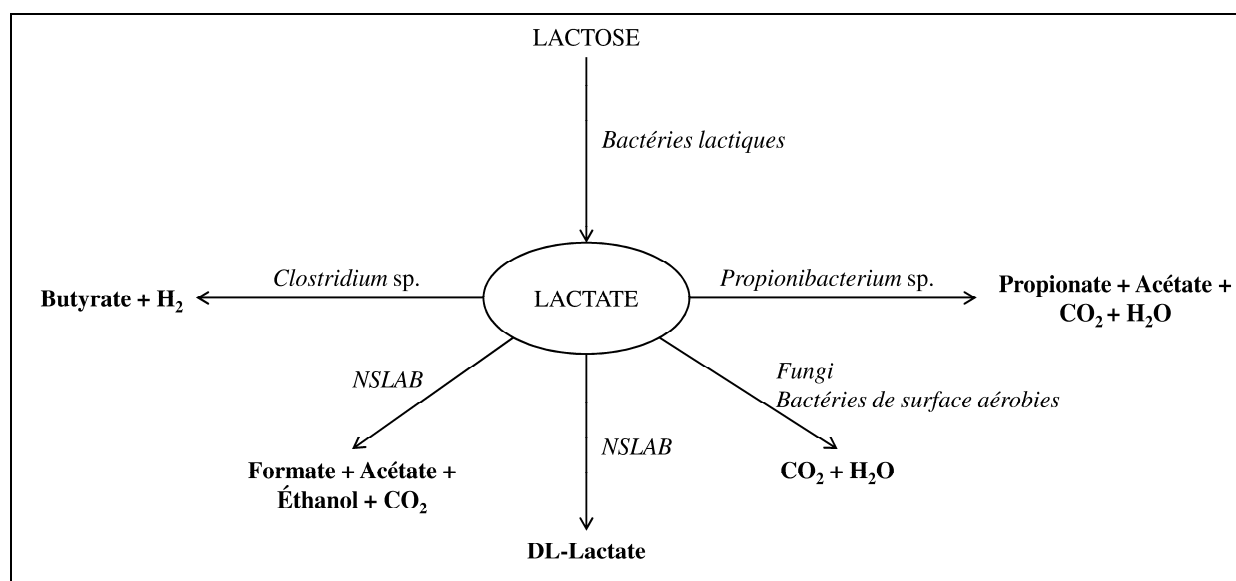


Figure 11. Principales voies métaboliques du lactate dans les fromages (Adapté de McSweeney et Sousa [251]).

NSLAB : Non Starter Lactic Acid Bacteria.

b. Protéines et dérivés

Les caséines sont les protéines majoritairement retenues dans le fromage. Il existe différents types de caséines, dont les principales sont les caséines α_{S1} , α_{S2} , β et κ [252]. La protéolyse des caséines fournit des peptides et des acides aminés qui représentent des substrats énergétiques importants à la surface des fromages. Les protéases et les peptidases responsables de la protéolyse dans les fromages ont pour origines six sources majeures dont l'importance varie selon les variétés de fromage : (i) la présure résiduelle, constituée de chymosine et de pepsine, (ii) les enzymes protéolytiques indigènes du lait telles que la plasmine et les cathepsines, (iii) les ferments lactiques, (iv) les NSLABs, (v) les ferments secondaires y compris les levures, les moisissures, les bactéries propioniques et les bactéries de surface, et (vi) dans certains cas, les enzymes protéolytiques exogènes ajoutées dans le lait ou dans le caillé pour accélérer l'affinage [250]. L'hydrolyse des caséines est généralement initiée par l'action de la présure et/ou des enzymes indigènes du lait, résultant en peptides de grande taille ou de taille intermédiaire. La production de peptides de petite taille et d'acides aminés libres est réalisée en général par des enzymes microbiennes [251].

La protéolyse microbienne

Les activités protéolytiques et peptidasiques sont très variées selon les espèces et également entre les souches d'une même espèce. Les bactéries lactiques utilisent une protéase de paroi (CEP en Anglais : Cell-Envelope Proteinase) pour hydrolyser les caséines ou les grandes peptides en oligopeptides qui sont ensuite transportées dans la cellule par différents transporteurs de peptides dont le principal est le système Opp. La protéine PrtP chez *Lactococcus lactis* est la CEP la plus intensivement caractérisée, le gène *prtP* codant pour cette protéine se situe sur le chromosome ou un plasmide. Les peptides sont dégradés en acides aminés par des peptidases intracellulaires [24]. De nombreux travaux ont mis en évidence les activités protéolytiques et peptidasiques chez des levures dans le fromage, par exemple chez *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* et *Saccharomyces cerevisiae* [253–260]. *Y. lipolytica* est reconnu dans plusieurs études comme étant fortement protéolytique [254, 256, 258]. En général, *D. hansenii* est considéré comme moins protéolytique que *Y. lipolytica* et *K. marxianus* [209]. Les *Propionibacterium* spp. sont faiblement protéolytiques mais fortement peptidasiques, leurs peptidases sont particulièrement actives sur les peptides contenant de la proline [261]. Les moisissures du genre *Penicillium*, notamment *Penicillium camemberti* et *P. roqueforti*, sécrètent des aspartyl- et métallo-protéases qui hydrolysent les caséines α_{S1} et β [262]. Elles possèdent également plusieurs peptidases dont certaines ont été caractérisées [208]. Parmi les bactéries de surface, les systèmes protéolytiques chez les bactéries du genre *Brevibacterium* sont les plus étudiés (Partie I-B-2-a). La production de protéases et de peptidases extracellulaires a été également démontrée chez d'autres bactéries de surface telles que *Glutamicibacter nicotianae*, *Corynebacterium variabilis* et *Microbacterium gubbeenense* [263–266].

Le catabolisme des acides aminés

Les produits finaux de la protéolyse sont des acides aminés libres, leurs concentrations varient selon les variétés de fromage. Les acides aminés sont souvent utilisés comme substrats après l'épuisement du lactose et du lactate [242]. Néanmoins certains microorganismes, par exemple la levure *Yarrowia lipolytica*, consomment les acides aminés de façon préférentielle par rapport au lactate [267]. Les acides aminés sont transportés dans la cellule à l'aide des transporteurs, soit généraux pour l'ensemble des acides aminés (GAP en Anglais : General Amino acid Permease), soit spécifiques pour un seul ou un groupe d'acides aminés. À titre exemple, un transporteur général GAP1 a été caractérisé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [268], et plusieurs transporteurs spécifiques chez la bactérie *Lactococcus lactis* [269]. Après avoir été importés dans la cellule, les acides aminés sont ensuite dégradés *via* différentes voies enzymatiques. Les principales voies de catabolisme des acides aminés sont présentées dans la Figure 12. La première étape implique une décarboxylation, une désamination, une transamination ou une dégradation de la chaîne latérale, les deux dernières sont considérées comme les voies majeures pour la génération des composés aromatiques [270].

La transamination

La transamination est catalysée par les aminotransférases (aussi appelées transaminases, EC 2.6.1.x), qui transfèrent le groupement aminé (NH_2) des acides aminés à un α -cétoacide accepteur, qui est transformé en acide aminé, tandis que l'acide aminé de départ est transformé en α -cétoacide. Chez les bactéries lactiques et les levures, le catabolisme des acides aminés aromatiques (dont la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane), des acides aminés à chaîne ramifiée (dont la leucine, l'isoleucine, la valine) et aussi de la méthionine, est

essentiellement initié par cette étape [270]. Certaines aminotransférases ont été purifiées et caractérisées chez des microorganismes du fromage tels que *Lactococcus lactis* et *Brevibacterium linens* [198, 271–273]. L' α -cétoglutarate est souvent utilisé comme accepteur d'amine, il est alors transformé en glutamate. L'utilisation de ferments capables de produire de l' α -cétoglutarate à partir du glutamate ou l'addition de l' α -cétoglutarate dans le fromage favorise la transamination et donc la formation des composés aromatiques [274, 275]. L' α -cétacide issu de la transamination est ensuite dégradé en différents composés dont plusieurs aromatiques *via* des réactions enzymatiques et/ou chimiques. Quatre voies de dégradation des α -cétacides ont été observées chez les microorganismes du fromage : (i) la réduction en acide α -hydroxylé, catalysée par des 2-hydroxyacides déshydrogénases NAD-dépendantes, observée chez plusieurs bactéries lactiques ; (ii) la décarboxylation en aldéhydes *via* la voie d'Ehrlich, observée chez des levures et certaines bactéries lactiques, les aldéhydes peuvent être ensuite réduits en alcools par des alcools déshydrogénases ou oxydés en acides carboxyliques par des aldéhydes déshydrogénases ; (iii) la décarboxylation oxydative en acides carboxyliques, catalysée par des α -cétacides déshydrogénases, suggérée chez certaines levures, bactéries lactiques, bactéries propioniques et bactéries d'affinage ; et (iv) les dégradations chimiques [270].

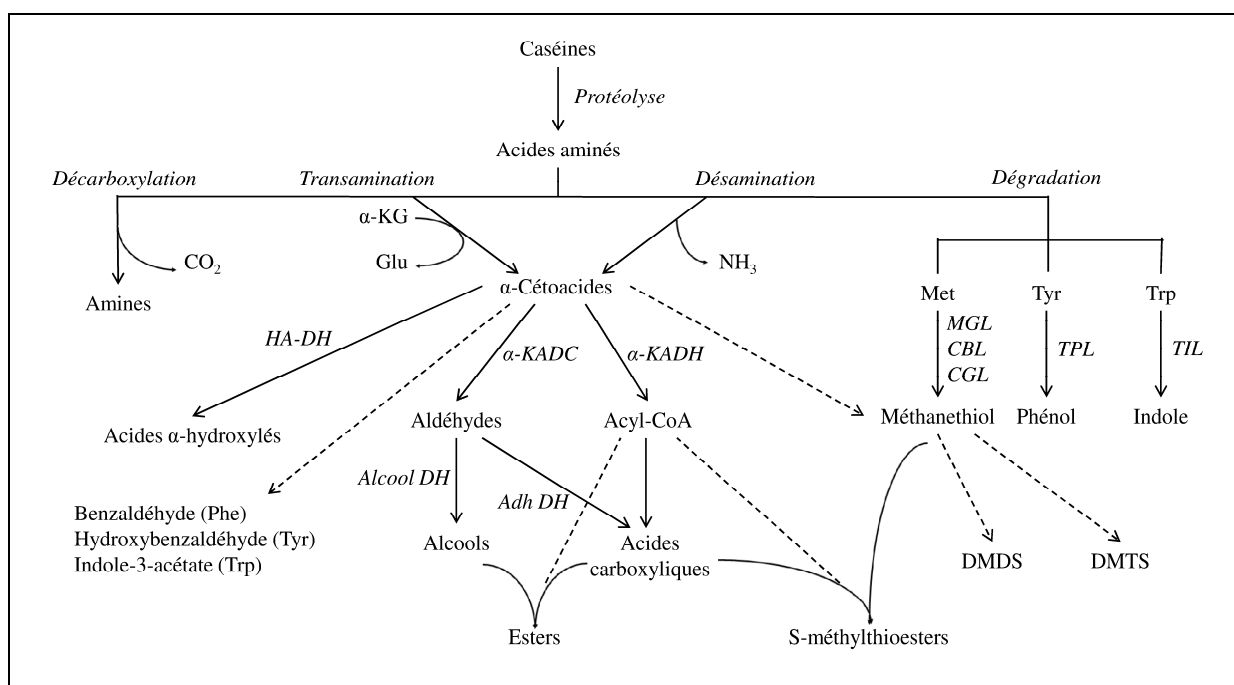


Figure 12. Principales voies métaboliques des acides aminés dans les fromages (Adapté de McSweeney et Sousa [251] ; Curtin et McSweeney [276]).

Les réactions purement / partiellement chimiques sont indiquées par des flèches pointillées. α -KG : α -cétoglutarate ; Glu : Glutamate ; Met : Méthionine ; Phe: Phénylalanine ; Tyr : Tyrosine ; Trp : Tryptophane ; DMDS : disulfure de diméthyle ; DMTS : trisulfure de diméthyle ; HA-DH : Hydroxyacide déshydrogénase ; α -KADC : α -cétacide décarboxylase ; α -KADH : α -cétacide déshydrogénase ; Alcool DH : Alcool déshydrogénase ; Adh DH : Aldéhyde déshydrogénase ; MGL : Méthionine γ -lyase ; CBL : Cystathionine β -lyase ; CGL : Cystathionine γ -lyase ; TPL : Tyrosine-phénol lyase ; TIL : Tryptophane-indole lyase.

La dégradation de la chaîne latérale

Cette voie implique la dégradation de la tyrosine en phénol, celle du tryptophane en indole et notamment la γ -élimination de la méthionine en MTL. La dernière est la voie majeure de dégradation de la méthionine chez les bactéries du genre *Brevibacterium*, elle est catalysée par une méthionine γ -lyase (MGL, EC 4.4.1.11) (Partie I-B-2-e). Chez les bactéries

lactiques, cette réaction est minoritaire, elle est catalysée par une cystathionine β -lyase (CBL, EC 4.4.1.8) ou une cystathionine γ -lyase (CGL, EC 4.4.1.1) [277, 278].

La désamination

La désamination est catalysée par les désaminases qui transforment les acides aminés en ammoniac et α -cétoacides correspondants. Il s'agit des oxydoréductases de deux grands groupes : (i) les déshydrogénases, qui utilisent le NAD^+ comme accepteur d'hydrogène ; et (ii) les oxydases, qui utilisent l'oxygène comme accepteur d'hydrogène [276]. Le catabolisme du glutamate et de la proline, qui font partie des acides aminés les plus abondants dans les caséines, peut se réaliser *via* la désamination [279]. En effet, le glutamate peut être catabolisé par la glutamate déshydrogénase en ammoniac et α -cétoglutarate, ce dernier peut entrer dans le cycle de Krebs ou servir de substrat pour la transamination [209]. Le gène *putA* codant pour la proline déshydrogénase / pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase qui catalyse l'oxydation de la proline en glutamate a été identifié dans le génome de certains microorganismes isolés de fromages tels que *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 et *Corynebacterium variabile* DSM 44702 [280, 281]. L'ammoniac issu de la désamination peut contribuer à la remontée du pH au cours de l'affinage et participer à la flaveur de différents fromages tels que le Camembert, le Gruyère et le Comté [276].

La décarboxylation

La décarboxylation des acides aminés est catalysée par les décarboxylases qui conduisent à l'apparition des amines correspondant et à la libération du CO_2 . Les amines ont généralement des odeurs fortes et désagréables ; plusieurs d'entre elles sont des amines biogènes qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires (par exemple l'histamine et la tyramine). Les décarboxylases présentent souvent un pH optimal acide ($\sim 5,5$) et utilisent le phosphate de pyridoxal (PLP) comme coenzyme [250]. La production des amines biogènes a été observée chez plusieurs NSLABs des genres *Lactobacillus* et *Enterococcus* [282, 283]. Certaines souches de *Brevibacterium* sont capables de dégrader des amines biogènes [284].

c. Lipides et dérivés

Le lait contient une quantité importante de lipides ($\sim 35-50$ g/l dans le lait bovin), principalement les triglycérides ($\sim 98\%$) [285]. La dégradation des lipides *via* l'hydrolyse libère du glycérol et des acides gras (AGs) libres qui représentent des substrats énergétiques importants pour plusieurs microorganismes du fromage. Les lipides du lait sont riches en AGs à chaîne courte ou à chaîne moyenne [286]. Les enzymes lipolytiques peuvent être classifiées en lipases et en estérases selon la cinétique enzymatique et la nature de leurs substrats, cependant l'utilisation de ces deux termes est souvent ambiguë [287]. Dans le fromage, les enzymes lipolytiques peuvent provenir du lait, de la présure ou des communautés microbiennes [250]. Le lait contient une lipoprotéine lipase (LPL) et plusieurs estérases. Leurs activités sont importantes dans les fromages au lait cru [251]. Des présures artisanales peuvent comprendre une estérase pré-gastrique (PGE) qui est responsable d'une lipolyse intense chez certaines variétés de fromage [288]. La lipolyse microbienne, quant à elle, joue un rôle important chez plusieurs fromages.

La lipolyse microbienne

Les activités lipolytiques diffèrent selon les espèces et les souches. Les bactéries lactiques sont généralement considérées comme faiblement lipolytiques, leurs lipases / estérases semblent être exclusivement intracellulaires. Cependant elles peuvent contribuer de façon importante à la lipolyse chez certains fromages en raison de leur présence en grand nombre pendant une longue durée d'affinage [287]. Les bactéries propioniques sont généralement plus lipolytiques que les bactéries lactiques. Différentes lipases / estérases extracellulaires, intracellulaires ou membranaires ont été caractérisées chez *Propionibacterium* [289–292]. Plusieurs levures sont lipolytiques, notamment *Yarrowia lipolytica* et *Geotrichum candidum*. En effet, *Y. lipolytica* produit des lipases extracellulaires, ce qui pourrait expliquer sa forte capacité lipolytique par rapport à d'autres levures telles que *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* ou *Saccharomyces cerevisiae* [256]. Trois lipases extracellulaires (YLip2, YLip7, YLip8) qui présentent les différentes spécificités de substrats ont été caractérisées chez *Y. lipolytica* [293–295]. *G. candidum* est également capable de produire des lipases extracellulaires. Il a été proposé que *G. candidum* soit responsable de la modification du profil des AGs libres en faveur des AGs insaturés pendant l'affinage des fromages à pâte molle comme le Camembert ou le Pont-l'Évêque [240]. Des bactéries d'affinage peuvent participer à la lipolyse [51], mais leurs systèmes lipolytiques restent encore peu étudiés, à part des bactéries du genre *Brevibacterium* (Partie I-B-2-b) et du genre *Propionibacterium*. Des gènes codant pour des lipases sécrétées ont été identifiés dans le génome de certaines bactéries d'affinage telles que *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 et *Corynebacterium variabile* DSM 44702 [280, 281]. Enfin, les moisissures du genre *Penicillium* sont considérées comme les microorganismes les plus lipolytiques dans le fromage, d'où la lipolyse intense chez les fromages à croûte fleurie ou à pâte persillée [250]. Différentes lipases extracellulaires ont été caractérisées chez *Penicillium* – deux chez *P. roqueforti* et une chez *P. camemberti* [296, 297].

Le catabolisme des acides gras

Les AGs issus de la lipolyse constituent une source d'énergie importante pour les microorganismes du fromage. Les AGs libres dans le milieu sont transportés dans la cellule par diffusion passive ou diffusion facilitée par des transporteurs membranaires [298]. Dans la cellule, les AGs sont activés en acyl-CoA grâce à l'enzyme acyl-CoA synthétase puis oxydés par la β -oxydation en acétyl-CoA qui rejoint le cycle de Krebs. Chaque tour de la β -oxydation comprend 4 étapes : (i) l'oxydation par une acyl-CoA déshydrogénase, (ii) l'hydratation par une énoyl-CoA hydratase, (iii) l'oxydation par une β -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et (iv) la thiolase, permettant d'obtenir un acétyl-CoA et un acyl-CoA ayant perdu deux atomes de carbone. Le génome de *Glutamicibacter arilaitensis* Re117, une bactérie isolée du fromage contient certains gènes qui codent pour des acyl-CoA synthétases et des acyl-CoA déshydrogénases typiques qui ne présentent aucune homologie avec celles présentes chez des souches environnementales, ce qui pourrait être due à une adaptation pour utiliser des acides gras présents dans le milieu fromager [280]. Les AGs peuvent être également substrats de plusieurs réactions cataboliques qui génèrent différents composés de saveur et d'arôme tels que les méthylcétones, les esters, les alcools secondaires, les lactones et les aldéhydes [287]. Les principales voies de catabolisme des AGs sont résumées dans la Figure 13. D'autre part, des concentrations élevées d'AGs libres peuvent être toxiques pour certains microorganismes du fromage, par exemple *Penicillium roqueforti* [299, 300].

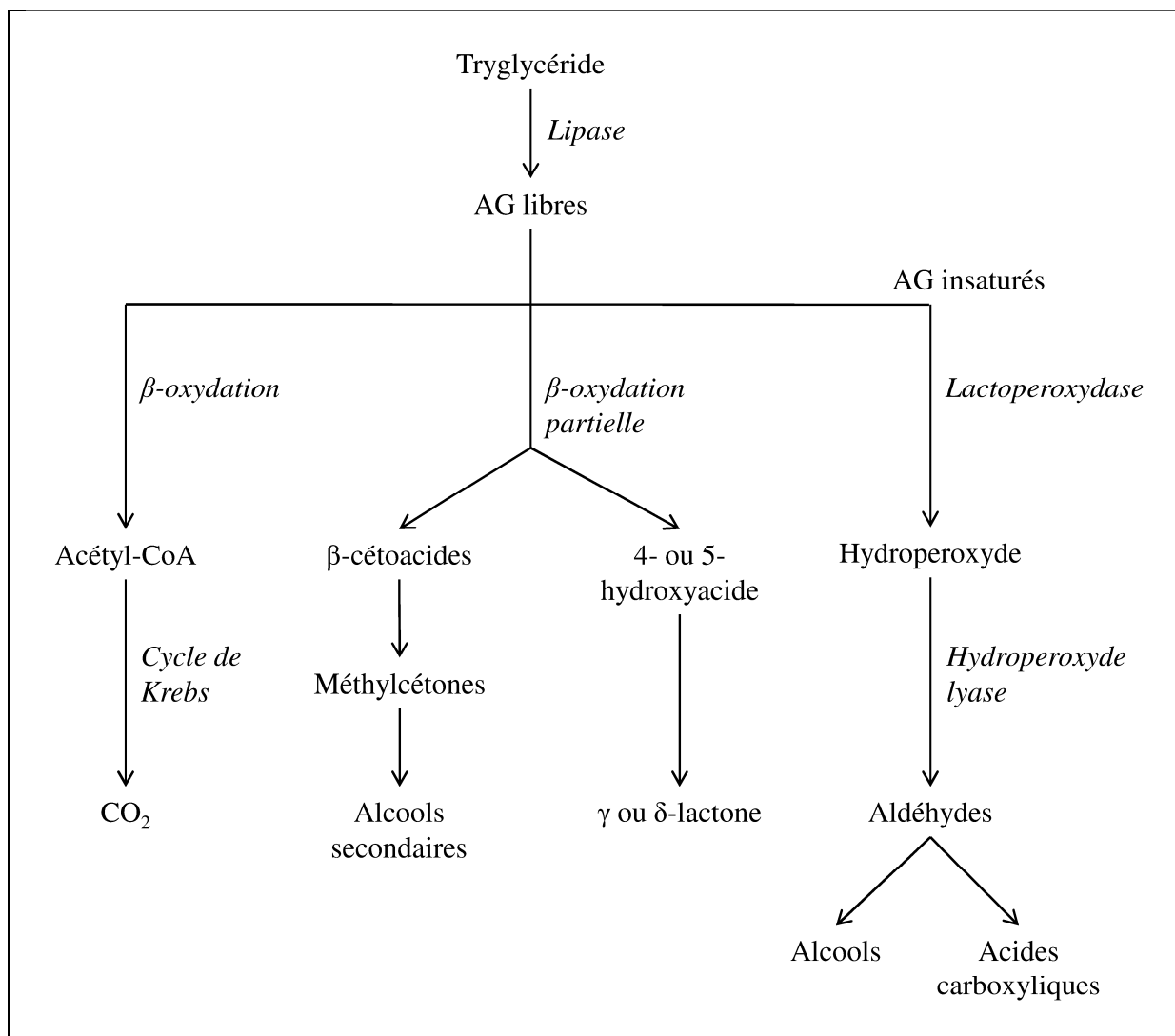


Figure 13. Principales voies cataboliques des acides gras libres dans les fromages (Adapté de McSweeney et Sousa [251]).

AG : Acides gras.

3. Sel

Le salage est une étape clé dans la fabrication de nombreux fromages (Partie I-A-2). Un des rôles du sel dans le fromage est de moduler le développement des microorganismes *via* la réduction de l' a_w (voir partie II-A-1-c) et l'augmentation de la pression osmotique. En effet, la réduction de l' a_w lors du salage participe à un effet de barrière contre les microorganismes indésirables. Le sel permet également de contrôler l'activité des ferments lactiques dont le développement est sensible au sel [301]. Pendant l'affinage, la teneur en sel dans les fromages impose une pression sélective favorisant l'implantation des microorganismes halophiles ou halotolérants, c'est-à-dire adaptés au stress hyperosmotique.

a. Mécanismes d'adaptation au stress hyperosmotique chez les microorganismes

L'adaptation des microorganismes au stress hyperosmotique qu'entraîne le sel consiste à équilibrer la pression osmotique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule tout en empêchant un efflux d'eau vers l'extérieur qui peut provoquer la perte de la pression de turgescence, la déshydratation et la mort cellulaire [302]. Deux principales stratégies ont été

décrites. La première se base sur l'accumulation du KCl dans la cellule, ce qui demande une adaptation de la machinerie enzymatique intracellulaire à la concentration élevée en sel [303, 304]. Cette stratégie est typique pour certains groupes taxonomiques dont les archées halophiles de la famille *Halobacteriaceae*, les bactéries halophiles de l'ordre *Haloanaerobiales* et l'espèce *Salinibacter ruber* [305]. La deuxième stratégie d'osmoadaptation repose sur l'accumulation des solutés compatibles, qui sont des composés organiques de faibles poids moléculaires, fortement hydrosolubles, dits "compatibles" car leur accumulation dans le cytoplasme n'a aucun effet nocif sur le métabolisme cellulaire [306]. Il s'agit d'effecteurs osmotiques, agissant en augmentant l'osmolarité intracellulaire, permettant ainsi de maintenir ou de rétablir la pression de turgescence cellulaire en cas de stress hyperosmotique. Certains de ces composés ont également un effet stabilisateur sur la conformation des macromolécules de la cellule, c'est pourquoi ils sont aussi appelés osmoprotecteurs [307, 308].

Les solutés compatibles peuvent être accumulés dans la cellule grâce à une synthèse *de novo* ou grâce à un transport actif s'ils sont présents dans le milieu [306]. Ils se répartissent en quatre groupes majeurs : (i) les sucres, dont le tréhalose est le plus représenté ; (ii) les polyols, par exemple le glycérol, le sorbitol et le mannitol ; (iii) les acides aminés et leurs dérivés, dont la glycine bêtaïne qui est considérée comme le soluté compatible universel, et (iv) d'autres classes de composés tels que les phosphodiesteres ou les dérivés de l'acide glycérique (Tableau 10) [302]. Les polyols sont souvent utilisés comme osmoprotecteurs chez des fungi, mais très rarement chez les bactéries. Les solutés souvent trouvés chez les bactéries comprennent la glycine bêtaïne, l'ectoïne, l'hydroxyectoïne et la proline [305]. Durant le stress hyperosmotique, les changements dans la composition de la membrane cytoplasmique ont aussi été observés, par exemple un accroissement du taux des phospholipides anioniques tels que le diphosphatidylglycérol (DPG) ou le phosphatidylglycérol (PG), suggérant que cela fait partie des mécanismes d'osmorégulation des microorganismes [309–311].

b. Résistance au sel des microorganismes de la surface du fromage

La teneur en sel dans les fromages varie selon les variétés, allant de ~0,7% chez les fromages à pâte pressée cuite à ~6% chez le fromage Domiati, ce qui participe à la sélection des communautés microbiennes associées [312]. Parmi les levures, *Debaromyces hansenii* est reconnu pour sa forte tolérance au sel, jusqu'à 16% de NaCl [219]. Des mécanismes physiologiques et moléculaires impliqués dans l'osmotolérance chez *D. hansenii* ont été largement étudiés, notamment l'accumulation du glycérol qui est le soluté compatible principal de cette levure [313]. *Geotrichum candidum* est généralement moins tolérant au sel que *D. hansenii*, sa concentration de sel tolérée varie entre 1 et 5% selon la souche [240]. Cette levure colonise la surface de plusieurs variétés de fromage dont les fromages à croûte fleurie (par exemple le Camembert, le Brie) qui représentent un bon exemple de l'influence du salage sur l'implantation des communautés microbiennes. Chez ces fromages, une trop faible teneur en sel entraîne une croissance excessive de *G. candidum*, conduisant à l'apparition des défauts de surface dénommés "peau de crapaud". D'autre part, si la teneur en sel est trop élevée, la croissance de *G. candidum* sera inhibée, d'où un développement excessif de *Penicillium camemberti*, ce qui peut causer le défaut d'amertume par excès de protéolyse [208]. La teneur en sel élevée à la surface des fromages pourrait aussi expliquer l'apparition des bactéries souvent trouvées dans le milieu marin telles que *Halomonas* spp., *Pseudoalteromonas* spp. ou *Vibrio* spp. [32, 314–316]. Plusieurs bactéries isolées de la surface des fromages sont stimulées par le sel, certaines souches peuvent tolérer jusqu'à 16% NaCl [219]. Les génomes des souches séquencées de ces bactéries sont bien équipés en gènes impliqués dans l'osmoprotection. À titre exemple, 15 gènes probablement impliqués dans le transport de glycine bêtaïne et d'autres solutés compatibles ont été identifiés dans le génome

de *Glutamicibacter arilaitensis* Re117, une souche d'origine fromagère, contre un nombre bien plus faible (6 à 9 gènes) chez les souches de *Glutamicibacter* isolées du sol, beaucoup moins tolérantes à des concentrations élevées en sel [280]. Plusieurs transporteurs appartenant à la famille BCCT (Betaine/Carnitine/Choline Transporter) ont été identifiés chez *B. aurantiacum* ATCC 9174 et *Corynebacterium variabile* DSM 44702 [209, 281].

Tableau 10. Principaux groupes de solutés compatibles [302].

Groupe	Exemples
Acides aminés et dérivés	Glycine bêtaïne
	Ectoïne et hydroxyectoïne
	Proline
	Alanine
	α -Glutamine ; β -Glutamine
	α -Glutamate
	<i>N</i> - δ -Acétyl-ornithine
Sucres	Tréhalose
	Saccharose
Polyols	Glycérol
	Sorbitol
	Mannitol
Autres	Phosphodiesteres : - Di- <i>myo</i> -inositol phosphate (DIP) - Di-mannosyl-di- <i>myo</i> -inositol phosphate
	Dérivés de l'acide glycérique : - Mannosylglycérate - Glucosylglycérate - Cyclic-2,3-diphosphoglycérate (cDPG)

4. Fer

Le fer est un micronutriment essentiel pour tous les être-vivants, à part quelques exceptions dont les bactéries du genre *Lactobacillus* [317]. En effet le fer est impliqué dans plusieurs processus biologiques majeurs tels que la respiration, le cycle de Krebs ou la biosynthèse des acides nucléiques [317]. Néanmoins, le fromage représente un milieu très restreint en fer. En effet, le lait est pauvre en fer (0,3 à 0,6 mg/l dans le lait bovin) [318] et contient de la lactoferrine, une glycoprotéine qui possède des propriétés antimicrobiennes dues à sa forte affinité pour le fer [319]. Dans l'environnement, le fer existe sous deux formes redox : la forme réduite ferreuse (Fe^{2+}) et la forme oxydée ferrique (Fe^{3+}). En raison de la présence de l'oxygène, le fer à la surface du fromage se trouve sous forme ferrique qui est extrêmement insoluble (seulement 10^{-18} M à pH 7,0) et n'est donc pas directement assimilable [317]. De plus, la matrice solide du fromage pourrait également limiter la diffusion du fer et des substances contenant du fer [320]. La faible disponibilité en fer à la surface du fromage

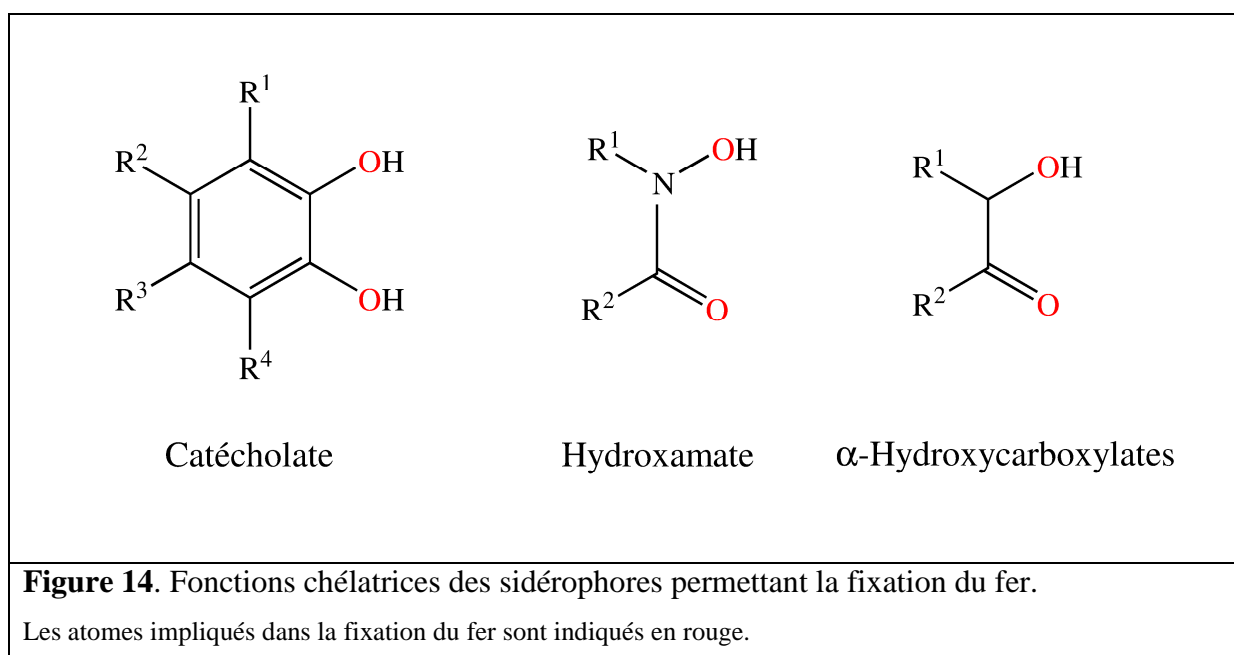
impose donc une pression sélective en faveur des microorganismes qui possèdent des systèmes d'acquisition du fer efficaces et/ou qui ont un faible besoin en fer.

a. Mécanismes d'acquisition du fer chez les microorganismes

Les microorganismes ont développé différents systèmes pour acquérir le fer indispensable à leur croissance. Ici nous nous intéressons seulement aux sources de fer minéral, et non aux sources de fer biologique telles que l'hème ou la transferrine qui sont souvent utilisées par des parasites [317]. Comme mentionné précédemment, le fer minéral existe sous forme ferrique (Fe^{3+}) ou ferreuse (Fe^{2+}). La forme ferreuse est présente majoritairement en condition anaérobie, elle est relativement soluble et peut être directement transportée dans la cellule [317]. À l'inverse, la forme ferrique, qui est majoritaire en condition aérobie, est extrêmement insoluble et doit être solubilisée avant d'être incorporée dans la cellule. Pour cela, deux mécanismes majeurs ont été décrits, soit par chélation *via* des sidérophores, soit par réduction en forme ferreuse [317].

La chélation du fer ferrique *via* des sidérophores

Les sidérophores sont des molécules de faibles poids moléculaires (500 à 1500 Da), caractérisées par une forte affinité pour le fer ferrique ($K_{\text{aff}} > 10^{30}$) [321]. Plusieurs bactéries et champignons sont capables de synthétiser et excréter des sidérophores afin de séquestrer le fer en carence de fer [322]. Il existe une très grande diversité de sidérophores, et plus de 500 sidérophores ont été mis en évidence [321]. Les sidérophores sont classés selon leurs fonctions chélatrices du fer, dont (i) les hydroxamates, (ii) les α -hydroxycarboxylates, (iii) les catécholates/phénolates et (iv) les formes mixtes, c'est-à-dire contenant au moins deux différents types de fonction chélatrice [323] (Figure 14).



Les sidérophores sont synthétisés *via* deux voies principales : l'une menée par des peptides synthétases non ribosomiques (NRPS) et l'autre dite NRPS indépendante [322]. Les sidérophores de type catécholate/phénolate tels que l'entérobactine chez *Escherichia coli*, la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa* ou la mycobactine chez *Mycobacterium tuberculosis* sont généralement produits par la voie NRPS, alors que plusieurs sidérophores de type hydroxamate ou α -hydroxycarboxylate tels que l'aérobactine chez *E. coli*, la déféroxamine chez les *Streptomyces* spp. ou la staphylobactine chez *Staphylococcus aureus*

sont synthétisés par la voie NRPS indépendante [322, 324]. Une fois synthétisés, les sidérophores sont exportés dans le milieu extracellulaire à l'aide des protéines de transport ou des pompes à efflux [322].

La réduction du fer ferrique en fer ferreux

Les systèmes de réductase ferrique permettant la réduction du fer ferrique en fer ferreux sont largement utilisés chez les levures pour récupérer le fer dans le milieu [325]. À titre exemple, plusieurs réductases ferriques membranaires, nommées Fre, ont été identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* [326]. Les substrats de ces enzymes comprennent des sels ferriques et aussi des complexes fer-sidérophores [325].

La production de réductase ferrique extracellulaire a été également mise en évidence chez certaines bactéries telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Listeria monocytogenes* [327]. Toutefois, les mécanismes moléculaires de cette activité restent encore peu connus [317]. À ce jour, la seule réductase ferrique extracellulaire purifiée chez les bactéries est celle de *Mycobacterium paratuberculosis* [328].

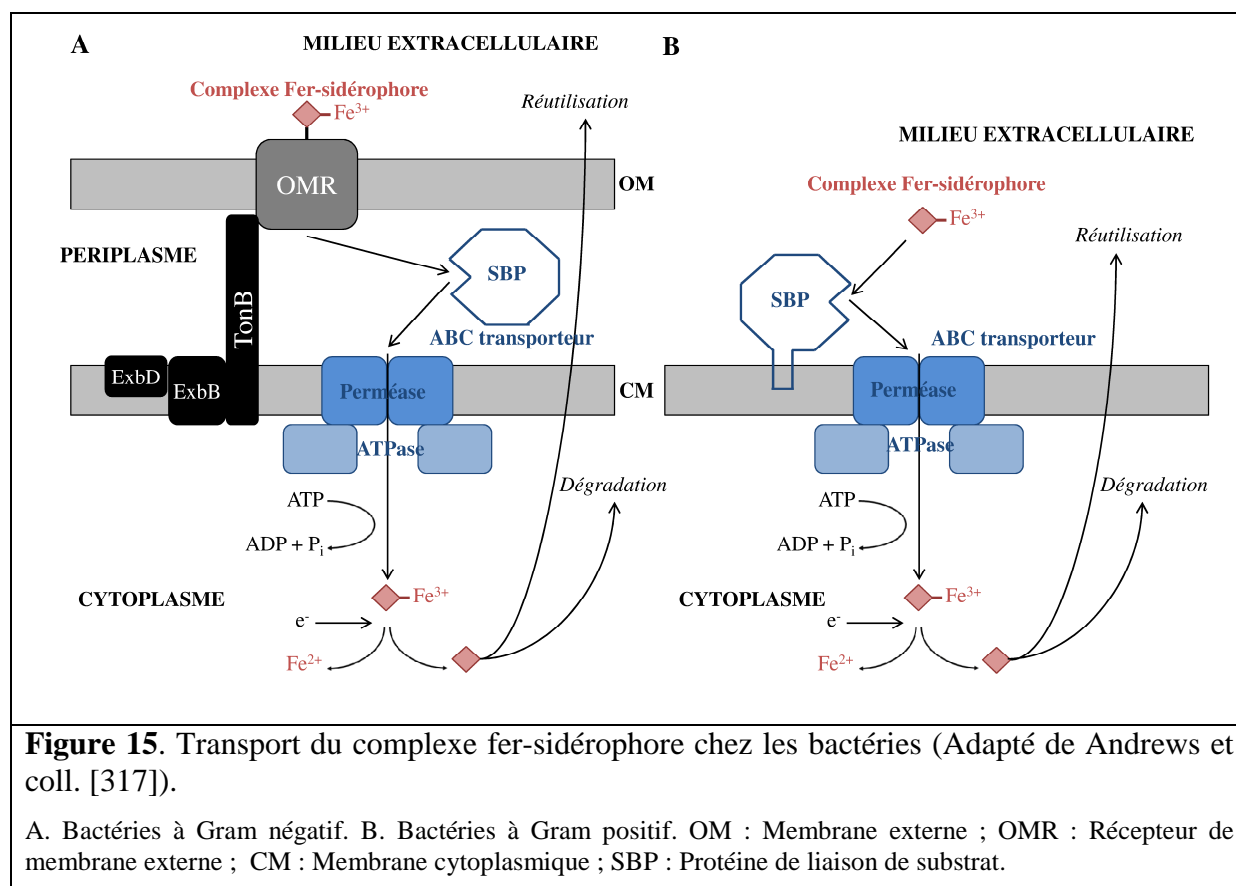
Le transport du fer

Le transport du complexe fer-sidérophore

Une fois excrétés dans le milieu extracellulaire, les sidérophores chélatent le fer ferrique, puis le complexe fer-sidérophore est importé dans la cellule *via* des transporteurs spécifiques. Chez les fungi, il s'agit des transporteurs de la famille SIT (Siderophore-Iron Transporter), précédemment désignée UMF (Unknown Major Facilitator) [329]. Par exemple, la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède quatre transporteurs de sidérophores qui diffèrent par leur spécificité de substrat : Sit1p/Arn3p, Arn1p, Taf1p/Arn2p, et Enb1p/Arn4p [329]. La force motrice de ces transporteurs est le potentiel membranaire [329].

Les bactéries, quant à elles, utilisent généralement des ABC transporteurs (ATP-Binding Cassette transporter) [330]. Un ABC transporteur typique est constitué de trois sous-unités : (i) une protéine de liaison de substrat (SBP en Anglais : Substrate-Binding Protein) ; (ii) une perméase, composée de deux domaines hydrophobes transmembranaires (MSD en Anglais : Membrane Spanning Domain), et (iii) une ATPase cytoplasmique, composée de deux domaines liant et hydrolysant l'ATP (NBD en Anglais : Nucleotide Binding Domain) [330, 331]. En principe, la protéine de liaison de substrat permet de mener le substrat vers la perméase qui utilise l'énergie fournie par l'ATPase pour transporter le substrat à travers la membrane [322]. Les systèmes de transport de complexes fer-sidérophores diffèrent également entre les bactéries à Gram négatif et celles à Gram positif (Figure 15). Chez les bactéries à Gram négatif, le complexe fer-sidérophore traverse la membrane externe *via* un récepteur spécifique (OMR en Anglais : Outer Membrane Receptor) qui fonctionne grâce à l'énergie fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD inclus dans la membrane interne avant d'être pris en charge par l'ABC transporteur dédié [317, 322]. La protéine de liaison de substrat de l'ABC transporteur se trouve dans le périplasme [322]. Chez les bactéries à Gram positif qui possèdent une seule membrane mais où la couche de peptidoglycane est beaucoup plus épaisse, l'importation du complexe fer-sidérophore se fait simplement par les ABC transporteurs analogues à ceux utilisés par des bactéries à Gram négatif, sauf que la protéine de liaison est généralement une lipoprotéine attachée à la surface cellulaire [317, 322]. Cet attachement au peptidoglycane est obtenu par l'action d'une classe d'enzymes spécifiques appelées sortases [332].

Après avoir été importé dans la cellule, le complexe fer-sidérophore est dissocié afin que le fer puisse être utilisé dans les processus métaboliques. Cette dissociation se fait soit par l'hydrolyse du sidérophore, soit par la réduction de la forme ferrique (Fe^{3+}) en forme ferreuse (Fe^{2+}) [322]. Après dissociation, le sidérophore peut être dégradé ou recyclé pour un nouveau cycle de transport [322]. Les microorganismes peuvent utiliser les sidérophores produits par eux-mêmes mais aussi des sidérophores exogènes produits par d'autres microorganismes [317].



Le transport du fer ferreux

Le transport du fer ferreux est répandu chez les levures dotées de systèmes de réduction ferrique extracellulaires [325]. Il a été intensivement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui possède deux systèmes de transport indépendants : un transporteur à faible affinité nommé Fet4 et un complexe ferroxidase/perméase à haute affinité nommé Fet3/Ftr1 [325, 329].

Chez les bactéries, le fer ferreux est majoritairement transporté par des systèmes de transport de type Feo (*Ferrous iron transport*) [333]. À titre exemple, le système FeoABC, caractérisé chez *Escherichia coli*, est composé de trois protéines : FeoA, FeoB et FeoC. La protéine FeoB est une perméase de la membrane interne, elle est spécifique du fer ferreux et contenant un domaine à l'activité GTPase qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport du fer à travers la membrane [334]. Le rôle des protéines FeoA et FeoC n'est pas complètement connu, il a été suggéré que FeoA a un rôle régulateur sur l'activité de FeoB, et que FeoC est un régulateur transcriptionnel de l'opéron *feo* [335, 336]. Le système Feo joue un rôle particulièrement important en condition anaérobie ou à pH acide où le fer ferreux représente la forme majoritaire du fer [317]. D'autres types de transporteurs du fer ferreux ont été également identifiés : (i) les ABC transporteurs et (ii) les transporteurs de type EfeUOB qui sont similaires au système Fet3/Ftr1 chez les levures [317, 337, 338].

b. Acquisition du fer chez les microorganismes de la surface du fromage

La production de sidérophores a été montrée chez les moisissures de genre *Penicillium* et *Scopulariopsis* [339–341]. Les levures *Saccharomycotina* telles que *Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* et *Yarrowia lipolytica* ne produisent pas de sidérophores mais peuvent utiliser des sidérophores produits par d'autres microorganismes [342]. La production et l'utilisation de sidérophores chez les bactéries du genre *Brevibacterium*, notamment des souches isolées du fromage, ont été examinées par Noordman et coll. [343]. Plusieurs souches se révèlent capables de synthétiser des sidérophores, d'autres souches ne produisent pas de sidérophores mais sont capables d'en utiliser [343]. La stimulation de croissance des bactéries d'affinage appartenant aux genres *Glutamicibacter*, *Corynebacterium* et *Brevibacterium* par l'ajout du fer ou d'un sidérophore (desferrioxamine B) a été démontrée dans un fromage modèle [320]. La ferrioxamine G, un sidérophore de type hydroxamate, est le principal sidérophore produit par *H. alvei* [344]. L'analyse génomique révèle que les bactéries d'affinage sont bien équipées en gènes impliqués dans l'acquisition du fer. L'opéron *sbnABCDEFGHI* responsable de la biosynthèse du sidérophore type staphylobactin a été identifié dans le génome de *Staphylococcus equorum* Mu2, suggérant que cette souche fromagère est capable de sequestrer le fer lors de sa croissance à la surface du fromage [345, 346]. Kastman et coll. [341] ont démontré que la production de sidérophores par *Scopulariopsis* stimule fortement et spécifiquement la croissance de *S. equorum*, ce qui pourrait expliquer l'abondance de ce dernier dans les fromages par rapport aux autres staphylocoques tels que *S. saprophyticus* et *S. xylosus*. Des clusters de gènes de biosynthèse de sidérophores ont été également détectés dans les génomes de *G. arilaitensis* Re117, *B. aurantiacum* ATCC 9174 et *C. variable* DSM 44702 [209, 280, 281]. Les bactéries de la classe *Actinobacteria* isolées du fromage sont dotées d'un nombre plus important de composants d'ABC transporteurs de complexes fer-sidérophore que celles isolées des autres habitats [320].

B. Les facteurs biotiques

Le fromage constitue un écosystème dans lequel une grande diversité de microorganismes cohabitent et interagissent entre eux. L'ensemble de ces interactions module la structure des communautés microbiennes et leurs activités, ce qui joue un rôle décisif dans le développement des qualités sensorielles et sanitaires du produit final. La compréhension des interactions microbiennes au sein de l'écosystème fromager demeure donc indispensable pour la maîtrise de la qualité du fromage. Or nos connaissances sur ces interactions, notamment sur leurs mécanismes moléculaires, restent encore parcellaires.

Dans la partie suivante, nous allons d'abord aborder les différents types d'interactions qui existent dans le monde microbien à travers des exemples concernant les produits fromagers ou laitiers. Nous ferons ensuite un point sur les approches utilisées à ce jour pour l'étude des communautés microbiennes des fromages.

1. Les principaux types d'interactions entre microorganismes

Une interaction biologique signifie un processus impliquant des relations réciproques entre les individus d'une même population (interaction intraspécifique) ou entre différentes espèces au sein d'un écosystème (interaction interspécifique). Ici nous nous intéressons plus particulièrement à l'échelle interspécifique.

Généralement, les interactions biologiques sont caractérisées par les effets qu'elles apportent aux organismes en interaction, ce qui peut être bénéfique (+), néfaste (-) ou neutre

(0). Selon leurs effets sur chacun des deux partenaires de l'interaction, les interactions interspécifiques sont classées en 6 catégories : la neutralisme (0/0), le mutualisme (+/+), le commensalisme (+/0), le parasitisme ou la prédation (+/-), l'amensalisme (-/0) et la compétition (-/-) (Figure 16) [347].

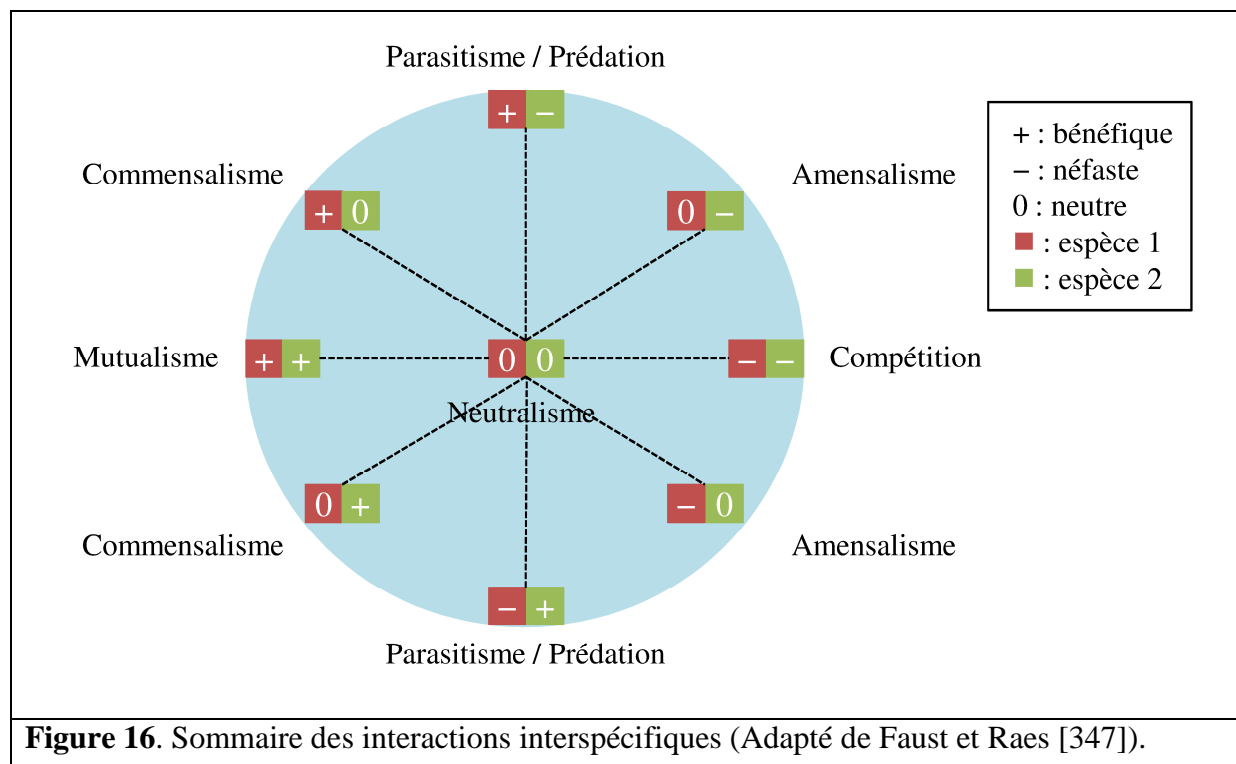


Figure 16. Sommaire des interactions interspécifiques (Adapté de Faust et Raes [347]).

Le **neutralisme** signifie une interaction dans laquelle les partenaires sont indépendants entre eux, c'est-à-dire la présence de l'un n'a aucune incidence sur la croissance de l'autre, et *vice versa*.

Le **mutualisme** désigne une interaction où tous les partenaires tirent profit l'un de l'autre.

Le **commensalisme** indique une interaction dans laquelle l'un des deux partenaires bénéficie de la présence de l'autre, sans que ce dernier en tire profit.

Le **parasitisme** et la **prédation** sont des interactions où l'un des deux partenaires bénéficie d'avantages au détriment de l'autre.

L'**amensalisme** représente une interaction où l'un des deux partenaires inhibe la croissance de l'autre sans frais ou avantages reçus par lui-même.

Enfin, lorsque les microorganismes sont présents dans un même milieu, ils peuvent entrer en **compétition** pour les nutriments, notamment quand ces derniers sont limités.

Les interactions microbiennes connues dans les produits fromagers et laitiers sont résumées dans le Tableau 11, et certaines vont être analysées en détail dans les paragraphes suivants. Un point important à retenir est que cette classification n'est pas absolue. En effet on se trouve souvent dans des cas intermédiaires où différents types d'interaction coexistent, par exemple le mutualisme et la compétition, ou le mutualisme et l'amensalisme. Un exemple de ce type sera présenté dans la partie II-B-1-b : l'interaction entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Tableau 11. Interactions microbiennes dans les produits fromagers et laitiers [348].

Type d'interaction	Produit	Microorganismes impliqués	Ref.
Mutualisme	Yaourt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[349–357]
	Produits laitiers	Bactéries lactiques	[358]
	Lait	Bactéries lactiques, levures	[359, 360]
Commensalisme	Produits laitiers	Bactéries lactiques	[358]
	Yaourt, produits laitiers	Bactéries lactiques, bactéries propioniques	[361]
	Lait	Bactéries lactiques, levures	[359, 360]
	Fromage affiné	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Glutamicibacter</i> spp., <i>Brevibacterium</i> spp., <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Micrococcus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.	[27, 362]
Parasitisme	Lait	Bactéries, phages	[363, 364]
Amensalisme	Produits laitiers	Bactéries lactiques, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	[365, 366]
	Yaourt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[367, 368]
	Fromage affiné	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	[369]
Compétition	Yaourt	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	[235]
	Produits laitiers	Bactéries lactiques, levures	[359, 360]

a. Neutralisme

Le neutralisme ne paraît pas dans certaines classifications d'interactions microbiennes du fait que ceci se définit comme l'absence d'interactions entre les microorganismes en question [348, 370]. À vrai dire, il est peu probable que les microorganismes coexistent dans un même environnement sans aucune interaction [371]. Il s'agit plutôt d'interactions suffisamment faibles pour que les effets soient négligeables pour les microorganismes concernés [371]. Par exemple, Lewis a trouvé que la croissance de deux souches bactériennes appartenant au genre *Lactobacillus* et *Streptococcus* isolées du yaourt est identique entre la culture pure et la culture mixte de deux souches [372]. Le neutralisme se produit généralement entre les microorganismes utilisant des substrats énergétiques différents ou quand les substrats sont en excès, comme en début de culture [371].

b. Mutualisme

L'interaction entre les deux ferments de yaourt *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* représente l'exemple le mieux étudié du mutualisme dans les écosystèmes laitiers [348]. En effet, l'association de ces ferments résulte en une croissance accrue de chacune des deux bactéries, une augmentation de la vitesse d'acidification, une stimulation de la production des composés aromatiques et une amélioration de la stabilité physique du produit par rapport à celles observées lors de l'utilisation des cultures pures [349]. Ce phénomène s'explique du fait que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, très protéolytique grâce à l'action de la protéase de paroi PrtB, dégrade la caséine en oligopeptides plus facilement assimilables par *S. thermophilus* dont la plupart des souches ne possèdent pas de protéase extracellulaire [350, 351]. À son tour, *S. thermophilus* stimule la croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en produisant de l'acide formique, de l'acide folique et du CO₂. En fait, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ne peut pas synthétiser *de novo* l'acide formique et l'acide folique qui sont impliqués dans la biosynthèse des purines, indispensables pour la synthèse de l'ADN [352, 353, 373]. Ainsi, cette bactérie profite de la présence de *S. thermophilus* qui produit et excrète ces deux acides [353, 354]. Le CO₂ est un précurseur pour la biosynthèse d'acides aminés et de nucléotides [374]. Il a été démontré que *S. thermophilus* produit et libère du CO₂ à partir d'urée présent dans le lait, ce qui stimule la croissance de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [355]. D'autres métabolites ont également été suggérés comme impliqués dans le mutualisme entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, par exemple des acides gras à longue chaîne, les purines, l'ornithine et la putrescine [349, 356, 357].

D'autre part, l'interaction entre *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* n'est pas totalement mutualiste, il existe également une compétition pour les nutriments et de l'amensalisme par la production de bactériocines qui inhibent l'autre partenaire [235, 367, 368]. Les différentes interactions connues entre ces deux bactéries sont récapitulées dans la Figure 17. L'amensalisme sera analysé plus tard dans la partie II-B-1-e, la compétition dans la partie II-B-1-f.

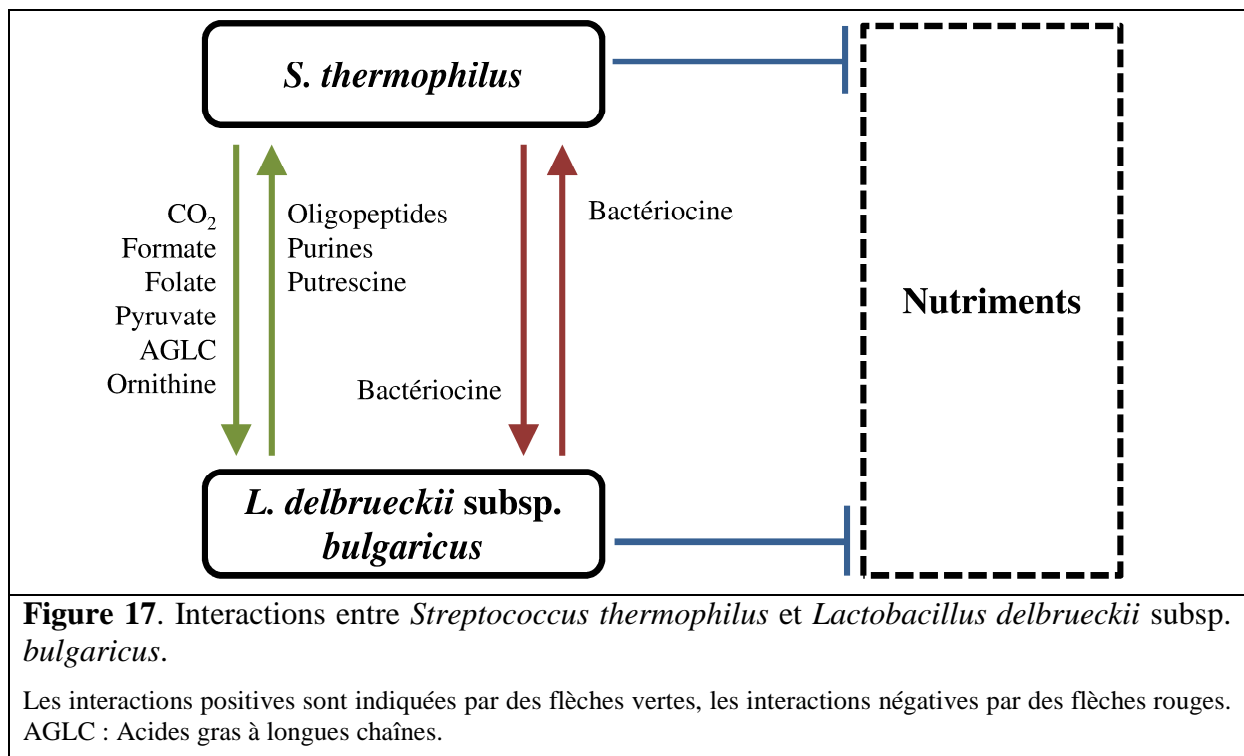


Figure 17. Interactions entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Les interactions positives sont indiquées par des flèches vertes, les interactions négatives par des flèches rouges. AGLC : Acides gras à longues chaînes.

c. Commensalisme

L'impact positif des levures dans l'implantation des bactéries de surface lors de l'affinage du fromage est un exemple représentatif du commensalisme. En effet, les levures telles que *Debaryomyces hansenii* et *Geotrichum candidum* permettent la désacidification du caillé en consommant le lactate produit par les bactéries lactiques et en libérant des métabolites alcalins tels que l'ammoniac suite au catabolisme des acides aminés [27]. Ainsi, une communauté microbienne aérobie et acido-sensible, constituée d'espèces telles que *Glutamicibacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. et *Staphylococcus* spp. peut se développer [362]. Les levures sont également capables d'excréter des composés stimulant la croissance des bactéries d'affinage [27]. Par exemple, Purko et coll. [375] ont démontré que des levures isolées de la surface du fromage Limburger produisent des vitamines du groupe B dont l'acide pantothénique, la riboflavine et la niacine. Ces composés, notamment l'acide pantothénique, sont nécessaires à la croissance de *B. linens* [65]. Des levures fortement protéolytiques et/ou lipolytiques telles que *Yarrowia lipolytica* et *Candida catenulata* produisent des quantités importantes d'acides aminés libres et/ou d'acides gras libres qui servent de substrats pour d'autres microorganismes y compris des bactéries d'affinage [376]. Lubert et Frazier [377] ont prouvé que les produits de l'autolyse des levures isolées du fromage Brick stimulent la croissance des bactéries du genre *Micrococcus*. L'autolyse des levures, surtout de celles qui sont moins halotolérantes, se produit souvent durant le salage : l'apport du sel fragilise leurs parois qui éclatent, libérant ainsi des nucléotides, des peptides et d'autres métabolites favorisant la croissance des bactéries d'affinage [12]. L'interaction entre les levures et les bactéries d'affinage est souvent classée comme une relation de type commensalisme du fait que seules les bactéries d'affinage en bénéficient [348]. Cependant, il n'est pas exclu que les levures elles-mêmes en tirent profit : en effet certains auteurs ont observé une stimulation réciproque entre *G. candidum* et *B. linens* [378]. Les mécanismes à l'origine de cette coopération n'ont cependant pas encore mis en évidence.

d. Parasitisme

L'infection des bactéries lactiques par des bactériophages est un exemple bien connu du parasitisme. Les processus de fermentation, notamment ceux qui sont liés à l'utilisation répétée du matériel, sont souvent exposés à ce phénomène [348]. Au cours de la fermentation, l'attaque des bactériophages peut entraîner la lyse des souches d'intérêt, conduisant à l'altération du produit fermenté [364]. Les bactériophages des bactéries lactiques ont été intensément étudiés, plusieurs génomes de bactériophage ont été séquencés [363, 364, 379]. Les génomes de bactériophage comportent des séquences qui permettent des transferts horizontaux de gènes entre différentes populations bactériennes, accélérant ainsi l'évolution des communautés bactériennes [380, 381].

e. Amensalisme

L'amensalisme résulte généralement de la production de substances inhibitrices envers d'autres microorganismes [348]. Dans la fermentation alimentaire, ce type d'interaction joue un rôle important dans l'inhibition des microorganismes d'altération et/ou pathogènes [382]. Les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines représentent des exemples souvent mentionnés parmi les substances inhibitrices agissant dans l'amensalisme.

Les acides organiques

En général, l'effet des acides organiques envers des microorganismes sensibles est bactériostatique : ces composés ne diminuent pas la viabilité des microorganismes mais inhibent leur croissance en prolongeant leur phase de latence [365]. Au cours de la fabrication du fromage, la production d'acide lactique par la fermentation du lactose chez les bactéries lactiques pendant la phase d'acidification joue un rôle important dans l'inhibition des bactéries altérantes et/ou pathogènes, par exemple celles appartenant aux genres *Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* ou *Clostridium* [383]. Cet effet dépend des stéréoisomères de l'acide lactique : la forme L se révèle plus inhibitrice que la forme D [384]. L'acide acétique est produit par des bactéries lactiques hétérofermentaires, par exemple *Leuconostoc* spp. et certaines espèces du genre *Lactobacillus*. L'acide acétique est plus inhibiteur que l'acide lactique, notamment envers les levures et les moisissures, ce qui est dû à sa constante de dissociation plus élevée (pK_a de 4,75 chez l'acide acétique contre 3,1 chez l'acide lactique) [365, 383]. L'acide acétique et l'acide lactique peuvent agir de façon synergique : en effet l'acide lactique baisse le pH du milieu, ce qui augmente la toxicité de l'acide acétique [365, 385]. L'acide phényllactique produit par certaines bactéries lactiques telles que *Lactobacillus plantarum* inhibe différentes espèces de moisissures comme celles appartenant aux genres *Penicillium* ou *Aspergillus* [386].

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Plusieurs bactéries lactiques sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène [365]. Cette molécule a un effet bactéricide dû à sa forte capacité d'oxydation [365]. Cet effet est d'autant plus important en présence de métaux tels que le fer, ce qui déclenche la réaction de Fenton générant des espèces radicalaires : $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO\cdot + OH^-$ [387]. Le peroxyde d'hydrogène peut également activer la lactoperoxydase, un système enzymatique antimicrobien présent naturellement dans le lait [388]. L'effet d'inhibition du peroxyde d'hydrogène produit par des bactéries lactiques envers des bactéries pathogènes ou altérantes telles que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas* spp. a été démontré [389, 390].

Les bactériocines

Les bactériocines sont des substances protéiques antimicrobiennes produites par des bactéries [366, 391]. Cette activité antimicrobienne est soit bactéricide, entraînant la mort des bactéries sensibles, soit bactériostatique, inhibant la croissance bactérienne [391]. Les bactériocines sont synthétisées par voie ribosomique, ce qui les distingue des antibiotiques qui sont des métabolites secondaires [391]. Les bactériocines sont très divergentes en terme de structures, de voies de biosynthèse et de mécanismes d'action, d'où l'existence de plusieurs classifications [366, 392–394]. La classification selon Heng et coll. [394] est présentée dans la Figure 18, divisant les bactériocines en quatre grands groupes : (i) les lantibiotiques, qui sont des peptides subissant des modifications post-traductionnelles correspondant à des ajouts d'acides aminés non protéinogènes tels que la lanthionine et la 3'-méthyllanthionine ; (ii) les petits peptides (<10 kDa) non modifiés post-traductionnellement ; (iii) les protéines antimicrobiennes (>10 kDa) ; et (iv) les peptides circulaires. Les bactériocines modifiées post-traductionnellement appartiennent à une grande classe de substances naturelles nommées peptides ribosomiques avec modifications post-traductionnelles (RiPPs en Anglais : Ribosomally Synthesized and Post-translationally modified Peptides) qui regroupent également des peptides ayant d'autres propriétés que l'activité antimicrobienne [395]. Les RiPPs ont été classés en 13 groupes en se basant sur leurs structures et leurs voies de biosynthèse (Tableau 12) [395, 396].

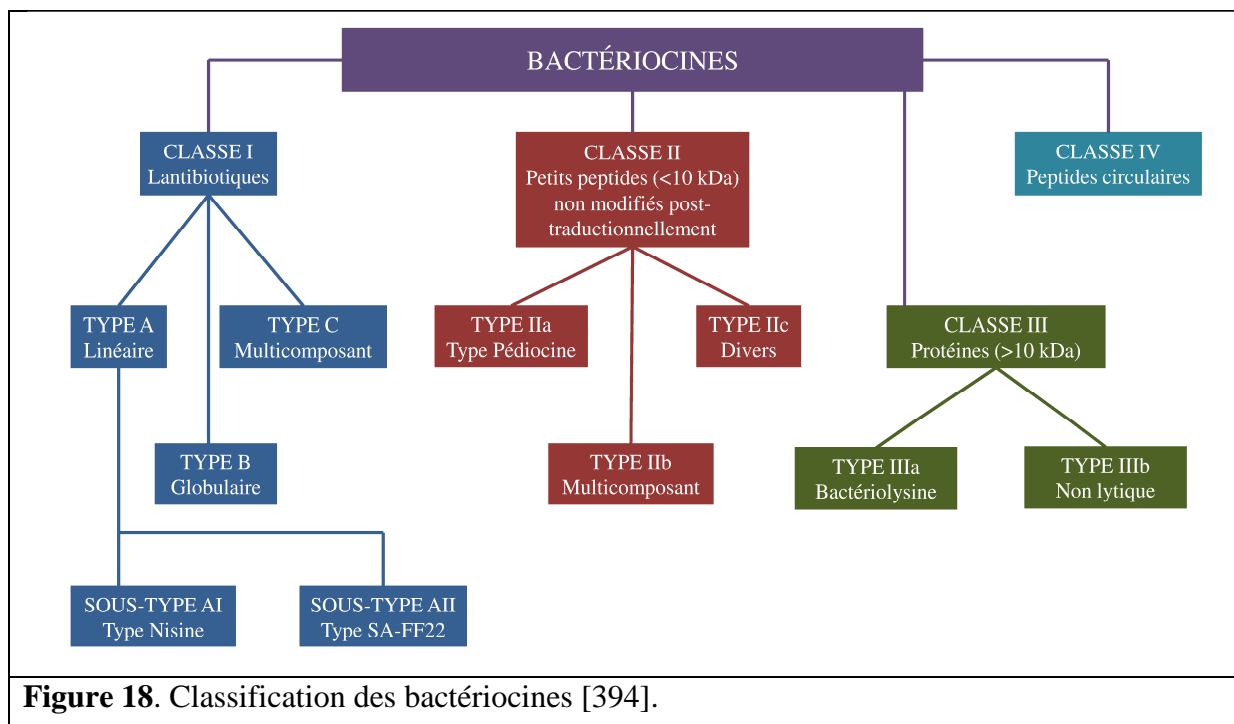


Tableau 12. Classification des peptides ribosomiques avec modifications post-traductionnelles (RiPPs)^a [395, 396].

Groupe	Caractéristiques	Exemples
Lanthipeptide	Contenant des résidus lanthionine et/ou 3'-méthyllanthionine	Nisine, mersacidine, cinnamycine
Linaridine	Contenant des réticulations de thioéther	Cypemycine
Proteusine	Contenant plusieurs hydroxylations, épimérisation et méthylations	Polytheonamide A
LAP ^b	Contenant des hétérocycles azoles ou azolines	Microcine B17
Cyanobactine	Possédant une structure macrocyclique avec des liaisons N-C	Patellamide A
Thiopeptide	Contenant un anneau central de pyridine ou dihydropyridine ou pipéridine et d'autres hétérocycles	Thiostreptone A
Bottromycine	Contenant un macrocycle d'amidines, un groupe thiazole et des acides aminés méthylés	Bottromycine A2
Structure de type microcine C7/C51	Possédant une structure heptapeptidique avec une adénosine modifiée	Microcine C
Peptide lasso	Possédant un cycle macrolactame N-terminal, dans lequel est insérée et piégée la queue C-terminale	Microcine J25
Microviridine	Tri- ou tétra-décapeptide cyclique N-acétylé contenant des liaisons ester et/ou amide intramoléculaire	Microviridine B
Sactipeptide	Contenant des liaisons S-C _α	Subtilosine A
Peptide cyclique "tête à queue"	Possédant une liaison peptidique entre le C- et le N-terminal	Entérocyne AS-48
Glycocine	Contenant des cystéines glycosylées	Sublancine 168

^aSeuls les peptides bactériens sont tenus en compte

^bLinear azol(in)e-containing peptide

La biosynthèse des bactériocines implique souvent un groupe de gènes, ou cluster, qui comporte typiquement des gènes codant pour : (i) le peptide précurseur ; (ii) des protéines impliquées dans la maturation du peptide précurseur pour former la forme active ; (iii) des protéines impliquées dans le transport de la bactériocine vers le milieu extracellulaire ; (iv) des protéines régulatrices ; et (v) des protéines d'immunité impliquées dans la protection de la souche productrice contre sa propre bactériocine [391]. Les bactériocines ont différents mécanismes d'action, elles peuvent agir sur la membrane cellulaire en formant des pores, ou sur l'expression des gènes et la biosynthèse des protéines en interagissant avec la machinerie cellulaire de la cellule cible [396]. Le spectre d'action, étroit ou large, varie d'une bactériocine à l'autre [366]. Une attention particulière est portée sur la production des bactériocines chez des bactéries lactiques connues pour leur statut GRAS (Generally Recognized As Safe en Anglais : généralement reconnu inoffensif) et leur rôle important dans la conservation des aliments [366]. La nisine, une bactériocine produite par certaines souches de *Lactococcus lactis*, est largement utilisée comme conservateur alimentaire dans de nombreux produits y compris le fromage [397, 398].

Concernant les bactéries du fromage, la production des bactériocines a été mise en évidence chez non seulement des bactéries lactiques mais aussi chez des bactéries d'affinage du genre *Brevibacterium* (Partie I-B-2-c) [398]. Dans une étude de criblage menée par Carnio et coll. [399], l'activité inhibitrice contre *Listeria monocytogenes* a été détectée chez 30 souches de bactéries d'affinage appartenant aux genres *Glutamicibacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* et *Micrococcus*. Les substances anti-*Listeria* produites par ces bactéries, même si suggérées comme bactériocines, n'ont toutefois pas été caractérisées [399]. Plusieurs travaux ont été réalisés sur la production de bactériocines chez des bactéries du fromage afin d'inhiber des bactéries d'altération et/ou pathogènes comme *Listeria* spp. et *Clostridium* spp. (Tableau 13), cependant leurs applications restent encore limitées [398].

Tableau 13. Utilisation de bactériocines ou de souches productrices de bactériocines contre *Listeria monocytogenes* dans le fromage [362].

Bactériocine(s)	Souche productrice	Mode d'utilisation	Ref.
Entérocoque 416K1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> IM 416K1	Bactériocine mise dans les films polymères	[400]
Céréine 8A	<i>Bacillus cereus</i> 8A	Bactériocine mise à la surface	[401]
Entérocoque A et B	<i>Enterococcus faecium</i> WHE 81	Culture complémentaire mise dans la saumure et la solution d'affinage	[402]
Lacticine 3147	<i>Lactococcus lactis</i> DPC 4275	Culture pulvérisée en surface	[403]
Nisine et pédiocine PA-1	<i>L. lactis</i> recombinant	Culture starter	[404]
Entérocoque A	<i>L. lactis</i> recombinant	Culture starter	[405]

f. Compétition

La compétition microbienne pour les éléments nutritifs est un phénomène omniprésent. En 1962, Jameson a décrit l'interaction entre deux populations comme une compétition à utiliser les ressources de l'environnement pour optimiser la croissance [406]. Lorsque ces ressources sont épuisées, la croissance de chacune des populations s'arrête. Ce phénomène, nommé l'effet Jameson, correspond à l'arrêt simultané de toute la croissance microbienne quand la population dominante atteint sa phase stationnaire. L'effet Jameson est

souvent observé dans les aliments, concernant la compétition microbienne entre des communautés endogènes ou ensemencées, et une communauté cible (pathogène ou d'altération) [362]. À titre exemple, une inhibition de *Listeria monocytogenes* par un biofilm naturel présent sur des étagères en bois utilisées lors de l'affinage d'un fromage à pâte molle a été mise en évidence par Guillier et coll. [407]. En effet, ces auteurs ont observé que la croissance de *L. monocytogenes* s'arrête aussitôt que le microbiote de ce biofilm entre en phase stationnaire.

Dans les produits alimentaires, les sources de carbone sont souvent présentes à de fortes concentrations, la compétition consiste donc en une consommation rapide de ces sources pour former de la biomasse [348]. La disponibilité en azote dans les produits laitiers est souvent limitante, l'azote du lait est présent en grande partie sous forme de caséines [348]. Les microorganismes sont donc en compétition pour les substrats azotés, c'est-à-dire les acides aminés et les petits peptides libres dans le lait et surtout ceux issus de la protéolyse des caséines [348]. En effet, la croissance des microorganismes dans le lait dépend largement de leurs capacités à utiliser des acides aminés [408, 409]. Ainsi, les microorganismes capables de produire des protéases, des peptidases et/ou ayant des systèmes de transport efficaces pour la captation des acides aminés possèdent un avantage sélectif dans les produits laitiers [348]. Mansour et coll. [410] ont observé une forte diminution de la croissance de la levure *Yarrowia lipolytica* en présence de la bactérie *Staphylococcus xylosus*, ce qui pourrait être dû à une compétition entre ces microorganismes pour certains acides aminés tels que le glutamate. Cette hypothèse est suggérée du fait de la sous-expression de gènes impliqués dans le catabolisme des acides aminés chez *Y. lipolytica* en présence de *S. xylosus* [410]. En plus, il a été démontré que *Y. lipolytica* utilise préférentiellement les acides aminés comme source d'énergie par rapport au lactate [267]. La compétition pour des micronutriments, notamment le fer, joue également un rôle important dans des interactions entre microorganismes au sein des communautés microbiennes fromagères et laitières (Partie II-A-4).

2. Les approches d'étude des communautés microbiennes des fromages

a. Étude de la diversité microbienne

Approches culture-dépendantes

Avant l'émergence de la biologie moléculaire, l'étude de la diversité des communautés microbiennes des fromages s'appuyait uniquement sur des approches culture-dépendantes qui consistent à isoler des microorganismes sur des milieux synthétiques puis les identifier en se basant sur des caractères phénotypiques telles que la morphologie, les caractéristiques biochimiques ou physiologiques. L'isolement des microorganismes constitue l'étape clé des approches cultures-dépendantes : il nécessite un bon choix de milieux et conditions de culture afin d'obtenir une diversité microbienne au plus proche de la réalité. Il est généralement accepté que la plupart des microorganismes du fromage sont cultivables [411]. Le développement des techniques génotypiques telles que le séquençage des gènes codant pour l'ARN 16S (chez les procaryotes) et 18S (chez les eucaryotes) a permis une meilleure discrimination des souches par rapport à des tests phénotypiques. Ainsi, des inventaires relativement complets sur des communautés microbiennes de plusieurs fromages ont été faits en utilisant des méthodes d'isolement classiques et des techniques moléculaires d'identification [28, 38, 314, 412–414].

Les limites des approches culture-dépendantes souvent mentionnées sont : (i) elles sont longues et laborieuses ; (ii) elles sous-estiment la diversité réelle de l'écosystème du fait de l'incapacité de détecter des souches microbiennes non cultivables ou des cellules en état

viable mais non cultivable [314]. L'apparition des approches culture-indépendantes a remédié à ces limites.

Approches culture-indépendantes

Les progrès de la biologie moléculaire avec le développement de protocoles permettant d'extraire directement l'ADN ou l'ARN à partir de la matrice fromagère a donné naissance à des approches culture-indépendantes qui s'affranchissent des étapes d'isolement et de culture des microorganismes [415]. La Figure 19 présente un aperçu des principales techniques moléculaires utilisées pour évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes. Ces techniques peuvent être classées en deux grandes catégories : la première regroupe les techniques basées sur l'analyse des profils d'électrophorèse de l'ADN, alors que la deuxième implique le séquençage de l'ADN et l'analyse des séquences.

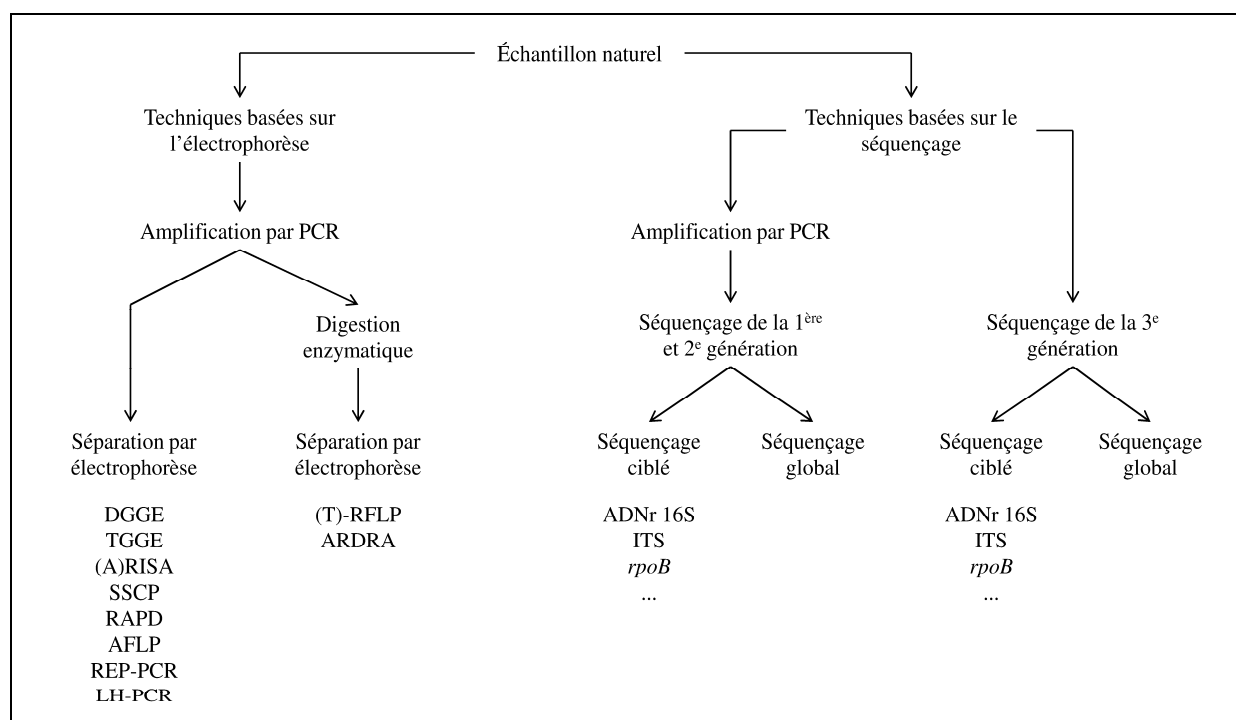


Figure 19. Approches moléculaires permettant d'évaluer la diversité génétique des communautés microbiennes.

PCR : Polymerase Chain Reaction ; DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ; TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis ; (A)RISA : (Automated) Ribosomal Intergenic Spacer Analysis ; SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism ; RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA ; AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism ; REP-PCR : Repetitive Element Sequence-based PCR ; LH-PCR : Length Heterogeneity PCR ; (T)-RFLP : (Terminal)-Restriction Fragment Length Polymorphism ; ARDRA : Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis ; ITS : Internal Transcribed Spacer.

Les techniques basées sur l'électrophorèse de l'ADN sont nombreuses mais leur principe reste le même : elles consistent à réaliser une migration électrophorétique différentielle de l'ADN sur gel d'agarose ou de polyacrylamide afin d'obtenir des empreintes génomiques des souches présentes dans l'échantillon. La plupart de ces techniques demandent une étape d'amplification par PCR des séquences d'intérêt. Chez les bactéries, les cibles d'amplification les plus utilisés sont les gènes codant pour les ARN ribosomiques (5S, 16S et 23S), en particulier l'ARN 16S. Ces gènes constituent des marqueurs de choix en phylogénie grâce à leur présence universelle, leur fonction constante et la présence de zones très conservées ainsi que de parties à séquences hypervariables [415]. Chez les fungi, l'analyse de

gènes ribosomaux limite leur identification au niveau du genre ou de la famille [415]. L'utilisation des régions ITS (Internal Transcribed Spacers en Anglais), c'est-à-dire les parties non codantes qui se trouvent entre les gènes codant pour l'ARN 18S et 26S (Figure 20), permet d'obtenir une meilleure résolution taxonomique des communautés fongiques [415]. Le Tableau 14 présente quelques exemples d'études utilisant des techniques basées sur l'électrophorèse de l'ADN pour examiner la diversité des communautés microbiennes dans les fromages.

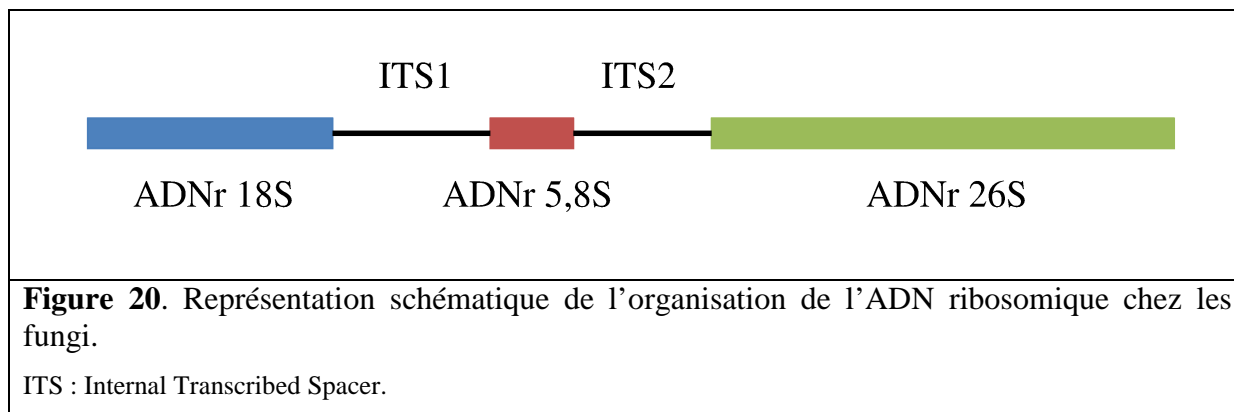


Tableau 14. Techniques basées sur l'électrophorèse de l'ADN pour l'investigation de la diversité microbienne dans les fromages (liste non exhaustive).

Technique	Fromage(s) étudié(s)	Séquence(s) ciblées	Ref.
DGGE	Karakačanski skakutanac (fromage frais artisanal croate)	Région V3 de l'ADNr 16S	[416]
	Fromages danois au lait cru	Région V3 de l'ADNr 16S	[417]
	Gouda (fromage néerlandais)	Région V3 de l'ADNr 16S	[418]
	Pecorino Crotonese (fromage italien)	Régions V3, V6-V8 de l'ADNr 16S	[419]
	Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin, Formaggio (fromages italiens)	Région V3 de l'ADNr 16S	[420]
	Castelmagno (fromage italien)	Région V3 de l'ADNr 16S	[421]
	Fromage à pâte persillée	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1 de l'ADNr 26S	[422]
	Fromage croate	Région V6-V8 de l'ADNr 16S	[423]
	Fontina (fromage italien)	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[413]
	Gorgonzola (fromage italien)	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[424]
	Calenzana (fromage corse)	Région V3 de l'ADNr 16S	[425]
	Casín (fromage espagnol)	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1 de l'ADNr 26S	[426]
	Feta (fromage grec)	Région V1 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[427]
	Parmigiano Reggiano (fromage italien)	Région V3 de l'ADNr 16S	[428]
	Robiola di Roccaverano (fromage italien)	Région V1 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[429]
Domiaty (fromage égyptien)	Région V3 de l'ADNr 16S	[430]	

Tableau 14. (suite)

Technique	Fromage(s) étudié(s)	Séquence(s) ciblées	Ref.
DGGE	Cabrales (fromage espagnol)	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1 de l'ADNr 26S	[431]
	Beaufort, Comté, Saint-Nectaire	Région V3 de l'ADNr 16S	[432]
	Stilton (fromage anglais)	Régions V3, V4-V5 de l'ADNr 16S	[414]
	Ragusano (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S Région V6-V8 de l'ADNr 16S	[433]
TGGE	Quesaiilla Arochena, Torta Arochena (fromage espagnol)	Région V3 de l'ADNr 16S <i>rpoB</i>	[434]
	Cueva de la Magahá (fromage espagnol)	Région V3 de l'ADNr 16S	[435]
	Calenzana (fromage corse)	Région V3 de l'ADNr 16S	[425]
	Domiaty (fromage égyptien)	Région V3 de l'ADNr 16S	[430]
	Langres, Epoisses, Morbier, Beaufort, Comté, Saint-Nectaire	Région V3 de l'ADNr 16S	[432]
	Emmental	Région V3 de l'ADNr 16S	[436]
	Emmental	Région V5-V6 de l'ADNr 16S	[437]
Grana Padano (fromage italien)	Région V3 de l'ADNr 16S	[438]	
SSCP	Livarot	Région V3 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[38]
	Saint-Nectaire (technologique)	Région V2 de l'ADNr 16S	[439]
	Saint-Nectaire (artisanal)	Région V3 de l'ADNr 16S	[440]
	Salers	Région V4 de l'ADNr 18S	[441]
	Salers	Région V3 de l'ADNr 16S	[442]
	Fromage français à pâte molle	Région V3 de l'ADNr 16S	[314]
T-RFLP	Camembert	Région V1-V4 de l'ADNr 18S	[443]
	Tilsit	ADNr 16S	[444]
LH-PCR	Parmigiano-Reggiano (fromage italien)	Régions V1, V2, V3 de l'ADNr 16S	[445]
	Quesaiilla Arochena, Torta Arochena (fromage espagnol)	Région intergénique 16S-23S	[434]
	Grana Padano (fromage italien)	Régions V1, V2 de l'ADNr 16S	[446]
ARISA	Camembert	Région ITS1-5,8S-ITS2	[443]
	Cheddar	Région intergénique 16S-23S	[447]

Les techniques basées sur le séquençage de l'ADN constituent une approche dite métagénomique, qui se rapporte à l'étude des génomes de l'ensemble des organismes présents dans une niche écologique donnée (à l'inverse de la génomique qui recourt au séquençage d'un génome unique) [448]. Il existe deux grandes stratégies de séquençage en métagénomique : (i) le séquençage ciblé, qui séquence uniquement des marqueurs phylogénétiques tels que l'ADNr 16S ; (ii) le séquençage aléatoire ou global, qui consiste à séquencer le contenu global des génomes présents dans l'échantillon. Lors d'un séquençage global, les ADN sont d'abord fragmentés de manière aléatoire en courts fragments avant d'être séquencés, d'où son nom en Anglais de Shotgun sequencing, ou WGS sequencing pour Whole Genome Shotgun sequencing. Le séquençage ciblé, qui est plus simple, est plus spécifique et plus sensible que le séquençage global pour l'étude de la diversité microbienne

[449]. Le séquençage global, quant à lui, permet de mettre en évidence le contenu en gènes des communautés microbiennes et donc de déterminer leurs capacités fonctionnelles [449]. L'émergence de nouvelles technologies de séquençages (NGS en Anglais : Next-Generation Sequencing, pour faire distinction avec la technologie de la première génération qui se base sur la technique de Sanger) à haut débit (HTS en Anglais : High-Throughput Sequencing) (Tableau 15) et le développement de la bioinformatique ont contribué de façon décisive à l'avènement de la métagénomique. L'utilisation de la métagénomique a permis des avancées considérables dans la caractérisation de la diversité microbienne de différents fromages, donnant également l'accès à des populations sous-dominantes [32, 450, 451]. Le Tableau 16 donne quelques exemples d'études métagénomiques de fromage.

Tableau 15. Caractéristiques des technologies de séquençage (Adapté de Glenn [452]).

Technologie de séquençage	Plateforme	Instruments	Méthode d'amplification	Méthode de séquençage	Nomination	Applications
1 ^{ère} génération	3730	3730xl	PCR	Sanger	Représentatif de la technologie de 1 ^{ère} génération	
2 ^e génération	454	GS Junior Titanium, FLX Titanium FLX+	PCR en émulsion	Synthèse (pyroséquençage)	1 ^{er} séquenceur de la nouvelle génération, longs reads générés	a, b, c, d, g, h
	Illumina	MiSeq GA IIx HiSeq 1000, 2000, 2500...	PCR en pont	Synthèse	1 ^{er} séquenceur à courts reads, leader actuel	a, b, c, d, e, f, g, h
	SOLiD	SOLiD 4 SOLiD 5500 SOLiD 5500xl	PCR en émulsion	Ligation	2 ^e séquenceur à courts reads, faible taux d'erreurs	c, e, f, h
	Ion Torrent	Ion PGM, puce 314 Ion PGM, puce 316 Ion PGM, puce 318	PCR en émulsion	Synthèse (détection de H ⁺)	1 ^{er} séquenceur sans système de détection optique 1 ^{er} séquenceur dont le coût < 100.000 \$	a, b, c, d, h
3 ^e génération	HeliScope	Helicos	Aucune	Synthèse	1 ^{er} séquenceur d'une molécule unique	e, h
	PacBio	PacBio RS	Aucune	Synthèse	1 ^{er} séquenceur en temps réel d'une molécule unique	a, b, c, g, h
	Starlight	Starlight	Aucune	Synthèse	Séquençage d'une molécule unique avec des points quantiques	a, b, g, h
	Oxford Nanopore Technologies	MinION GridION PromethION	Aucune	Détection <i>via</i> le passage de molécules uniques au travers de pores à l'échelle nanométrique	Séquenceur en temps réel d'une molécule unique ; portabilité (MinION) permettant des séquençages "sur le terrain"	a, b, c, d, e, f, g, h

a : séquençage *de novo* de génomes microbiens

b : caractérisation du transcriptome

c : reséquençage ciblé

d : séquençage *de novo* de génomes végétaux et animaux

e : reséquençage et comptage de transcrits

f : détection de mutation

g : métagénomique

h : autres applications (ChIP-Seq, MeDIP-Seq, RNA-seq...)

Tableau 16. Études métagénomiques des écosystèmes fromagers (liste non exhaustive).

Stratégie	Fromage(s) étudié(s)	Séquence(s) ciblées	Ref.
Séquençage ciblé	Fromages danois au lait cru	Région V3-V4 de l'ADNr 16S	[417]
	Mozzarella (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[453]
	Fromage américain (type latin)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[454]
	Oscypek (fromage polonais)	Région V5-V6 de l'ADNr 16S	[455]
	Fromages artisanaux irlandais	Région V4 de l'ADNr 16S	[450]
	Fromages artisanaux américains	Région V4 de l'ADNr 16S Région ITS1	[451]
	Fromages croates au lait cru	Région V6-V9 de l'ADNr 16S	[456]
	Mozzarella, Grana Padano Parmigiano Reggiano (fromages italiens)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[457]
	Canestrato Pugliese (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[458]
	Caciocavallo Pugliese (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[459]
	Fontina (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[460]
	Fromages européens (87 variétés) et américains (50 variétés)	Région V4 de l'ADNr 16S Région ITS1	[32]
	Pico (fromage portugais)	Région V3-V4 de l'ADNr 16S	[461]
	Porro (fromage mexicain)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[462]
	Herve (fromage belge)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[463]
	Fromages italiens (matériels et environnement de fabrication)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S Région D1-D2 de l'ADNr 26S	[464]
	Fromage de type continental	Région V4 de l'ADNr 16S	[465]
	Mozzarella (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[466]
	Grana (fromage italien)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[467]
	Caciotta, Caciocavallo Pugliese (fromages italiens)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[468]
Fiore Sardo, Pecorino Siciliano, Pecorino Toscano (fromages italiens)	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[469]	
Fromages français (12 variétés)	Région V3-V4 de l'ADNr 16S Région ITS2	[470]	
Silter (fromage italien)	Région V3-V4 de l'ADNr 16S	[471]	
Tomme d'Orchies	Région V1-V3 de l'ADNr 16S	[472]	
Séquençage global	Fromages européens (87 variétés) et américains (50 variétés)	-	[32]
	Fromage à pâte molle et fromage bleu	-	[411]
	Fromage à pâte molle (fromage modèle)	-	[234]
	Maasdam (fromage néerlandais)	-	[473]
	Cheddar	-	[474]
	Cotija (fromage mexicain)	-	[475]

Les approches culture-indépendantes, notamment la métagénomique présentent des avantages déterminants par rapport aux approches culture-dépendantes en terme d'accessibilité à l'ensemble de la diversité microbienne et de suivi dynamique des populations [415]. Pourtant, les approches culture-dépendantes, malgré leurs limites, restent toujours

importantes pour des études en écologie microbienne, par exemple dans la mise en collection des souches d'intérêt technologique. De plus, dans certains cas des approches culture-indépendantes ne parviennent pas à identifier des espèces détectées par des approches culture-dépendantes, ce qui pourrait être dû à des biais techniques de l'extraction de l'ADN, de PCR ou de séquençage [415, 476]. Il est donc indispensable de combiner ces deux types d'approche pour une meilleure compréhension de la diversité des communautés microbiennes fromagères [415].

b. Étude fonctionnelle

Si l'étude de la diversité microbienne donne des informations sur la composition (ce qui est présent) et la structure (comment sont organisés les éléments présents les uns par rapport aux autres) des communautés microbiennes, l'étude fonctionnelle permet d'accéder à leur fonctionnement. La Figure 21 présente le schéma central de la biologie moléculaire qui décrit le mécanisme d'expression des gènes. Deux niveaux de réponse cellulaire y sont figurés : (i) le passage de la molécule d'ADN à la molécule d'ARN, appelé la transcription, donne des réponses au niveau du transcriptome ; (ii) le passage de la molécule d'ARN à la protéine, appelé la traduction, donne des réponses au niveau du protéome. Le transcriptome et le protéome désignent respectivement l'ensemble des molécules d'ARN (transcrit) et de protéine présentes dans la cellule dans des conditions données, à un moment donné. Ici nous nous intéressons exclusivement aux analyses transcriptomiques.

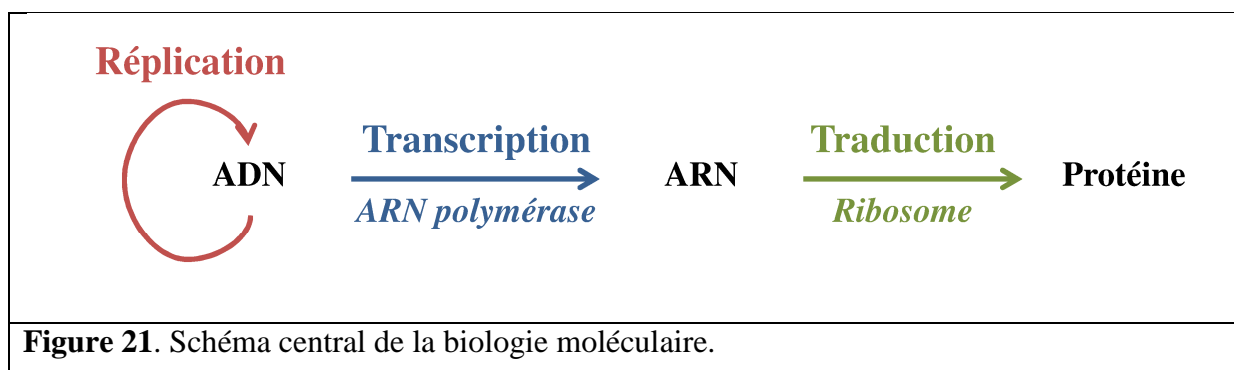


Figure 21. Schéma central de la biologie moléculaire.

L'étude des transcriptomes constitue un champ important de la biologie moderne, vu le rôle central des ARNs dans la régulation des processus biologiques. Les questions biologiques impliquant des analyses transcriptomiques sont diverses et peuvent être classées en deux catégories : celles associées à des aspects d'annotation et celles qui traitent des aspects quantitatifs [477]. L'analyse d'expression différentielle est considérée comme l'application la plus courante de l'investigation du transcriptome [478]. Ce type d'analyse consiste à comparer le niveau d'expression des gènes, représenté par la quantité de transcrits, entre deux conditions afin d'identifier des gènes exprimés de façon différentielle qui pourraient constituer des biomarqueurs pertinents pour le suivi des processus d'intérêt.

Les expériences de quantification des transcrits suivent en général un schéma commun qui comporte des étapes de (i) l'extraction de l'ARN ; (ii) la transcription inverse de l'ARN en un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à l'aide des enzymes spécifiques appelées transcriptases inverses (RT en Anglais : Reverse Transcriptase) et éventuellement l'amplification par PCR de l'ADNc et (iii) la mesure de la quantité d'ADNc. Pour effectuer cette dernière étape, plusieurs méthodes existent :

- Des approches dites "gène à gène" qui permettent d'étudier l'expression des gènes ciblés à l'aide des amorces spécifiques. Il s'agit notamment de la technique de RT-PCR quantitative.
- Des approches basées sur l'hybridation ADNc-ADN, par exemple la technique de puces à ADN.
- Des approches basées sur le séquençage, telles que la technique de RNA-seq.

RT-PCR quantitative

La technique de RT-PCR quantitative (RT-qPCR en Anglais : Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans l'échantillon. Comme l'indique son nom, elle implique l'utilisation de deux techniques successivement : une transcription inverse suivie d'une PCR quantitative, ou PCR en temps réel. Cette dernière étape se base sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent dont l'émission est proportionnelle à la quantité de produits de PCR générés. Il peut s'agir d'une sonde fluorescente spécifique du fragment à amplifier (par exemple sondes TaqMan, FRET) ou d'un agent fluorescent intercalant de l'ADN (par exemple le SYBR Green). Le niveau d'expression d'un gène peut être mesuré de façon absolue, en établissant une courbe de calibration, ou de façon relative, en comparant l'expression du gène cible avec celle d'un gène de référence exprimé de manière constitutive [479].

Plusieurs études ont montré l'intérêt de la RT-PCR quantitative dans l'investigation et le suivi du fonctionnement des communautés microbiennes des fromages, notamment dans l'expression des fonctions bénéfiques (par exemple la production de bactériocines, l'adaptation au stress) ou néfastes (par exemple la présence de toxines, la production d'amines biogènes) [480–489]. Cette technique est très précise, sensible et reproductible mais nécessite des connaissances *a priori* sur les gènes étudiés (séquences, fonctions) [479]. La RT-PCR quantitative est souvent utilisée pour valider des hypothèses issues de l'analyse des données haut débit telles que celles des puces à ADN ou du RNA-seq.

Puce à ADN

Les puces à ADN, aussi appelées puces à gènes, biopuces (en Anglais Microarrays, DNA arrays, DNA chips, Biochips, GeneChips), ont été développées au cours des années 1990s et étaient l'outil standard pour l'analyse globale de l'expression des gènes avant l'avènement du RNA-seq [490, 491]. Il s'agit d'une petite surface de quelques centimètres carrés (puce) sur laquelle sont fixés des fragments synthétiques d'ADN (sondes) représentatifs de chacun des gènes étudiés. Elle permet, *via* l'hybridation des sondes avec les ADNc (cibles) issus de la transcription inverse des ARNs, de quantifier le niveau d'expression des gènes. En effet, les ADNc sont préalablement marqués par des marqueurs fluorescents (par exemple Cy3 et Cy5) ou radioactifs (par exemple ³³P). La quantification relative de l'expression des gènes entre les différentes conditions biologiques est réalisée par la comparaison de l'intensité des signaux de fluorescence ou de radioactivité émis lors de l'étape d'hybridation.

La technique de puces à ADN permet une analyse globale du transcriptome en mesurant simultanément l'expression de plusieurs milliers de gènes [490]. Le séquençage des génomes de microorganismes du fromage a permis la conception des puces à ADN pour explorer leurs propriétés fonctionnelles ainsi élucider des mécanismes moléculaires sous-jacents de leur comportement dans les écosystèmes fromagers [179, 182, 239, 487, 492–495]. La principale limite de la technique de puces à ADN vient du fait qu'elle demande des

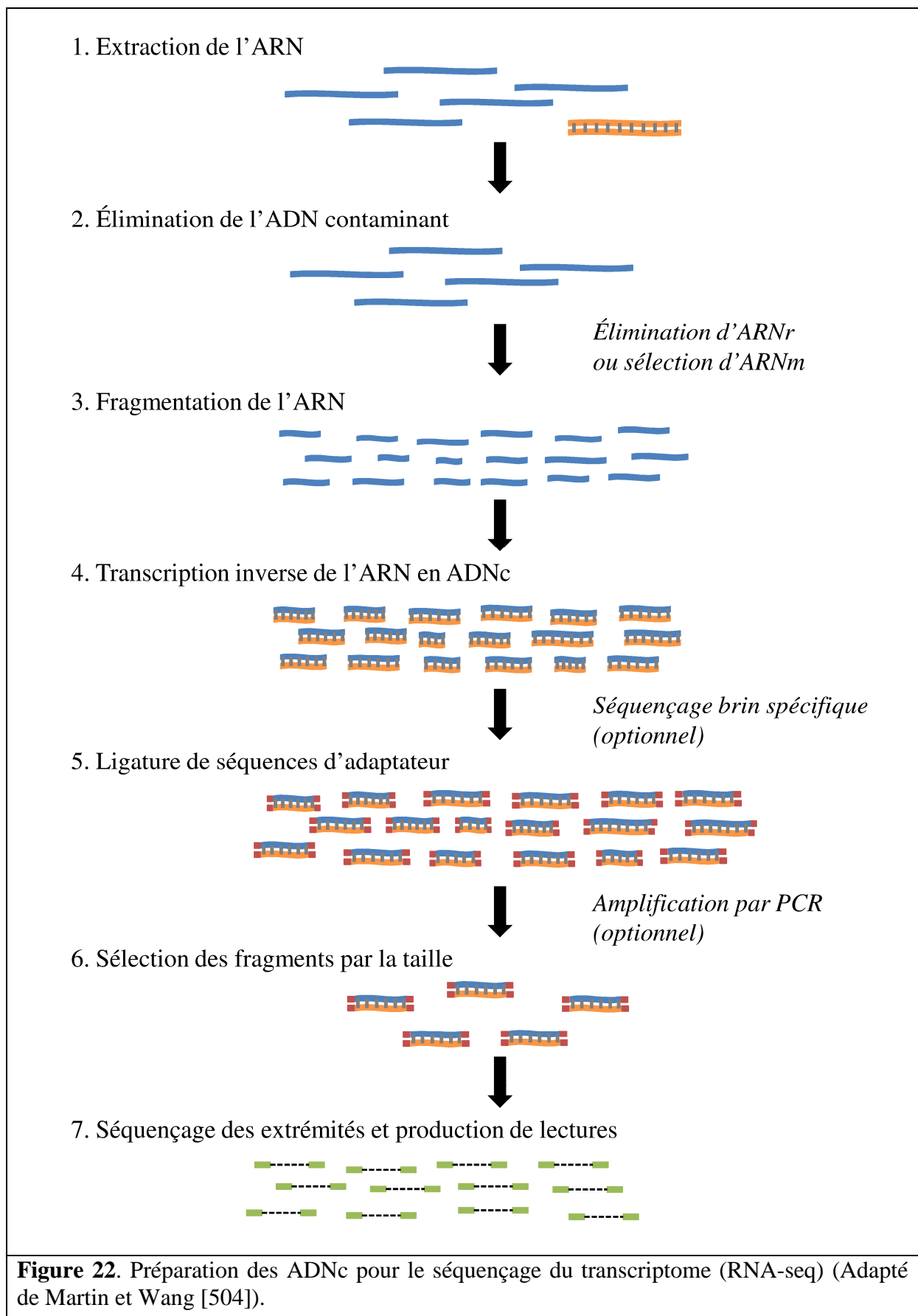
connaissances *a priori* sur les séquences des gènes à étudier. Son application est donc principalement limitée à des espèces modèles dont le génome est connu.

RNA-seq

La technique de RNA-seq (séquençage de l'ARN, en Anglais RNA sequencing), également appelée séquençage aléatoire du transcriptome entier (en Anglais Whole transcriptome shotgun sequencing), est une approche relativement récente qui utilise le séquençage à haut débit pour identifier et quantifier l'ARN présent dans l'échantillon [491]. L'ARN est préalablement rétro-transcrit en ADNc pour le séquençage. Les étapes de préparation des ADNc lors d'une expérience de RNA-seq sont résumées dans la Figure 22. Une fois l'ADNc synthétisé, celui-ci est séquençé selon les mêmes principes que l'ADN par les technologies de séquençage à haut débit (Tableau 15). D'autre part, le séquençage direct d'ARN sans passer par l'étape de transcription inverse est en cours de développement et sera bientôt envisageable grâce à des technologies de séquençage de 3^e génération [496]. En absence de génome (ou transcriptome) de référence, des lectures (*reads*) générées doivent d'abord être assemblées pour reconstruire des transcrits, il s'agit donc un assemblage *de novo* du transcriptome. Si le génome (ou transcriptome) de référence est déjà disponible, des lectures peuvent être alignées sur celui-ci à l'aide des outils de *mapping*. La quantification des transcrits se fait *via* un comptage du nombre de lectures alignées à chaque transcrit. En effet, il est considéré que la quantité de lectures issues du séquençage profond de chacun des ADNc est proportionnelle à la quantité du transcrit correspondant dans l'échantillon initial. Ainsi, l'abondance de chaque transcrit peut être comparée dans les différents échantillons.

Le RNA-seq représente de nombreux avantages par rapport aux puces à ADN pour des études transcriptomiques, en terme d'annotation ainsi qu'en terme de quantification [491]. Concernant les études d'expression différentielle, le RNA-seq permet, contrairement aux puces à ADN, d'avoir accès aux séquences, permettant ainsi une approche sans *a priori*. Il permet également une gamme de mesure d'expression largement plus vaste que celle des puces à ADN, cette dernière est relativement limitée à cause de la saturation du signal et du bruit de fond [497]. En théorie, le comptage numérique des lectures du RNA-seq est uniquement limité par la profondeur du séquençage [491]. Il a aussi été démontré que le RNA-seq est considérablement plus sensible pour la détection de transcrits rares [498, 499].

Des premières études RNA-seq des communautés microbiennes des fromages ont été menées, permettant d'appréhender différents mécanismes moléculaires sous-tendant leur fonctionnement [234, 249, 341, 473, 500–502]. Une approche issue du RNA-seq, appelée RNA-seq en double (dual RNA-seq en Anglais), dans laquelle le transcriptome de deux espèces en interaction est séquençé et analysé en même temps, s'est montrée très prometteuse pour étudier directement des interactions interspécifiques au niveau moléculaire [503]. Cette approche a été jusqu'à présent principalement utilisée pour étudier des interactions hôte-pathogène [503].



CHAPITRE II

RÉSULTATS

CHAPITRE II-RÉSULTATS

I. Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium*

A. Résumé

Les bactéries du genre *Brevibacterium*, communément appelées "ferment du rouge", sont largement utilisées comme agent d'affinage pour les fromages à croûte lavée, où elles participent à la protéolyse et la lipolyse, et produisent des pigments rouges-oranges ainsi que des composés soufrés volatils qui sont à l'origine des odeurs typiques de ces fromages. Cependant, des études ont montré que ces bactéries avaient parfois des difficultés à s'implanter à la surface des fromages, celle-ci étant alors principalement colonisée par des bactéries adventices [28, 50, 204–206]. L'objectif de ce travail était d'explorer le répertoire de gènes impliqués dans la capacité de croître à la surface du fromage chez différentes souches de *Brevibacterium* afin de mieux connaître les phénomènes d'adaptation de ce genre bactérien à l'environnement fromager. Pour cela, nous avons séquencé le génome de 13 souches de *Brevibacterium* d'origine alimentaire, dont 11 isolées de fromages, et réalisé des analyses génomiques comparatives sur ces 13 génomes ainsi que sur 10 autres génomes de souches de *Brevibacterium* isolées d'autres habitats et disponibles dans les bases de données publiques.

L'analyse phylogénomique des 23 souches étudiées, dont 12 sont issues de fromages, a confirmé que les souches fromagères de *Brevibacterium* ne forment pas un groupe monophylétique, suggérant des adaptations indépendantes au milieu fromager. Ensuite, la génomique comparative a été réalisée sur quatre grands groupes de gènes importants pour la croissance à la surface du fromage : (i) les gènes impliqués dans la capacité d'utiliser des substrats énergétiques présents dans le fromage, (ii) ceux impliqués dans la tolérance au sel, (iii) ceux impliqués dans l'acquisition du fer et (iv) ceux impliqués dans la biosynthèse de bactériocines. Quasiment tous les génomes étudiés comportent des gènes impliqués dans le catabolisme de l'éthanol, du 4-aminobutyrate (GABA) et du glycérol. La capacité de cataboliser le galactose, le lactate et les acides aminés chez *Brevibacterium* est corrélée à la position phylogénétique des souches, qu'elles soient isolées de fromage ou d'autres habitats. Des gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate sont présents chez une partie des souches, mais leurs occurrences ne sont corrélées ni à la phylogénie ni à l'habitat des souches. La plupart des génomes contiennent un groupe de deux gènes codant pour deux protéases extracellulaires, dont une a été caractérisée pour son activité protéolytique sur les caséines [112–114]. Un gène codant pour une triacylglycérol lipase extracellulaire est présent chez 15 souches, y compris chez 11 des 12 souches fromagères. Des gènes impliqués dans la biosynthèse des osmoprotecteurs tels que l'ectoïne, la glycine bêtaïne et le tréhalose sont présents chez la majorité des souches. Les 23 souches analysées présentent beaucoup de différences de nombre de composants d'ABC transporteurs de complexes fer-sidérophores, dont une partie se trouve sur des îlots génomiques correspondant à des transferts de gènes entre des souches fromagères de *Brevibacterium* et des bactéries d'affinage appartenant à d'autres genres. Des gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores de type hydroxamate sont présents chez la plupart des souches, alors que ceux liés à la biosynthèse de sidérophores de type catécholate sont présents uniquement chez deux souches fromagères et correspondent à des transferts horizontaux de gènes. La plupart des génomes codent pour des gènes de biosynthèse de bactériocines, dont une partie est associée à des transferts de gènes.

L'une de ces bactériocines est codée par un transposon conjugatif d'environ 96 kb qui n'est présent que chez des souches de *Brevibacterium* d'origine fromagère, mais aussi chez une souche fromagère du genre *Corynebacterium*.

En conclusion, la génomique comparative de 23 souches de *Brevibacterium* a révélé des différences de déterminants génétiques impliqués dans la capacité à croître à la surface du fromage. Certains d'entre eux correspondent à des transferts de gènes, notamment pour les gènes liés à l'acquisition du fer et la biosynthèse de bactériocines. Ceci souligne le rôle important des transferts génétiques dans l'adaptation des communautés microbiennes au milieu fromager.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication parue en 2017 dans la revue BMC Genomics, et constituant la partie I.B.

B. Publication

Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat

Nguyen-Phuong Pham¹, Séverine Layec¹, Eric Dugat-Bony¹, Marie Vidal², Françoise Irlinger¹, Christophe Monnet^{1,*}

¹UMR GMPA, AgroParisTech, INRA, Université Paris-Saclay, 78850, Thiverval-Grignon, France

²US 1426, GeT-PlaGe, Genotoul, INRA, 31326, Castanet-Tolosan, France

*correspondence: christophe.monnet@inra.fr

Abstract

Background: *Brevibacterium* strains are widely used for the manufacturing of surface-ripened cheeses, contributing to the breakdown of lipids and proteins and producing volatile sulfur compounds and red-orange pigments. The objective of the present study was to perform comparative genomic analyses in order to better understand the mechanisms involved in their ability to grow on the cheese surface and the differences between the strains.

Results: The genomes of 23 *Brevibacterium* strains, including twelve strains isolated from cheeses, were compared for their gene repertoire involved in salt tolerance, iron acquisition, bacteriocin production and the ability to use the energy compounds present in cheeses. All or almost all the genomes encode the enzymes involved in ethanol, acetate, lactate, 4-aminobutyrate and glycerol catabolism, and in the synthesis of the osmoprotectants ectoine, glycine-betaine and trehalose. Most of the genomes contain two contiguous genes encoding extracellular proteases, one of which was previously characterized for its activity on caseins. Genes encoding a secreted triacylglycerol lipase or involved in the catabolism of galactose and D-galactonate or in the synthesis of a hydroxamate-type siderophore are present in part of the genomes. Numerous Fe³⁺/siderophore ABC transport components are present, part of them resulting from horizontal gene transfers. Two cheese-associated strains have also acquired catecholate-type siderophore biosynthesis gene clusters by horizontal gene transfer. Predicted bacteriocin biosynthesis genes are present in most of the strains, and one of the corresponding gene clusters is located in a probable conjugative transposon that was only found in cheese-associated strains.

Conclusions: *Brevibacterium* strains show differences in their gene repertoire potentially involved in the ability to grow on the cheese surface. Part of these differences can be explained by different phylogenetic positions or by horizontal gene transfer events. Some of the distinguishing features concern biotic interactions with other strains such as the secretion of proteases and triacylglycerol lipases, and competition for iron or bacteriocin production. In the future, it would be interesting to take the properties deduced from genomic analyses into account in order to improve the screening and selection of *Brevibacterium* strains, and their association with other ripening culture components.

Keywords: *Brevibacterium*, Horizontal gene transfer, Comparative genomics, Cheese rind, Cheese ripening, Iron acquisition, Bacteriocin, Lanthipeptide, Lantibiotic, BreLI

Background

Microbial communities from rinds of surface-ripened cheeses are composed of various bacteria, yeasts and molds, which contribute to the flavor, texture and appearance of the final products. These microorganisms may come from the milk, the ripening environment or from ripening cultures that are widely used in the cheese industry. The function of the ripening cultures is to provide specific organoleptic properties, to ensure a better regularity of manufacturing, and to outcompete pathogens or spoilage microorganisms [1]. However, strains from ripening cultures frequently do not establish themselves in cheeses [2]. Even if they are massively inoculated, these strains are sometimes outcompeted by the resident "house flora" due to insufficient fitness in the cheese surface habitat. The ability to grow on the cheese surface depends on various properties such as efficient salt tolerance and iron acquisition systems, or on the ability to use the energy compounds present in the cheese [3]. In addition, growth is influenced by the other microorganisms present at the cheese surface, with which they may have positive or negative interactions.

One example of a ripening culture component that may have problematic growth in cheeses is *Brevibacterium* [4–9]. This microorganism contributes to the breakdown of lipids and proteins, and produces volatile sulfur compounds that are key aroma impact compounds, as well as red-orange pigments [10–12]. For a long time, *Brevibacterium linens* was considered to be the major *Brevibacterium* species in cheeses. In 2004, it was broken down into three species: *B. linens*, *B. antiquum* and *B. aurantiacum* [13]. These three species, together with *B. casei* and other not-yet described *Brevibacterium* species, have been isolated from cheeses [14].

In order to improve the strategies for selecting *Brevibacterium* strains for ripening cultures, it is important to better understand the mechanisms involved in their ability to grow on the cheese surface. This can be investigated by genomic analyses. For example, the study of the genomes of the cheese strains *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 (formerly *Arthrobacter arilaitensis* Re117) and *Corynebacterium variabile* DSM 44702 revealed several metabolic capabilities that were considered to play roles in growth on cheese [15,16]. In addition, a recent study provided evidence of extensive horizontal gene transfer (HGT) in cheese-associated bacteria, including *Brevibacterium* strains, for which genes involved in iron acquisition were particularly abundant in the transferred islands [17].

The aim of the present study was to investigate, in *Brevibacterium* strains, key genetic determinants known to be important for growth in cheese: the catabolism of energy compounds present in cheeses, iron acquisition, salt tolerance and bacteriocin production. For that purpose, we sequenced the genome of 13 *Brevibacterium* strains, including eleven strains isolated from cheeses. We performed comparative analyses of these genomes and of ten other *Brevibacterium* genomes from strains isolated from diverse environments and already present in the Integrated Microbial Genomes (IMG) database [18].

Methods

Growth conditions and DNA extraction

The *Brevibacterium* strains were grown under aerobic conditions (rotary shaker at 150 rpm) for three days at 25°C in 50-ml conical flasks containing 10 ml of brain heart infusion broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Bacterial cells were recovered by centrifugation at 4,500 x g for 10 min from 5 ml of culture, washed once with 5 ml of TE

buffer (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) and resuspended in 500 μ l of the same buffer. Seventy-five μ l of lysis solution containing lysozyme (40 mg/ml) and lyticase (1333 U/ml) were added and the suspensions were incubated for 30 min at 37°C. After addition of 60 μ l of 0.5 M EDTA pH 8.0, 20 μ l of proteinase K (20 mg/ml) and 100 μ l of 20% SDS, the samples were incubated for 1 h at 55°C and subsequently transferred to 2-ml bead-beating tubes containing 100 mg of 0.1 mm-diameter zirconium beads and 100 mg of 0.5 mm-diameter zirconium beads. After cooling on ice, 500 μ l of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; saturated with 10 mM Tris, pH 8.0, and 1 mM EDTA) were added and the tubes were shaken in a bead beater (FastPrep-24, MP Biomedicals, Illkirch, France) using two 45-s mixing sequences at a speed of 6.0 m/s. The tubes were cooled on ice for 5 min after each mixing. The content of the tubes was transferred to Phase Lock Gel Heavy tubes (5 PRIME, Hilden, Germany), which were then centrifuged at 18,500 \times g for 30 min at 20°C. The aqueous phases were subsequently transferred to new Phase Lock Gel tubes. After adding 500 μ l of phenol-chloroform-isoamyl alcohol and gentle mixing, centrifugation was performed at 18,500 \times g for 20 min at 20°C. Five hundred μ l of chloroform were then added to the aqueous phase, and the tubes were centrifuged at 18,500 \times g for 20 min at 20°C after gently mixing. The aqueous phases (approximately 200 μ l) were recovered, mixed with 1 μ l of RNase A (20 mg/ml), and incubated for 30 min at 37°C. DNA was then precipitated by adding 200 μ l of cold isopropanol and the tubes were incubated for 10 min at 4°C. The DNA was recovered by centrifugation for 15 min at 18,500 \times g and 4°C, and the pellets were subsequently washed two times with 500 μ l of 70% (vol/vol) ethanol. The pellets were then dried for 15 min at 42°C and dissolved in 100 μ l of water. Finally, DNA cleanup was performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. DNA yield and purity (absorbance ratio at 260/280 nm) were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France). DNA integrity was verified by electrophoresis in a 1% agarose gel (Qbiogene, Illkirch, France) in 1X TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.3) stained with SYBR® Safe 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Genome sequencing, assembly and annotation

Libraries were generated using the TruSeq DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out on an Illumina MiSeq apparatus at the INRA GeT-PlaGE platform (<http://get.genotoul.fr>) in order to generate paired-end reads (250 bases in length). For each strain, the paired-end reads were merged using FLASH [19]. De novo assembly was performed using SPAdes version 3.1.1 [20]. Only contigs with length >1000 bp were considered for further study. Gene predictions and annotations were performed automatically using the Integrated Microbial Genomes (IMG) database and comparative analysis system [21], as described in the corresponding standard operating procedure [22]. PHASTER [23] was used to predict prophages. Sequences involved in the production of secondary metabolites and bacteriocins were searched using antiSMASH 3.0 [24], BAGEL3 [25] and BACTIBASE [26].

Comparative genomic analysis and phylogenetic classification

Comparative genomic analyses were performed considering the 13 genomes sequenced in the present study as well as the ten other *Brevibacterium* genomes present in the IMG database in September 2016 (Table 1). A phylogenetic analysis was performed for the

23 *Brevibacterium* genomes using the sequences of 40 marker genes, as described by Mende et al. [27]. The genomes of *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 [16] (Project accession number PRJEA50353) and *Corynebacterium casei* LMG S-19264 [28] (Project accession number PRJNA186910) were used as outgroups. An in-house database of the 40 marker genes present in 388 bacterial strains, which included 117 strains isolated from dairy products [29], was used to detect the 40 marker genes in the *Brevibacterium* genomes using tBlastN [30]. The best hits were selected with at least 60% sequence identity and 80% coverage. Each marker gene was translated into an amino acid sequence using T-Coffee [31] and aligned using MUSCLE [32]. The 40 individual alignments were then concatenated to a single one, which was used to build the tree using FastTree 2 [33] with the following parameters: –gamma –pseudo –mlacc 3 –slownni and the default bootstrap procedure (1,000 resamples). The tree was visualized and annotated using MEGA7 [34].

Homologous gene families were computed using the OrthoMCL procedure implemented in GET-HOMOLOGUES software [35]. Amino acid sequences of the CDSs from the 23 *Brevibacterium* genomes were grouped into clusters using 75% identity and 75% coverage thresholds with a BlastP cutoff E value < 1e-05. The inflation index of OrthoMCL algorithm was set to 1.5, as recommended by Li et al. [36]. Strain ATCC 9175^T was set as the first reference genome, the subsequent ones were randomly chosen by GET-HOMOLOGUES. Functional category assignment to each cluster was done according to the Clusters of Orthologous Groups (COG) database [37]. The Average Nucleotide Identity (ANI), implemented in GET-HOMOLOGUES software, was computed on homologous genes for all possible pairs of genomes.

Results

General genomic features

Assembly and annotation metrics for the 13 newly sequenced *Brevibacterium* genomes and those concerning the ten additional genomes (which included one cheese isolate) for the comparative analysis are detailed in Additional file 1. *Brevibacterium* genomes show considerable size heterogeneity, ranging from about 2.3 to 4.5 Mbp. There is no clear relationship between genome size and the habitat from which the strains were isolated. However, genome size is quite similar among the 12 cheese isolates, 4 Mbp on average (min: 3.7; max: 4.5), and these genomes harbor an average of 3,712 genes (min: 3,395; max: 4,154). The two smallest genomes corresponded to human-associated strains: *B. ravensturnense* 5401308^T and *B. mcbrellneri* ATCC 49030^T (2.3 and 2.6 Mbp, respectively). The G+C content varied from 58.0% (*B. mcbrellneri* ATCC49030^T) to 70.9% (*B. album* DSM 18261^T), and was between 62 and 65% for most of the strains. Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) candidates were found in most genomes (19 out of 23). Complete CRISPR-Cas systems consist of an array of CRISPRs interspaced by spacers and an adjacent *cas* gene cluster. Such a complete structure was observed only in the genomes of *B. casei* S18 (scaffold ID: S272_Contig15.15; 17 spacers), *B. album* DSM 18261^T (scaffold ID: K318DRAFT_scaffold00001.1; 2+1+6+35+12 spacers) and *B. ravensturnense* 5401308^T (scaffold ID: Y1ADRAFT_CAJD01000011_1.11; 36 spacers). They all belong to the Type I CRISPR-Cas system but their overall gene content is variable. The PHASTER tool identified only one complete prophage region, in strain *B. sp.* Mu109. This 11.4 kb region (scaffold ID: Ga0063700_1029; locus tag Ga0063700_02875 to Ga0063700_02886) contains attachment sites (*attL* and *attR*) and CDSs encoding putative transposase, recombinase, integrase and capsid scaffolding proteins. However, because most genomes are draft genomes, other

prophage regions might be present as regions split on several contigs and, consequently, difficult to detect.

Phylogenomic analyses and orthology

The genomic data from the 23 *Brevibacterium* strains were used to assess their intra-genus phylogenetic relationships. The phylogenomic tree partitioned the strains into two major lineages (Figure 1). Lineage 1 contains two *Brevibacterium* strains isolated from human-associated samples, i.e., *B. mcbrellneri* ATCC49030^T and *B. ravensturnense* 5401308^T. Lineage 2, containing the 21 other strains, is composed of two branches corresponding to the groups 2.A and 2.B. Group 2.A contains four strains isolated from diverse habitats: *B. album* DSM 18261^T (saline soil), *B. senegalense* JC43^T (human stool), *B. sp.* Mu109 (cheese) and *B. jeotgali* SJ5-8^T (fermented seafood). Group 2.B contains all the *Brevibacterium* strains isolated from cheese except *B. sp.* Mu109. It can be divided into three clades: 2.B.1, 2.B.2 and 2.B.3. Clade 2.B.1 contains nine strains, including eight strains isolated from cheese, and *B. sandarakinum* DSM 22082^T, which was isolated from a house wall. Clade 2.B.2 consists of six strains, including two from cheeses and three from freshwater environments. Clade 2.B.3 contains two strains belonging to the *B. casei* species, i.e., CIP 102111^T, isolated from cheese and S18, isolated from human skin. In the following, clades 2.B.1, 2.B.2, 2.B.3 will be referred to as group "aurantiacum/sandarakinum/antiquum", group "linens/siliguriense/iodinum" and group "casei", respectively. The taxonomy of the *Brevibacterium* genus is still in process of reclassification [11]. According to Stackebrandt et al. [38], 16S rRNA (*rrs*) gene sequences and DNA-DNA hybridization (DDH) should be considered as molecular criteria for species delineation. However, the Average Nucleotide Identity (ANI) has recently been proposed to replace DDH values [39–41]. In the present study, we used two criteria for delineating species: two strains were considered to belong to the same species if (i) their *rrs* gene sequence identity was $\geq 98\%$ [42] and (ii) their ANI was $\geq 95\%$ [40]. The results are presented in Additional file 2. Based on these criteria, two strains isolated from cheese products, i.e. 239c and Mu109 could not be linked to any sequenced species. In addition, *B. linens* AE038-8 and *B. linens* ATCC 9172^T have an ANI value of only 91.2%, suggesting that strain AE038-8 does not belong to the *B. linens* species.

Pan-genome analysis of the 23 *Brevibacterium* strains resulted in 25,376 orthologous gene clusters, containing a total of 78,702 protein-coding genes (Additional files 3 and 4). Of these clusters, only 263 (1%) are shared by all the strains (the core genome), reflecting a high intragenus genomic variability. We further investigated the *B. aurantiacum* species, in which all five of the sequenced strains were isolated from cheese. The pan-genome of this group contains 5,988 orthologous gene clusters, of which 2,684 are core and 3,304 are accessory, i.e., variable among strains (Figure 2A). Functional prediction revealed an overrepresentation of some COG categories in the accessory genome relative to the core genome, especially the categories [V] (Defense mechanisms) and [X] (Mobilome: prophages, transposons), in which the ratio accessory/core was 4.4 and 45.3, respectively (Figure 2B).

Catabolism of energy compounds present in cheeses

Catabolism of lactose, galactose and D-galactonate

During the manufacturing of cheeses, lactose is consumed by lactic acid bacteria, but some lactose may still be present at the beginning of ripening. When the lactic starter culture

contains *Streptococcus thermophilus* strains, some galactose is produced from lactose, and this compound may be present in the cheese curd for several weeks [43]. No beta-galactosidase gene was identified in the 23 *Brevibacterium* genomes, which is consistent with the fact that most *Brevibacterium* strains are not able to consume lactose [11]. However, the genomes of twelve of the 23 *Brevibacterium* strains encode the four enzymes of the Leloir pathway for galactose utilization (Additional file 5). The corresponding strains belong to the phylogenetic groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum and linens/siliguriense/iodinum. A complete pathway for D-galactonate catabolism is present in strains from the phylogenetic groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum, linens/siliguriense/iodinum and casei. The genes are organized in a cluster, that encodes a transcriptional regulator, a 2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase [EC 4.1.2.21], a 2-dehydro-3-deoxygalactonokinase [EC 2.7.1.58], a galactonate dehydratase [EC 4.2.1.6] and one or two D-galactonate importers.

Catabolism of lactate, acetate, ethanol and citrate

Lactate, which is produced from lactose by lactic acid bacteria, is an important energy substrate for most aerobic cheese ripening bacteria [44]. At least two predicted lactate permease genes are present in the genomes of the 23 *Brevibacterium* strains (Additional file 5). The oxidation of lactate by lactate dehydrogenase generates pyruvate that is later catabolized through the TCA cycle. There are two types of lactate dehydrogenases in bacteria, NAD-dependant lactate dehydrogenases (nLDHs) and NAD-independent lactate dehydrogenases (iLDHs), the latter generally being considered as the enzymes responsible for lactate oxidation in bacteria [45]. Four types of iLDHs were identified in the genomes of the *Brevibacterium* strains: a quinone-dependent D-iLDH, a quinone-dependent L-iLDH, a Dld II-type quinone or cytochrome-dependent D-iLDH [46] and a three subunit quinone or cytochrome-dependent L-iLDH complex LldEFG [46]. Dld II-type quinone or cytochrome-dependent D-iLDHs were present only in group aurantiacum/sandarakinum/antiquum. A lactate permease gene is adjacent to the quinone-dependent L-iLDH gene in 14 strains. In cheese, acetate is produced from lactose by heterofermentative lactic acid bacteria, from citrate by citrate-utilizing lactic acid bacteria, or from lactate by *Pediococcus* and *Propionibacterium* strains. Twenty of the 23 *Brevibacterium* genomes encoded the monocarboxylic acid transporter MctC, which is an uptake system for acetate, propionate and pyruvate [47] (Additional file 5). Genes encoding acetyl-CoA synthase, which channels acetate toward the TCA cycle, are present in all the 23 strains. In cheese, ethanol is produced from lactose by yeasts such as *Kluyveromyces lactis* and *K. marxianus*, and by heterofermentative lactic acid bacteria. It is a potential energy substrate for aerobic microorganisms during cheese ripening but, to our knowledge, this has never been investigated. There are numerous candidate genes encoding enzymes involved in the catabolism of ethanol to acetate in the genomes of the *Brevibacterium* strains: between one and nine for the alcohol dehydrogenase and between nine and 31 genes for the acetaldehyde dehydrogenase (Additional file 5). In *Corynebacterium glutamicum*, the genes encoding the alcohol dehydrogenase (*adhA*) and the acetaldehyde dehydrogenase (*ald*) are responsible for ethanol catabolism [48]. All of the 23 *Brevibacterium* genomes encode an ortholog of *adhA* (65 to 69% identity at the amino acid level) and an ortholog of *ald* (67 to 82% identity), and in 21 strains, these genes form a cluster. Milk contains citrate (~8 mM in cow's milk), which may persist during cheese ripening if the lactic starter culture does not contain citrate-utilizing lactic acid bacteria. Citrate importers belonging to the Citrate-Mg²⁺:H⁺ (CitM)/Citrate-Ca²⁺:H⁺ (CitH) Symporter (CitMHS) family (TC no. 2.A.11) and to the 2-HydroxyCarboxylate Transporter (2-HCT) family (TC no. 2.A.24) were detected in 16 *Brevibacterium* strains (Additional file 5). The genomes of the two *B. casei* strains did not

encode any citrate transporter, and those of the six strains from the phylogenetic group *linens/siliguriense/iodinum* did not encode 2-HCT family citrate transporters.

Catabolism of lipids and glycerol

Milk contains large amounts of triglycerides (~35 g/l in cow's milk), which can be used by cheese microorganisms as an energy source. Lipid catabolism involves the release of free fatty acids and glycerol and the subsequent breakdown of these compounds. The *Brevibacterium* genomes encode between 8 and 37 proteins with putative lipase or esterase activity (Additional file 6). Two types of secreted lipases / esterases were identified. The first type is a triacylglycerol lipase [EC 3.1.1.3], that was identified in 15 genomes, corresponding to eight of the nine strains of the phylogenetic group *aurantiacum/sandarakinum/antiquum*, to all six strains of the group *linens/siliguriense/iodinum* and to only one of the eight other strains (the cheese-associated strain Mu109). The second type is a glycerophosphoryl diester phosphodiesterase [EC 3.1.4.46], which was identified only in the strains of the phylogenetic groups *aurantiacum/sandarakinum/antiquum* and *linens/siliguriense/iodinum*. Uptake of fatty acids can be done by passive diffusion through the membrane lipid bilayer or by protein-facilitated transfer [49]. Genomic analysis revealed the presence of short-chain fatty acid uptake (AtoE) family proteins (TC no. 2.A.73) in all of the 23 *Brevibacterium* strains and it is noteworthy that *Brevibacterium* strains have a greater number of transporters from this family than other *Actinobacteria* strains (1.7 vs. 0.1 genes per genome), based on assignments to the COG2031 for the 5726 *Actinobacteria* strains present in April 2017 in the IMG database. A complete beta-oxidation pathway for fatty acid degradation was identified in all of the investigated strains, except in strains ATCC 49030^T and 5401308^T, for which genes encoding L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase or 3-ketoacyl-CoA thiolase seemed to be lacking. Beta-oxidation of odd-chain-length fatty acids yields propionyl-CoA in addition to acetyl-CoA. Propionyl-CoA may be catabolized via the methylcitrate cycle, which oxidizes it to pyruvate. Three enzymes are characteristic of this cycle: the methylcitrate synthase, the methylcitrate dehydratase and the 2-methylisocitrate lyase, encoded by *prpC*, *prpD* and *prpB*, respectively [50]. In all of the investigated *Brevibacterium* genomes, these genes form a cluster (*prpDBC*). It is noteworthy that in all of the strains of the phylogenetic groups *aurantiacum/sandarakinum/antiquum*, *linens/siliguriense/iodinum* and *casei*, *prpDBC* is located upstream of the genes involved in the catabolism of glycerol (glycerol uptake protein, glycerol kinase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase). This glycerol pathway occurs in aerobic conditions because glycerol-3-phosphate dehydrogenase reduces quinones of the respiratory chain [51]. The genome of the two *B. casei* strains also encodes a glycerol dehydrogenase and a dihydroxyacetone kinase, which constitute another glycerol utilization pathway.

Catabolism of proteins and amino acids

Cheese contains a large amount of proteins, mainly caseins, which can be degraded by various proteolytic microorganisms. The amino acids resulting from proteolysis can be used as an energy source by the cheese ripening microorganisms and they are also precursors of key flavor compounds. Genomic analysis of the 23 *Brevibacterium* genomes by the MEROPS peptidase BLAST search tool [52] and manual curation of the results revealed the presence of between four and 16 putative excreted enzymes with proteolytic activities, depending on the strain (Additional file 7). About 15% of these enzymes have a LPXTG motif (TIGR01167) at their C-terminus and are thus probably cell-wall-associated. Interestingly, in many cases the

corresponding genes are contiguous. In addition, there was a complete identity between the sequence of one of the two predicted cell-wall-associated proteases of *B. aurantiacum* ATCC 9174 (locus tag BlinB01003410) and the first 20 N-terminal amino acid sequence of an extracellular protease purified from this strain [53]. The presence of amino acid degradation pathways was inferred from the annotation of the 23 genomes (Additional file 7). All of them encode a bifunctional proline dehydrogenase/L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase [EC 1.5.5.2 / EC 1.2.1.88], which catalyzes oxidation of proline to glutamate using a membrane-bound quinone and NAD as the electron acceptor. They also encode a NAD-specific glutamate dehydrogenase [EC 1.4.1.2] that produces NADH and alpha-ketoglutarate, an intermediate of the TCA cycle, and the enzymes involved in the degradation of threonine and serine. The histidine and alanine catabolic pathways seem to be present in all of the strains except *B. senegalense* JC43^T (histidine) and *B. ravensturnense* 5401308^T (alanine). Phenylalanine, tyrosine, methionine and arginine degradation pathways were identified only in the strains of the phylogenetic groups aurantiacum/sandaracinum/antiquum, linens/siliguriense/iodinum and casei. Gamma-aminobutyrate is a four-carbon non-protein amino acid produced from glutamate by lactic acid bacteria during the ripening of cheeses [54]. All the genomes encode a 4-aminobutyrate transaminase [EC 2.6.1.19] and a succinate semialdehyde dehydrogenase [EC 1.2.1.16]. These enzymes convert Gamma-aminobutyrate into succinate, an intermediate of the TCA cycle.

Iron acquisition

Genes encoding putative Mn²⁺ or Fe²⁺ transporters are present in all of the 23 *Brevibacterium* genomes (Additional file 8). The EfeUOB transporter, which is a high-affinity uptake system for both Fe²⁺ and Fe³⁺ [55], is present in seven strains. Five genomes encode a putative ABC-type iron transport system whose closest homolog in *Haemophilus influenzae* (FbpABC) is required for acquiring iron from transferrin [56]. Fe³⁺/siderophore transport components are present in all of the 23 genomes, varying from nine components for *B. senegalense* JC43^T, up to 31 components for *B. sp.* Mu109. Comparison of the abundance of these components based on the analysis of the COG1120, COG4604, COG0609, COG4605, COG4606, COG4779, COG0614, COG4592 and COG4607, showed that the average number was higher for *Brevibacterium* (17.6 genes per genome) than for the other *Actinobacteria* (8.4 genes per genome, calculated from 5,726 *Actinobacteria* genomes). The *Brevibacterium* genomes also encode siderophore interacting proteins (mean number of 3.6 genes per genome), which are required for iron release from Fe³⁺/siderophore complexes. A putative hydroxamate-type siderophore biosynthesis cluster, which encodes a lysine N6-hydroxylase [EC 1.14.13.59], a siderophore synthetase component and, occasionally, a L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase [EC 4.1.1.86], is present in 15 strains. All these strains belong to the phylogenetic groups aurantiacum/sandaracinum/antiquum, linens/siliguriense/iodinum and casei (Additional file 8). The genome of strain Mu109 contains a cluster (locus tag Ga0063700_02161 to Ga0063700_02193) encoding eight Fe³⁺/siderophore transport components, one siderophore interacting protein and four proteins that are probably involved in the biosynthesis of a catecholate or a mixed catecholate/hydroxamate siderophore: 4'-phosphopantetheinyl transferase EntD, MbtH protein, non-ribosomal siderophore peptide synthetase component and L-ornithine N5-oxygenase [EC 1.14.13.195]. The closest homologs of the 4'-phosphopantetheinyl transferase EntD and the non-ribosomal siderophore peptide synthetase component are found in *Streptomyces* species. The genome of strain ATCC 9174 contains a cluster (locus tag BlinB01002486 to BlinB01002496) encoding three Fe³⁺/siderophore transport components, one siderophore interacting protein, one siderophore exporter and seven genes that are probably involved in the biosynthesis of a catecholate

siderophore: non-ribosomal siderophore peptide synthetase component, glycosyltransferase IroB, 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase [EC 1.3.1.28], isochorismate synthase [EC 5.4.4.2], 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [EC 2.7.7.58], isochorismatase [EC 3.3.2.1], and a putative transferase component of siderophore synthetase. These siderophore biosynthesis genes probably result from HGTs since many of their closest homologs are present, either in Gram-negative species or in *Streptomyces* or *Paenibacillus* species. In addition, comparison of the flanking regions of the siderophore biosynthesis cluster of strain ATCC 9174 to the CNRZ 920 genome (in which the cluster is absent) revealed that the cluster corresponded to an insertion that occurred in an ancestor of strain ATCC 9174 at the end of a tRNA-gly gene (locus tag BlinB_R0152 in ATCC 9174 and Ga0063691_00673 in CNRZ 920), which is followed in CNRZ 920 by a protein of unknown function (locus tag Ga0063691_00672, which is an ortholog of BlinB01002497 in ATCC 9174). For strains ATCC 9172^T and Mu101, there is little evidence for siderophore biosynthesis, even if it cannot be excluded, since their genome encodes a lysine decarboxylase that is clustered with a siderophore interacting protein and a Fe³⁺/siderophore binding component. With the exception of isochorismate synthase, which is an enzyme that is also involved in menaquinone biosynthesis, no genes involved in siderophore biosynthesis were identified in the genomes of strains DSM 18261^T, SJ5-8^T, 5401308^T, ATCC 49030^T and JC43^T. In summary, the genomic analyses indicate that 16 of the 23 *Brevibacterium* strains are probably able to produce siderophores. Hydroxamate-type siderophore genes are found in 14 strains, catecholate-type siderophore genes in strain Mu109, and both types in strain ATCC 9174. Siderophore biosynthesis is predicted to occur in all of the nine strains of the phylogenetic group aurantiacum/sandarakinum/antiquum, in four of the six strains of the group linens/siliguriense/iodinum, in the two strains of the group casei, but only in one of the six other *Brevibacterium* strains, which corresponded to the cheese isolate Mu109. Interestingly, analysis of the genomes present in the IMG database also revealed that four gene clusters involved in iron acquisition were shared between *Brevibacterium* strains isolated from cheeses and cheese isolates belonging to other genera (*Glutamicibacter*, *Microbacterium* and *Corynebacterium*). This corresponded to recent HGT events since the percentages of identity at the amino acid level between the genes in *Brevibacterium* and the genes in the other genera were typically ~95-100%. In most cases, transposase genes were located close to the clusters. These clusters were denoted Iron-Brev1, Iron-Brev2, Iron-Brev3 and Iron-Brev4 (Additional file 9). The cluster Iron-Brev1 corresponds to the ActinoRUSTI region that was recently described [17].

Osmotic stress tolerance

Cheeses are salted by applying salt to their surface or by submerging them in saturated brine. One mechanism to overcome osmotic stress that results from high salt concentration is the accumulation of osmoprotectants. *Brevibacterium* strains are known to produce the osmoprotectant ectoine [57]. It is synthesized from L-aspartate-semialdehyde by the action of three enzymes: diaminobutyrate aminotransferase (EctB) [EC 2.6.1.76], diaminobutyrate acetyltransferase (EctA) [EC 2.3.1.178] and ectoine synthase (EctC) [EC 4.2.1.108]. Ectoine can be further converted to hydroxyectoine by the action of ectoine dioxygenase (EctD). Except for strains ATCC 49030^T and 5401308^T, all the investigated *Brevibacterium* genomes contained the *ectABC* cluster (Additional file 10). The *ectD* gene was present in 13 of the 15 strains from the phylogenetic groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum and linens/siliguriense/iodinum, but it was absent in the two strains of the group casei, and only present in one of the six other *Brevibacterium* strains. Glycine-betaine is another osmoprotectant that can be synthesized by *Brevibacterium*. The genomic analysis revealed the

presence of two possible pathways. In the first one, choline is converted to glycine betaine by the combined action of a choline dehydrogenase [EC 1.1.99.1] and a betaine aldehyde dehydrogenase [EC 1.2.1.8] whereas in the second one, this conversion is catalyzed by a single enzyme, choline oxidase [EC 1.1.3.17]. Twelve of the strains have both pathways, nine have only the choline oxidase pathway, one has only the choline dehydrogenase pathway, and one has none of them. When present, the choline oxidase gene is located in a cluster containing a betaine/carnitine/choline transporter (BCCT) and a betaine-aldehyde dehydrogenase. Choline is present in milk and cheese [58], making it available for glycine-betaine biosynthesis. Interestingly the *Brevibacterium* genomes generally exhibit a greater number of BCCT than the other *Actinobacteria* genomes (6.3 vs. 1.1 genes per genome, based on assignments to COG1292) (Additional file 10). However, they do not have more ABC transport components involved in the transport of glycine betaine or related osmolytes (4.7 vs. 6.1). Trehalose is a non-reducing sugar that plays a physiological role in energy storage and also as a compatible solute [59,60]. The genome of the 23 strains encodes a trehalose synthase [EC 5.4.99.16], which catalyzes the synthesis of trehalose from maltose (Additional file 10). Except for strain ATCC 49030^T, trehalose can also be produced from UDP-glucose and glucose-6-phosphate via the trehalose-6-phosphate synthase [EC 2.4.1.15]/trehalose-6-phosphate phosphatase [EC 3.1.3.12] pathway. Two operons encoding multisubunit (Na⁺)(K⁺)/proton antiporters (Mrp systems) were identified in all the *Brevibacterium* genomes. These Mrp systems are composed of six subunits and the genes are organized as "group 2" *mrp* operons [61]. In other *Actinobacteria* genomes, the mean number of Mrp systems, based on assignment to COG1006, is about four times lower (0.5 vs. 2.0). The abundance of the other (Na⁺)(K⁺)/proton antiporters was similar in *Brevibacterium* and in the other *Actinobacteria* genomes (mean values of 3.9 and 4.0 genes per genome, respectively, based on assignments to the COG0025, COG1055, COG1757, COG3004, COG3067 and COG3263). It is noteworthy that *Brevibacterium* strains have a greater number of transporters from the Sodium Solute Symporter (SSS) family than other *Actinobacteria* strains (7.3 vs. 1.7 genes per genome, based on the number of proteins matching the PF00474 Hidden Markov Model).

Bacteriocines and phenazines

In cheese, bacteriocin producers can inhibit other microbial groups that share the same ecological niche, which confers them a selective advantage. Genomic analysis predicted the production of several bacteriocins in *Brevibacterium* strains (Additional file 11). Linocin M18-related bacteriocins (PF04454) were identified in 15 genomes, including five of the nine strains of the phylogenetic group aurantiacum/sandaracinum/antiquum, all six strains of the group linens/siliguriense/iodinum and four of the eight other strains (*B. album* DSM 18261^T, *B. senegalense* JC43^T, *B. jeotgali* SJ5-8^T and *B. sp.* Mu109). Five groups of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) [62] were predicted in the 23 *Brevibacterium* strains. The first group corresponds to lanthipeptides, which are characterized by the presence of lanthionine (Lan) and/or methylanthionine (MeLan) and/or labionin (Lab) residues [62,63]. Many lanthipeptides have an antimicrobial activity, mainly against Gram-positive bacteria [64], and are referred to as lantibiotics. Lanthipeptide gene clusters were predicted in seven strains, of which six are cheese-associated (Additional file 11). Even if they have different structures, these clusters contain one or two putative lanthipeptide synthetases, one or two putative precursor peptides, one to three putative ABC transport system components and, in some cases, a prolyl oligopeptidase (PF00326) (Figure 3A). Protein sequence analysis of the predicted lanthipeptide synthetases suggests that all of them belong to class III, corresponding to a trifunctional enzyme LanKC [65]. The sequences of all

putative precursor peptides (Figure 3B) contain two characteristic and conserved Ser/Ser(Thr)/Cys motifs necessary for the formation of (Me)Lan and/or (Me)Lab. One of them also contains a B-A-C-Leu-Gln motif in its N-terminal part (where B is Ile, Leu or Val; A is Phe or Leu; and C is Glu or Asp), which is highly conserved in class III precursor peptides and essential for the enzymatic processing of the labyrinthopeptin A2 [66]. To our knowledge, as of this time, the *Kribbella flavida* DSM 17836 protein FlaP, which is a proline-specific oligopeptidase, is the only characterized protease involved in the removal of the leader peptide of a class III lanthipeptide [67]. Genes with a weak homology with *flaP* were identified in six of the seven predicted lanthipeptide gene clusters, but only one of the six predicted precursor peptides contains a Pro residue in the leader peptide, which could serve as the primary cleavage site for the predicted peptidase (Figure 3B). Interestingly, the putative lanthipeptide gene cluster from the four cheese-associated strains *B. antiquum* CNRZ 918, *B. antiquum* P10, *B. aurantiacum* ATCC 9174 and *B. linens* ATCC 9172^T is located in a ~96 kb genomic island, which is absent in the other *Brevibacterium* genomes investigated, but which is present in the genome of *Corynebacterium casei* LMG S-19264, a strain isolated from a smear-ripened cheese [28]. This genomic island, which we denoted as BreLI (**B**revibacterium **L**anthipeptide **I**sland), probably corresponds to an Integrative and Conjugative Element (ICE, or conjugative transposon). ICEs are typically composed of three core genetic modules involved in: (i) integration and excision; (ii) conjugation; and (iii) regulation [68]. Functional prediction of genes in BreLI revealed assignments to these three functions (Figure 3C and Additional file 11). Integration of this ICE occurred at the 3' end of a gene encoding a class Ib ribonucleotide reductase beta subunit, resulting in a 12-bp perfect repeat sequence, present at the two borders of BreLI. It is noteworthy that, in comparison to the four other strains, a segment containing three genes of the lanthipeptide gene cluster region is lacking in the ATCC 9174 BreLI Island (compare clusters (a) and (b) in Figure 3A). The second group of predicted RiPPs is related to lactococcin 972 (PF09683), which has been characterized in *Lactococcus lactis* IPLA 972 [69,70]. Genes with a weak homology with the lactococcin 972 precursor peptide were identified in six cheese-associated strains from the phylogenetic group *aurantiacum/sandarakinum/antiquum*, corresponding to two different putative prepeptides, one of them being present only in strain 239c, and the other in five *B. aurantiacum* strains (Additional file 11). In all these six strains, the bacteriocin structural gene forms an operon with three genes encoding two transmembrane proteins and a putative ABC transport system ATP-binding protein. Comparison of the flanking regions of the lactococcin 972-related bacteriocin biosynthesis gene cluster in strains 6(3) and 8(6) with the CNRZ 918 genome (in which the cluster is absent) revealed that the gene cluster is located in a genomic island that is inserted at the end of a tRNA-val gene (locus tag Ga0063697_02943 in strain 6(3), Ga0063698_00389 in strain 8(6) and Ga0063689_00412 in strain CNRZ 918), which is followed in CNRZ 918 by an uracil-xanthine permease (locus tag Ga0063689_00413, which is an ortholog of Ga0063697_02919 in 6(3) and Ga0063698_00365 in 8(6)). The lactococcin 972-related bacteriocin biosynthesis gene cluster in strains ATCC 9174 and CNRZ 920 is also flanked by a tRNA-val gene. The third group of predicted RiPPs corresponds to linear azol(in)e-containing peptides (LAPs), which are characterized by the presence of multiple thiazole and (methyl)oxazole heterocycles, and sometimes by their corresponding 2-electron reduced azoline state. LAP gene clusters were predicted in four *B. aurantiacum* cheese-associated strains (Additional file 11). One cluster is present in strains 6(3), ATCC 9175^T and ATCC 9174, and another is present only in strain 8(6). All these clusters contain putative precursor peptides, a SagB-type dehydrogenase domain-containing protein (TIGR03605), one or two YcaO cyclodehydratases (PF02624) and a cyclodehydratase-docking fusion protein (TIGR03882), representing the critical components in LAP biosynthesis [62,71]. In addition, the gene cluster in strains ATCC 9175^T, ATCC 9174 and 6(3) also contains a methyltransferase, which may be involved in the methylation of the peptide [72]. Comparison of the flanking regions of the predicted LAP gene cluster in strain 6(3) with the CNRZ 920

genome (in which the cluster is absent) revealed that the gene cluster is located in a genomic island whose insertion is between an aspartate racemase (orthologs with locus tag Ga0063697_02599 in strain 6(3) and Ga0063691_01440 in strain CNRZ 920) and a short-chain dehydrogenase (orthologs with locus tag Ga0063697_02614 in strain 6(3) and Ga0063691_01438 in strain CNRZ 920). The LAP gene cluster in strain 8(6) contains two putative ABC transport system components. This type of component is frequently associated with LAP biosynthesis gene clusters [62,72]. The fourth group of predicted RiPPs corresponds to the recently discovered linaridin family, which is characterized by the presence of thioether crosslinks, like for the lanthipeptide family, but whose post-translational modifications are unrelated to the lanthipeptide biosynthesis pathway [73]. Linaridin precursor peptides were predicted in the two cheese-associated strains 239c and 8(6). These two prepeptides showed significant similarity to the characterized cypemycin (51 to 53% identity) and grisemycin (58% identity) prepeptides [73,74]. The putative linaridin gene clusters of strains 239c and 8(6) are very similar (Additional file 11). They contain homologs of the cypemycin biosynthetic gene cluster, i.e. *cypH*, *cypL*, *cypD* and *cypT* [73]. The fifth group of predicted RiPPs is related to the sporulation delaying protein (SDP), which has been characterized in *Bacillus subtilis* [75]. SDP is produced by the *sdpABC* operon in which *sdpC* encodes the SDP precursor peptide (pro-SdpC) and *sdpA* and *sdpB* are essential for the production of the active SDP toxin [76]. Genes with a weak homology with *sdpABC* were identified in three *B. aurantiacum* cheese-associated strains (Additional file 11). Comparison of the corresponding flanking regions in strains ATCC 9175^T and 6(3) with the 8(6) genome (in which the cluster is absent) revealed that this gene cluster is located in a genomic island that is inserted at the end of a NAD(P)H-dependent flavin oxidoreductase (locus tag Ga0063690_01635 in strain ATCC 9175^T, Ga0063697_00339 in strain 6(3) and Ga0063698_01092 in strain 8(6)), which is followed in 8(6) by a LuxR family transcriptional regulator (locus tag Ga0063698_01093, which is an ortholog of Ga0063690_01646 in ATCC 9175^T and Ga0063697_00350 in strain 6(3)).

Phenazines are heterocyclic compounds that are substituted at different points around their rings [77]. They have various colors and biological activities, such as antibiotic and intercellular signaling activities. *Brevibacterium iodinum* ATCC 49514^T, isolated from milk, is known to produce purple extracellular crystals of the phenazine iodinin [78]. Its genome contains the *phzGFEDCB* gene cluster, which encodes one enzyme involved in chorismate synthesis (PhzG) and the five enzymes required for the generation of the "core" phenazines, phenazine-1,6- dicarboxylic acid or phenazine-1-carboxylic acid, which are precursors for strain-specific phenazine derivatives (Additional file 12). This cluster is also present in four other strains, all isolated from cheeses (ATCC 9175^T, ATCC 9172^T, P10, and ATCC 9174), which are thus probably able to produce phenazine derivatives.

Discussion

Microbial cultures are widely used in the cheesemaking industry. There is a high degree of expertise today in terms of the design of lactic starter cultures. This expertise includes several important properties such as the ability to grow in milk, the resistance to bacteriophages, and the generation of adequate acidifying and texturizing activities. The situation is more problematic for ripening cultures for surface-ripened cheese, which contain strains that sometimes do not grow well in cheese. This may be explained by an insufficient fitness in the cheese surface habitat in comparison to the resident "house flora". Indeed, contrary to lactic starter cultures where growth is very fast (several hours) and facilitated by a massive inoculation in milk that contains only a low concentration of microbial cells, growth

at the surface of cheeses takes a longer time (several weeks) and therefore offers more opportunities for the development of well-adapted adventitious strains.

Cheese-associated strains of *Brevibacterium* belong to different species, showing that adaptation to the cheese habitat occurred independently in different lineages. The strains sequenced in the present study belong to the species *B. aurantiacum*, *B. antiquum*, *B. linens*, *B. casei*, as well as to two not-yet described species (*B. sp.* Mu109 and 239c). In some cases, the genomes of cheese-associated strains are closely related to other strains, suggesting a recent adaptation. For example, the ANI value between strains S18 (human skin) and CIP 102111^T (cheese) is higher than the values between the different cheese isolates belonging to the species *B. aurantiacum* (98.22% vs. 97.48-98.04%). Interestingly, a complete prophage was found in *B. sp.* Mu109, which indicates that cheese-associated *Brevibacterium* strains may undergo phage attacks, even if, to our knowledge, there is no study in the scientific literature concerning the sensitivity to phages of ripening cultures containing *Brevibacterium* strains. It is possible that the impact of phages on these cultures has been overlooked.

In this study, genomic analyses revealed that *Brevibacterium* strains show differences in the ability to use energy compounds present in cheeses. Indeed, the galactose catabolism pathway is predicted to occur only in the phylogenetic groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum and linens/siliguriense/iodinum, and the D-galactonate catabolism pathway only in the phylogenetic groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum, linens/siliguriense/iodinum and casei. The strains from the aurantiacum/sandarakinum/antiquum and linens/siliguriense/iodinum groups have more lactate dehydrogenases than the strains from the other groups, suggesting that they have a better ability to consume lactate, which may be useful during growth in cheese. A predicted extracellular triacylglycerol lipase was found in 14 of the 15 genomes from the aurantiacum/sandarakinum/antiquum and linens/siliguriense/iodinum groups and in the cheese-associated strain Mu109, suggesting that many *Brevibacterium* strains are likely to contribute to cheese lipolysis. The resulting fatty acids constitute a potential energy source for the lipolytic *Brevibacterium* strains as well as for other microbial populations living on the cheese surface. A cluster of two genes encoding two secreted proteases with LPXTG motif is present in 16 of the 23 investigated *Brevibacterium* genomes. In *B. aurantiacum* ATCC 9174, one of these two proteases has been purified and characterized [53]. This protease is active on casein and secreted during the growth of the strain, which indicates that it probably contributes to cheese proteolysis [79,80]. The amino acids produced from caseins and the non-protein amino acid 4-aminobutyrate are major energy substrates for the bacteria growing at the cheese surface. The 17 strains belonging to the groups aurantiacum/sandarakinum/antiquum, linens/siliguriense/iodinum and casei are well equipped in amino acid catabolism pathways and have a similar gene content. The six other *Brevibacterium* strains have a lower catabolic potential since they do not encode the enzymes involved in arginine, phenylalanine, methionine and tyrosine degradation.

Microorganisms growing at the cheese surface have to be able to withstand the osmotic stress due to the presence of salt. Most *Brevibacterium* genomes encode the pathways for the production of the osmoprotectants ectoine or hydroxyectoine from aspartate, glycine-betaine from choline, and trehalose. In addition, in comparison to the other *Actinobacteria* genomes, they also encode a large number of Betaine/Carnithine/Choline family Transporters (BCCT), of multisubunit (Na⁺)(K⁺)/proton antiporters, and of Sodium Solute Symporters (SSS). The two last systems take advantage of Na⁺ gradients to regulate the intracellular pH and to import nutrients. These properties probably contribute to the good resistance of *Brevibacterium* strains to the cheese salt and to their stimulation in the presence of 4% NaCl [81]. No major differences in the gene content concerning osmotic stress resistance was observed between the cheese-associated or the other strains, and between the investigated

phylogenetic groups, except for *B. ravensturnense* 5401308^T and *B. mcbrellneri* ATCC 49030^T, which have a smaller number of BCCT and SSS systems. These two strains have the smallest genome sizes of the 23 investigated strains and have probably undergone a reductive genome evolution.

The present study confirms the central role of iron metabolism in bacteria from cheese surface microbial communities. *Brevibacterium* strains produce and utilize siderophores [82], and the growth of typical aerobic bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron [83]. The low iron content of milk, the presence of sequestering compounds such as lactoferrin, the presence of oxygen and the high pH of the cheese matrix during the growth of the acido-sensitive bacteria contribute to restricting the availability of iron. One strategy for improving iron acquisition in the cheese habitat is to produce siderophores, and this capacity can be acquired or improved by HGT. Hydroxamate-type siderophore biosynthesis seems to be widespread in *Brevibacterium* strains since gene clusters involved in their production were found in most genomes of the *aurantiacum/sandaracinum/antiquum*, *linens/siliguriense/iodinum* and *casei* groups. Clusters encoding catecholate-type siderophores were present only in two strains and resulted from horizontal transfers from other genera. Interestingly, both strains were isolated from cheese, and one of them (ATCC 9174) also possesses a gene cluster involved in the production of an acetohydroxamate-type siderophore. At least one other cheese-associated strain, *Glutamicibacter arilaitensis* Re117, has two siderophore biosynthesis clusters, including a catecholate siderophore resulting from HGT [16]. It is likely that siderophore production by cheese microorganisms also results in biotic interactions. In a recent study, it was observed that a *Staphylococcus equorum* strain, which was a weak competitor against other closely related *Staphylococcus* species in model cheese experiments, became dominant in the presence of the fungus *Scopulariopsis* [84]. This effect was attributed to fungal siderophore production, which may relieve *S. equorum* of the costly production of the siderophore staphyloferrin B and potentially provide an iron source through cross-feeding. This type of cross-feeding may also occur in microbial communities containing *Brevibacterium* strains that do not have the potential to produce siderophores, such as *B. linens* ATCC 9172^T and *B. linens* Mu101. The Fe³⁺/siderophore complexes are imported into the cells by ABC transport systems, whether or not these siderophores are produced by the same strain. Numerous ABC-type Fe³⁺/siderophore components are present in *Brevibacterium* strains. These systems allow the cells to take advantage of different types of siderophores available in the medium. Horizontal gene transfers concerning ABC-type Fe³⁺/siderophore components were observed in the cheese-associated strains *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 [16], in *Corynebacterium variabile* DSM 44702 [15], and a recent study provided evidence of extensive HGTs concerning Fe³⁺/siderophore acquisition in very diverse cheese-associated bacteria [17]. One of these regions, known as ActinoRUSTI, was present in two of the 23 *Brevibacterium* strains investigated in the present study. Three other islands involved in iron acquisition that are present both in cheese-associated *Brevibacterium* strains and in cheese-associated strains belonging to other genera (*Glutamicibacter arilaitensis* Re117, *Corynebacterium casei* UCMA 3821, *Corynebacterium variabile* DSM 44702 and *Microbacterium gubbeenense* DSM 15944) were detected in the investigated genomes. Interestingly, three of these four islands were present in the cheese-associated strain *B. sp.* Mu109, which is also the strain with the highest number of ABC-type Fe³⁺/siderophore components (31 components).

Bacteriocin production is thought to play a critical role in mediating the microbial population or community interactions [85]. It may thus be assumed that it could have a significant impact on the cheese surface where microbial density may exceed 10¹⁰ cells per cm². In the present study, we detected several putative bacteriocin gene clusters in *Brevibacterium* genomes. They corresponded to six groups of bacteriocins, i.e., linocin M18-related bacteriocins and five groups of RiPPs, and were highly variable among strains.

Linocin M18, which has been characterized in the red smear cheese bacterium *B. linens* M18, is an antilisterial and wide-spectrum bacteriocin [86]. Its activity against *Listeria spp.* has also been demonstrated in a model cheese [87]. In our study, linocin M18-related bacteriocins were detected in 15 of the 23 investigated genomes, belonging to different phylogenetic groups and isolated from different habitats. This result is consistent with the fact that the structural gene *lin* encoding linocin M18 is widely distributed in coryneform bacteria [88]. To our knowledge, up until now, there has been no experimental evidence about the production of RiPPs in *Brevibacterium*. However, it cannot be excluded that some of the antibacterial substances characterized from *Brevibacterium* strains, such as the Linecin A from *B. aurantiacum* ATCC 9175^T [89] and/or the Linenscin OC2 from *B. linens* OC2 [90], are in fact RiPPs. Almost all the RiPP gene clusters detected in our study were found in cheese-associated strains, except for a lanthipeptide gene cluster in *B. mcbrellneri* ATCC 49030^T, which is a human-associated strain. Interestingly, many of them seem to result from HGTs. In this study, we identified the BreLI island, which is probably a ~96-kb integrative and conjugative element (ICE) encoding for class III lanthipeptides. This island is present in four cheese-associated *Brevibacterium* strains as well as in a cheese-associated strain from another genus (*Corynebacterium casei* LMG S-19264). Taken together, our results consolidate the hypothesis that bacteriocin production may provide an ecological advantage to cheese-associated bacteria. It would be interesting in further studies to examine whether these bacteriocin gene clusters are functional, to investigate the activity spectra of these bacteriocins and to determine the influence of environmental conditions on their biosynthesis. Such information would be useful for the design of surface-ripened cheese cultures in order to improve their competitiveness against adventitious strains or to prevent growth of pathogens and spoilage microorganisms. It would also be interesting to investigate the role of phenazines, which have a broad-spectrum antibiotic activity and whose biosynthesis is predicted to occur in four cheese-associated strains. These strains belong to three different species, but the presence of the corresponding gene clusters cannot be explained by recent HGT events in view of the divergence in gene sequences.

The present study confirms that there are HGT events between microorganisms growing at the surface of cheeses. Acquisition of genes involved in siderophore biosynthesis, iron import and bacteriocin production can probably improve the fitness of the strains in the cheese habitat. It can be hypothesized that these gene transfers exert an influence on the balance between the resident "house flora" and the strains from the ripening cultures. For the latter type of strains, it is, in most cases, the same strains that are massively inoculated in all the manufacturing runs. For the adventitious "house flora", it would be beneficial to acquire genes that improve their competitiveness to the detriment of the inoculated strains, such as genes governing bacteriocin production or iron acquisition. It would thus be interesting to examine the extent to which gene acquisition by the adventitious strains impacts the growth and stability of the components from ripening cultures used for the production of surface-ripened cheeses.

Conclusion

Some properties deduced from genome analyses are similar in all the investigated strains, such as the ability to catabolize ethanol or 4-aminobutyrate. This is also observed for the ability to catabolize glycerol and for osmotolerant biosynthesis, except for strains 5401308^T and ATCC 49030^T, which are two strains that have a smaller genome size. Other properties are mainly correlated to the phylogenetic position of the strains, whether they were isolated or not from cheese, such as the ability to catabolize galactose, lactate, amino acids, or to secrete triacylglycerol lipases. The ability to catabolize D-galactonate is present in part of

the strains, and this property does not seem to be correlated to the phylogenetic position or to the habitat of the strains. There are great differences in the number of Fe³⁺/siderophore ABC transport components. Some of these genes are in clusters that are also present in cheese-associated bacteria belonging to other genera, indicating that these genes are disseminated by HGTs among strains living on the cheese surface. Two *Brevibacterium* strains isolated from cheeses also acquired a catecholate-type siderophore biosynthesis gene cluster by HGT. Bacteriocin biosynthesis genes are present in most of the strains, and one of the corresponding gene clusters is located in a probable conjugative transposon of ~96 kb (BreLI), which is present in four cheese-associated *Brevibacterium* strains as well as in *Corynebacterium casei* LMG S-19264, a strain isolated from a smear-ripened cheese. *Brevibacterium* strains thus show differences in genetic determinants involved in the growth on the cheese surface. Some of them are correlated to the phylogenetic position and others are the result of gene transfers. Part of these properties contributes to biotic interactions between strains. In the future, it would be interesting to take this information into account in order to improve the screening and selection of *Brevibacterium* strains and their association with other ripening culture components.

Abbreviations

ANI: Average Nucleotide Identity; BCCT: Betaine/Carnithine/Choline family Transporter; BreLI: *Brevibacterium* Lanthipeptide Island; CDS: coding DNA sequence; CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; DDH: DNA-DNA Hybridization; HGT: Horizontal Gene transfer; HMM: Hidden Markov Model; ICE: Integrative and Conjugative Element; Lab: Labionin; Lan: Lanthionine; LAP: Linear Azol(in)e-containing Peptides; nLDH: NAD-dependant lactate dehydrogenase; iLDH: NAD-independent lactate dehydrogenase; MeLan: MethylLanthionine; RiPP: Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide; SDP: Sporulation Delaying Protein; SSS: Sodium Solute Symporter.

Acknowledgments

We are grateful to the INRA MIGALE bioinformatics platform (<http://migale.jouy.inra.fr>) for providing computational resources, and the IMG-ER system (<https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/mer/main.cgi>) for generating annotations.

Funding

N-P.P. is the recipient of a doctoral fellowship from the AgroParisTech Foundation and the INRA MEM metaprogram. This work was supported by France Génomique National infrastructure, funded as part of "Investissement d'avenir" program managed by Agence Nationale pour la Recherche (contrat ANR-10-INBS-09).

Availability of data and materials

Draft genome sequences of the 13 *Brevibacterium* strains sequenced in this study were deposited at the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>). Accession numbers are provided in Table 1.

Authors' contributions

SL and FI initiated the project. SL and MV supervised sequencing of the 13 *Brevibacterium* genomes and SL performed their assembly. CM supervised the genomic analyses. All the authors contributed to the analyses regarding the general genomic properties or the metabolism of energy compounds. Analyses dealing with iron metabolism and osmoresistance were performed by CM, those regarding proteases and lipases by NPP, and those regarding bacteriocins by NPP and CM. NPP, EDB and CM wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable

Consent for publication

Not applicable

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Figures

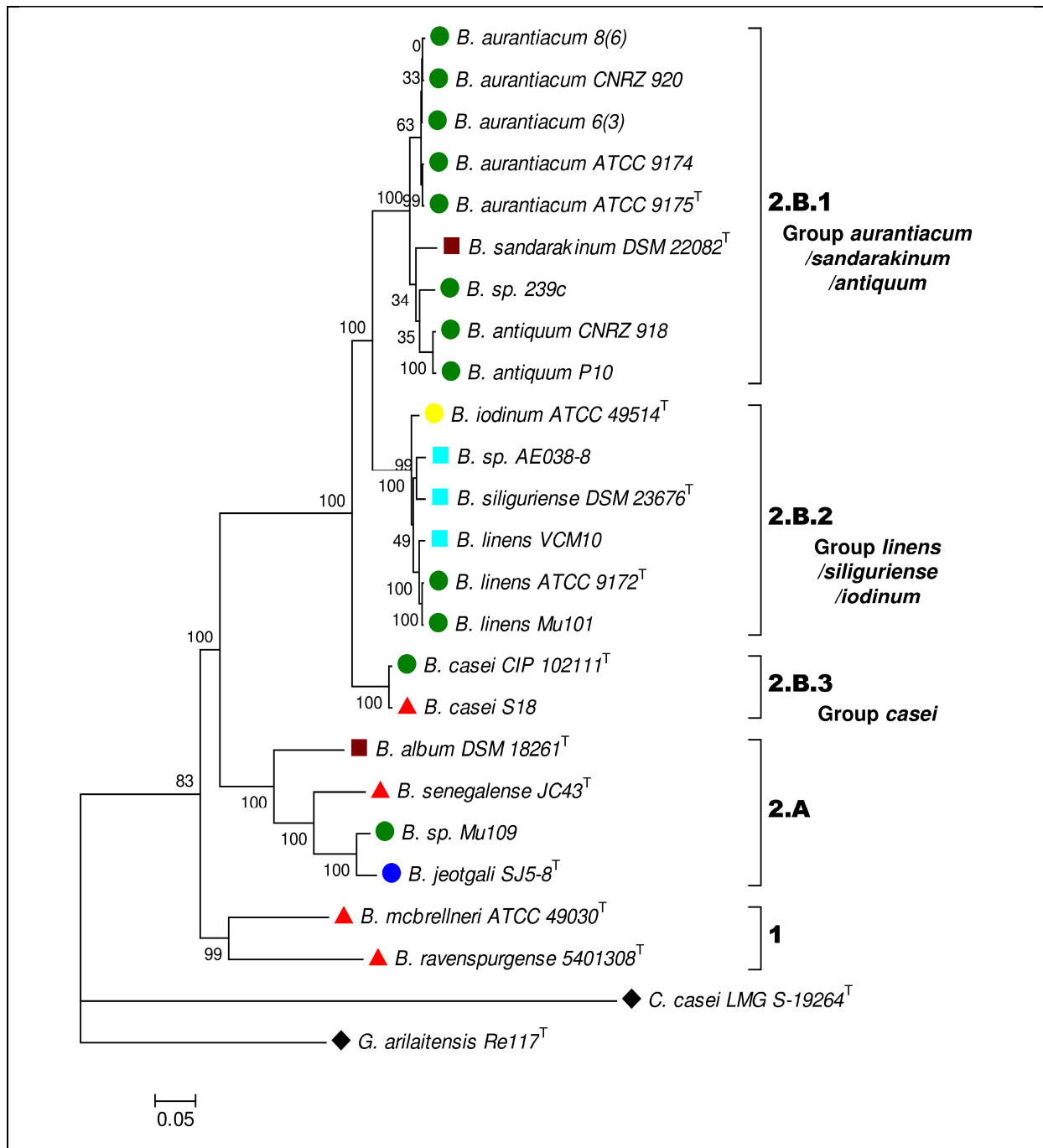
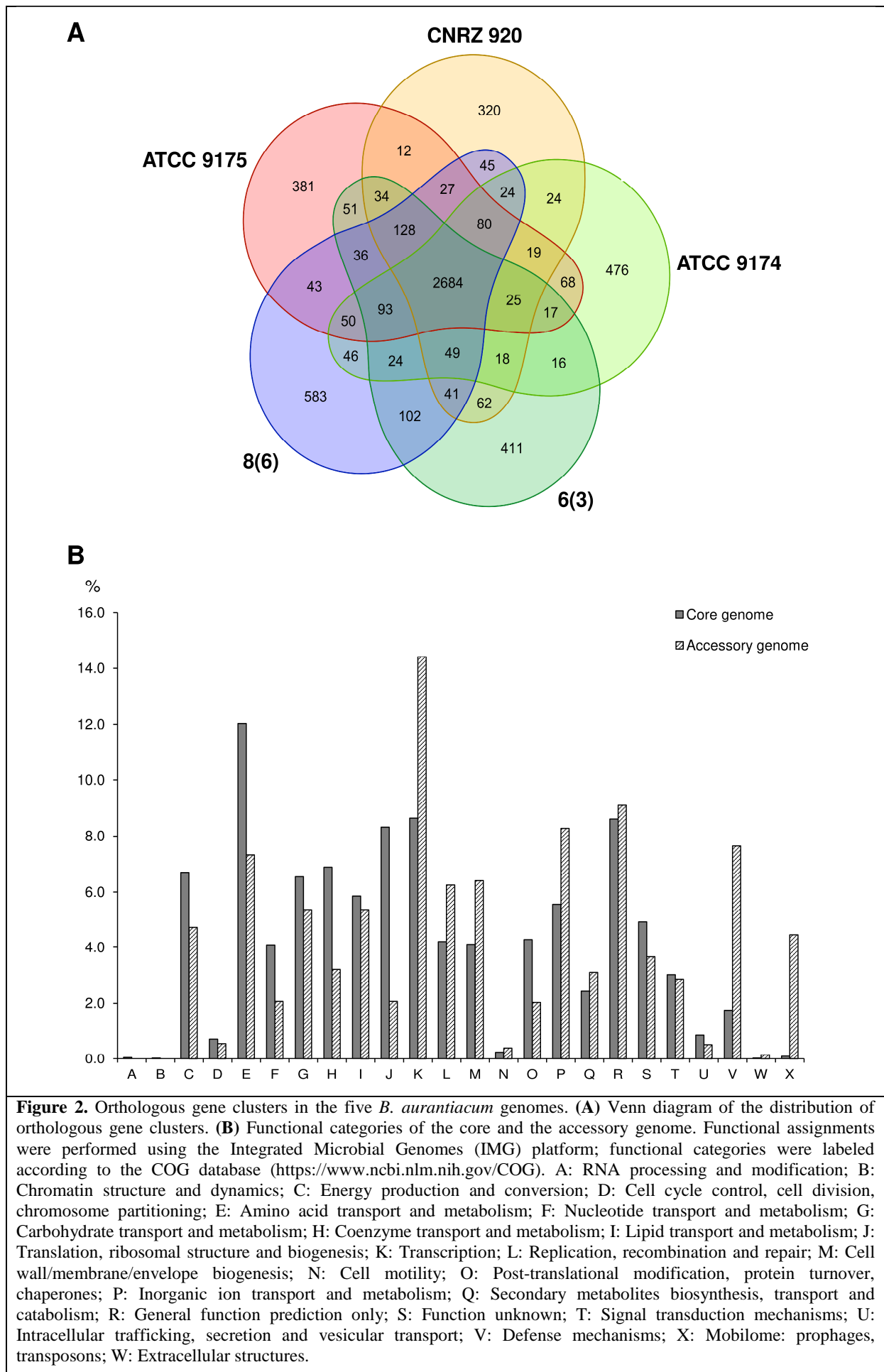
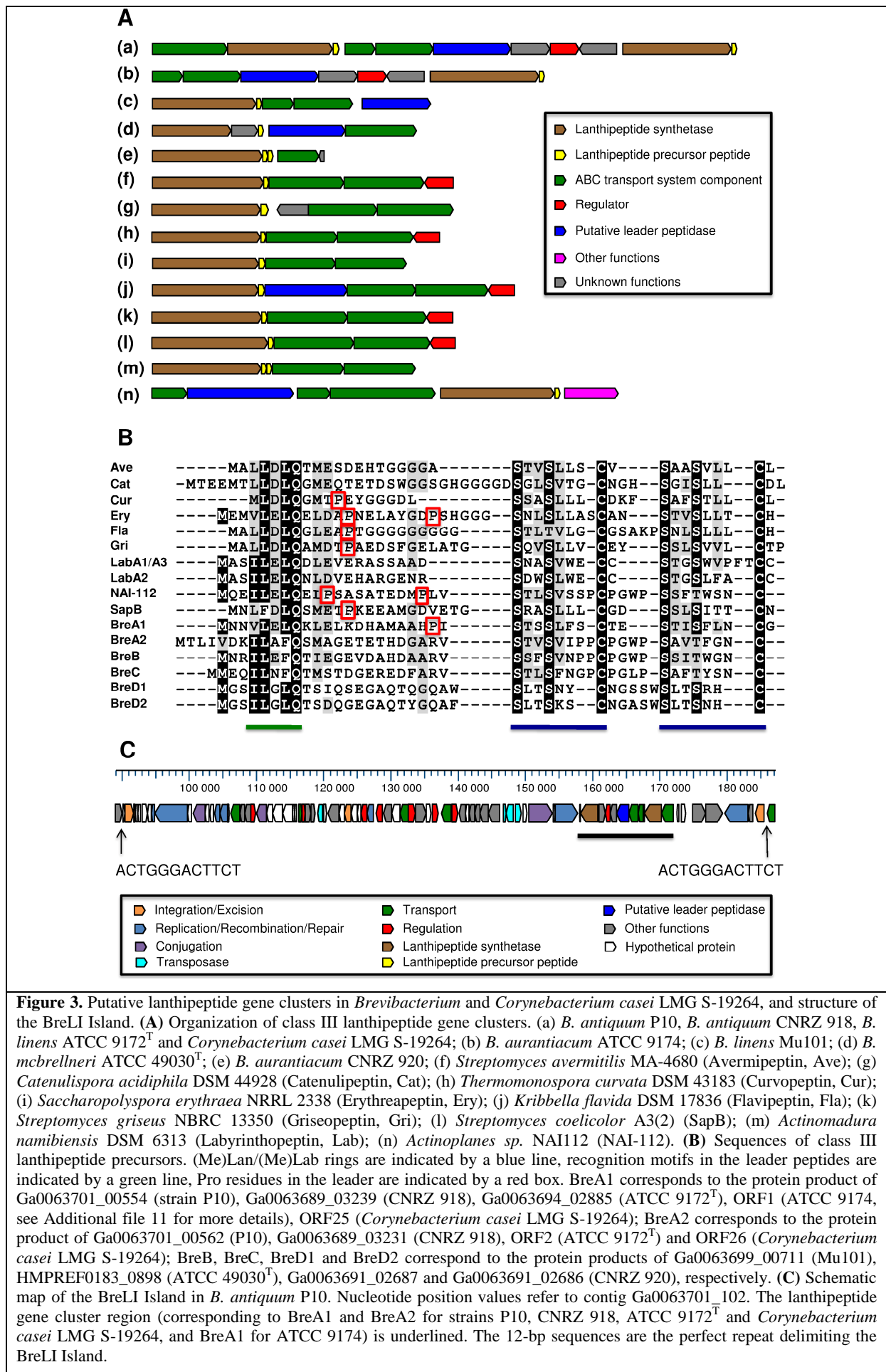


Figure 1. Phylogenetic tree of the 23 *Brevibacterium* genomes based on the concatenated amino acid alignments of 40 marker genes. The tree is rooted using *Glutamicibacter arilaitensis* Re117 and *Corynebacterium casei* LMG S-19264 as outgroups (◆). *Brevibacterium* strains are labeled according to their habitats (●: cheese; ●: milk; ●: seafood; ■: fresh water; ■: soil or wall surface; ▲: human associated). Bootstrap support values are shown as a percentage before the respective nodes; the scale bar indicates the number of substitutions per site. Phylogenetic clusters are indicated on the right of the tree.





Tables

Table 1. Information about the *Brevibacterium* strains and genomes investigated in the present study.

Species	Strain	Source	Bioproject	Sequence accession numbers	Status	Authors
<i>B. antiquum</i>	CNRZ 918	Beaufort cheese	PRJEB19830	FXZD01000001- FXZD01000049	Permanent draft	This study
<i>B. antiquum</i>	P10	Murol cheese	PRJEB19831	FXZE01000001- FXZE01000059	Permanent draft	This study
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9175 ^T	Camembert cheese	PRJEB19815	FXZB01000001- FXZB01000070	Permanent draft	This study
<i>B. aurantiacum</i>	CNRZ 920	Beaufort cheese	PRJEB19800	FXZG01000001- FXZG01000073	Permanent draft	This study
<i>B. aurantiacum</i>	6(3)	Langres cheese	PRJEB19867	FXYZ01000001- FXYZ01000091	Permanent draft	This study
<i>B. aurantiacum</i>	8(6)	Reblochon cheese	PRJEB19868	FXZI01000001- FXZI01000097	Permanent draft	This study
<i>B. casei</i>	CIP 102111 ^T	Cheddar cheese	PRJEB19871	FXZC01000001- FXZC01000024	Permanent draft	This study
<i>B. linens</i>	ATCC 9172 ^T	Harzer cheese	PRJEB19834	FXYY01000001- FXYY01000080	Permanent draft	This study
<i>B. linens</i>	Mu101	Munster cheese	PRJEB19836	FXZA01000001- FXZA01000081	Permanent draft	This study
<i>B. sp.</i>	239c	Camembert cheese	PRJEB19828	FXZH01000001- FXZH01000068	Permanent draft	This study
<i>B. sp.</i>	Mu109	Munster cheese	PRJEB19840	FXZF01000001- FXZF01000126	Permanent draft	This study
<i>B. iodinum</i>	ATCC 49514 ^T	Cow milk	PRJEB19872	FXYX01000001- FXYX01000065	Permanent draft	This study
<i>B. jeotgali</i>	SJ5-8 ^T	Seafood	PRJEB19841	FXZM01000001- FXZM01000047	Permanent draft	This study
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9174 ^a	Romadur cheese	PRJNA405	AAGP01000001- AAGP01000076	Permanent draft	DOE JGI, 2005 (direct submission)
<i>B. album</i>	DSM 18261 ^T	Soil	PRJNA195785	AUFJ01000001- AUFJ01000016	Permanent draft	Kyrpides et al., 2013 (direct submission)
<i>B. sandarakinum</i>	DSM 22082 ^T	Wall surface	PRJEB16423	LT629739	Complete	Varghese, 2016 (direct submission) Kämpfer et al., 2010 [91]
<i>B. linens</i>	AE038-8	Fresh water	PRJNA268212	JTJZ01000001- JTJZ01000029	Permanent draft	Maizel et al., 2015 [92]
<i>B. siliguriense</i>	DSM 23676 ^T	Fresh water	PRJNA303729	LT629766	Complete	Varghese, 2016 (direct submission)
<i>B. sp.</i>	VCM10	Fresh water	PRJNA234061	JAJB01000001- JAJB01000141	Permanent draft	Muthukrishnan et al., 2014 (direct submission)
<i>B. casei</i>	S18	Human associated	PRJNA174308	AMSP01000001- AMSP01000043	Permanent draft	Sharma et al., 2012 (direct submission)
<i>B. ravenstergense</i>	5401308 ^T	Human associated	PRJNA159637	CAJD01000001- CAJD01000026	Permanent draft	Roux et al., 2012 [93]
<i>B. mcbrellneri</i>	ATCC 49030 ^T	Human associated	PRJNA34583	ADNU01000001- ADNU01000096	Permanent draft	Qin et al., 2010 (direct submission)
<i>B. senegalense</i>	JC43 ^T	Human associated	PRJEA82613	CAHK01000001- CAHK01000070	Permanent draft	Kokcha et al., 2012 [94]

^aThe "*Brevibacterium linens* BL2" genome in the JGI database is in fact the genome of strain ATCC 9174 [95]

Additional files

Additional file 1. Genome statistics

General features of the *Brevibacterium* genomes.

Species	Strain	Source	No. of contigs	Size (base pairs)	Contig N50 ^a	GC%	No. of genes	No. of CDS	No. of rRNAs	No. of tRNAs	No. of complete prophage region ^b	No. of CRISPRs candidates ^c
<i>B. antiquum</i>	CNRZ 918	Cheese	49	3,748,145	282,237	62.7	3,465	3,396	12	49	0	1
<i>B. antiquum</i>	P10	Cheese	59	3,870,232	242,858	62.2	3,567	3,499	9	49	0	4
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9175 ^T	Cheese	70	4,147,494	146,115	62.7	3,833	3,771	6	49	0	0
<i>B. aurantiacum</i>	CNRZ 920	Cheese	73	3,991,882	153,090	62.9	3,675	3,611	6	49	0	0
<i>B. aurantiacum</i>	6(3)	Cheese	91	4,162,132	280,112	62.8	3,880	3,814	8	49	0	1
<i>B. aurantiacum</i>	8(6)	Cheese	97	4,455,163	236,678	62.9	4,154	4,091	7	50	0	1
<i>B. casei</i>	CIP 102111 ^T	Cheese	24	3,840,753	616,578	68.0	3,484	3,425	7	46	0	4
<i>B. linens</i>	ATCC 9172 ^T	Cheese	80	3,959,351	154,154	64.7	3,583	3,518	7	48	0	5
<i>B. linens</i>	Mu101	Cheese	81	3,920,172	109,364	64.7	3,560	3,496	8	47	0	5
<i>B. sp.</i>	239c	Cheese	68	4,383,442	152,233	62.1	4,110	4,040	12	52	0	1
<i>B. sp.</i>	Mu109	Cheese	126	3,753,720	133,767	68.1	3,395	3,336	6	48	1	4
<i>B. iodinum</i>	ATCC 49514 ^T	Milk	65	3,535,928	114,559	64.5	3,247	3,191	4	47	0	6
<i>B. jeotgali</i>	SJ5-8 ^T	Seafood	47	3,297,707	187,216	68.3	2,994	2,935	6	46	0	0
<i>B. aurantiacum</i>	ATCC 9174	Cheese	79	4,366,969	80,644	62.8	3,833	3,777	9	47	0	1
<i>B. album</i>	DSM 18261 ^T	Soil	16	4,094,970	545,561	70.9	3,633	3,559	9	59	0	11
<i>B. sandarakinum</i>	DSM 22082 ^T	Wall surface	1	4,440,957	-	63.3	4,113	4,050	9	49	0	1
<i>B. linens</i>	AE038-8	Fresh water	29	3,846,451	327,143	64.2	3,495	3,434	7	48	0	5
<i>B. siliguriense</i>	DSM 23676 ^T	Fresh water	1	4,022,983	-	64.2	3,632	3,569	12	47	0	0
<i>B. sp.</i>	VCM10	Fresh water	141	3,863,615	87,565	65.0	3,477	3,426	3	44	0	6
<i>B. casei</i>	S18	Human associated	43	3,663,872	229,201	68.1	3,290	3,231	6	46	0	8
<i>B. ravenspurgense</i>	5401308 ^T	Human associated	26	2,349,262	266,120	62.3	2,168	2,119	3	43	0	6
<i>B. mcbrellneri</i>	ATCC 49030 ^T	Human associated	96	2,561,804	85,492	58.0	2,489	2,432	8	46	0	1
<i>B. senegalense</i>	JC43 ^T	Human associated	70	3,398,858	108,267	70.0	3,134	3,080	3	46	0	5

^aN50 is the length of N for which 50% of all bases are in contigs of length < N

^bAs determined using PHASTER (only complete prophage regions are recorded)

^cAs determined using CRISPRFinder (both confirmed and questionable CRISPRs are recorded)

Additional file 2. 16S-ANI

Additional file 2.1. rrs gene sequence identity between the 23 Brevibacterium strains. Values greater than or equal to 98% are colored in green.

	ATCC 9175 ^T	CNRZ 920	ATCC 9174	6(3)	8(6)	CNRZ 918	P10	239c	DSM 22082 ^T	ATCC 9172 ^T	Mu101	VCM10	ATCC 49514 ^T	AE038-8	DSM 23676 ^T	CIP 102111 ^T	S18	Mu109	SJ5-8 ^T	DSM 18261 ^T	JC43 ^T	5401308 ^T	ATCC 49030 ^T	
ATCC 9175 ^T		99.87	99.09	99.67	99.74	99.06	98.06	99.59	98.19	97.15	97.24	96.96	96.50	96.37	97.01	97.36	97.74	94.42	94.35	94.21	94.07	94.92	93.37	
CNRZ 920			99.02	99.80	99.74	99.13	98.12	99.51	98.12	97.02	97.10	96.89	96.37	96.31	96.88	97.30	97.66	94.42	94.41	94.21	94.07	94.77	93.37	
ATCC 9174				99.22	99.22	98.98	97.73	99.35	97.48	96.63	96.69	96.47	96.05	96.43	96.94	97.50	97.74	94.48	94.67	93.72	94.28	94.77	93.32	
6(3)					99.93	99.06	98.06	99.27	97.99	97.02	97.10	96.89	96.37	96.31	96.88	97.30	97.66	94.61	94.61	94.07	94.14	94.84	93.37	
8(6)						99.06	98.06	99.27	97.99	97.09	97.17	96.89	96.44	96.31	96.94	97.30	97.66	94.55	94.54	94.00	94.07	94.92	93.31	
CNRZ 918							100.00	99.03	98.27	96.71	96.71	97.07	96.47	96.78	96.93	97.66	97.64	94.73	94.73	94.72	94.64	94.88	93.86	
P10								99.03	97.29	95.93	96.23	96.26	95.74	95.92	95.85	96.54	97.64	94.23	93.77	94.08	93.94	93.88	92.87	
239c									99.11	97.57	97.57	97.63	97.33	97.33	97.33	97.89	97.88	95.14	95.06	94.94	95.11	95.27	94.40	
DSM 22082 ^T										97.15	97.25	96.82	96.57	96.25	96.57	96.68	97.16	94.12	94.12	94.28	94.02	94.57	92.89	
ATCC 9172 ^T											100.00	99.43	98.96	98.57	98.63	97.36	98.37	94.03	94.10	93.99	94.19	94.68	93.78	
Mu101												99.78	99.24	98.89	98.55	97.33	98.37	94.34	94.14	94.40	94.62	94.77	93.91	
VCM10													99.29	98.72	98.44	97.38	98.37	94.34	93.98	94.20	94.12	94.40	93.92	
ATCC 49514 ^T														98.89	98.50	97.35	98.61	93.71	93.51	93.84	93.62	94.18	93.71	
AE038-8															99.22	97.56	98.46	94.47	94.01	93.93	94.33	94.46	93.88	
DSM 23676 ^T																97.98	98.55	94.26	94.53	93.86	94.40	94.96	94.21	
CIP 102111 ^T																	99.92	93.82	94.16	93.36	93.98	94.61	94.32	
S18																		94.29	94.45	94.23	94.44	94.91	95.16	
Mu109																				98.89	97.24	98.65	95.55	94.35
SJ5-8 ^T																					96.54	98.65	95.34	94.21
DSM 18261 ^T																						97.04	94.71	93.58
JC43 ^T																							95.76	94.13
5401308 ^T																								95.82
ATCC 49030 ^T																								

Additional file 2.2. Average Nucleotide Identity (ANI) values between the 23 *Brevibacterium* strains. Values greater than or equal to 95% are colored in green.

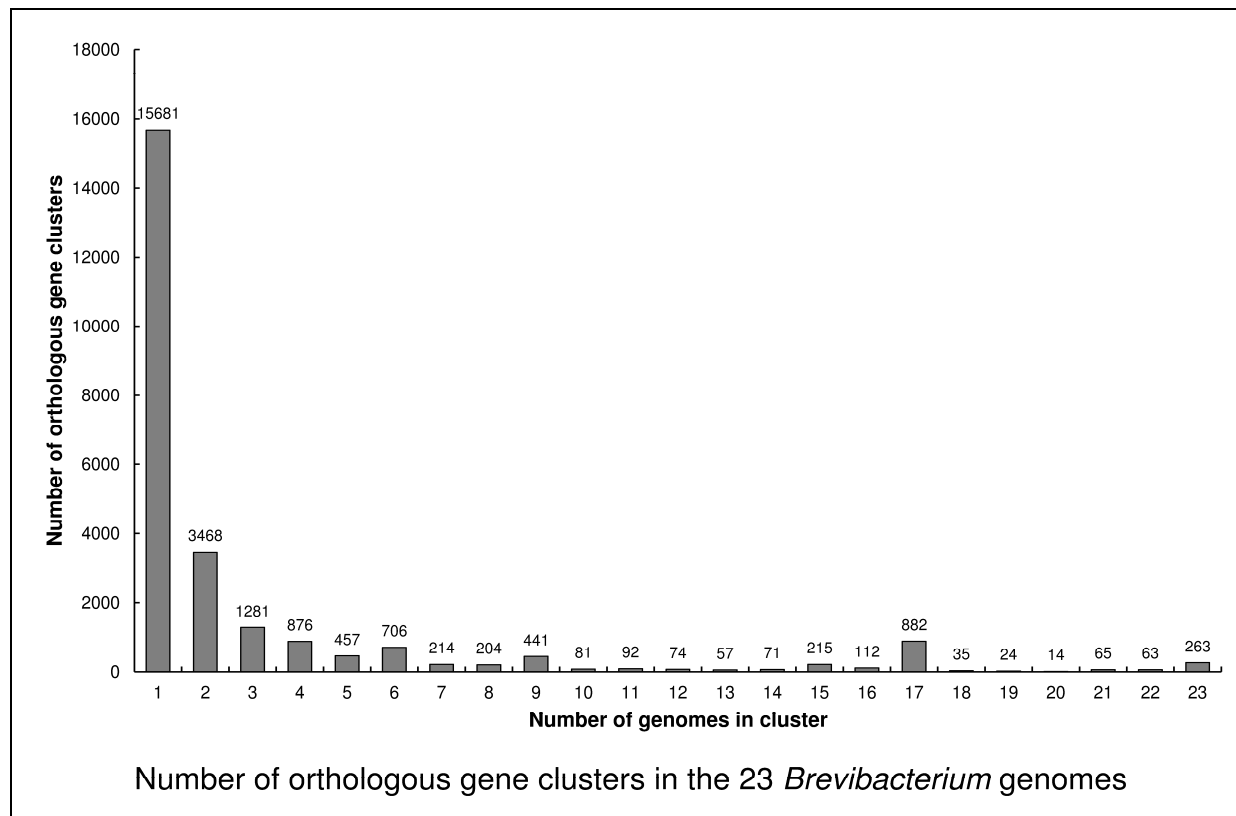
	ATCC 9175 ^T	CNRZ 920	ATCC 9174	6(3)	8(6)	CNRZ 918	P10	239c	DSM 22082 ^T	ATCC 9172 ^T	Mu101	VCM10	ATCC 49514 ^T	AE038-8	DSM 23676 ^T	CIP 102111 ^T	S18	Mu109	SJ5-8 ^T	DSM 18261 ^T	JC43 ^T	5401308 ^T	ATCC 49030 ^T	
ATCC 9175 ^T		97.87	97.97	97.97	97.85	89.54	89.80	88.06	88.57	84.47	84.35	84.00	84.09	83.81	83.70	83.02	82.97	81.35	79.70	79.56	79.64	79.46	79.77	
CNRZ 920			97.48	98.04	97.82	89.48	89.58	88.34	88.34	84.37	84.37	84.00	84.32	84.11	83.83	83.02	83.04	80.45	79.84	79.44	79.67	79.37	79.29	
ATCC 9174				97.48	97.71	89.83	90.06	88.00	88.58	85.50	84.86	84.11	84.32	83.84	83.73	82.98	83.00	81.11	79.72	79.58	79.65	79.60	79.81	
6(3)					98.03	89.69	89.72	88.16	88.25	84.37	84.44	84.00	84.23	83.90	83.84	82.99	82.98	81.57	79.67	79.47	79.51	79.44	79.54	
8(6)						89.46	89.60	88.31	88.39	84.33	84.41	83.95	84.30	83.94	83.82	83.00	83.02	81.69	80.06	79.49	79.68	79.42	79.48	
CNRZ 918							98.30	88.64	88.26	84.88	83.74	83.33	83.62	83.36	83.22	82.86	82.83	80.44	79.65	79.35	79.99	79.43	79.86	
P10								88.61	88.37	85.13	83.94	83.42	83.67	83.49	83.24	82.96	82.85	80.46	79.45	79.51	79.28	79.25	79.72	
239c									87.67	83.60	83.59	83.20	83.35	83.22	83.11	82.59	82.55	79.42	79.08	79.54	80.03	79.19	79.55	
DSM 22082 ^T										83.58	83.56	83.57	83.62	83.45	83.32	83.17	83.11	80.01	79.56	79.57	79.62	79.74	79.56	
ATCC 9172 ^T											98.53	96.35	92.08	91.22	90.93	83.59	83.64	80.79	80.25	80.29	80.23	80.18	80.24	
Mu101												96.42	92.03	91.27	90.95	83.61	83.70	80.95	80.20	80.28	80.01	80.14	80.59	
VCM10													91.78	91.29	90.89	83.62	83.62	80.13	80.06	80.28	80.35	79.94	79.74	
ATCC 49514 ^T														91.52	90.98	83.67	83.63	80.56	80.26	80.21	79.93	80.30	81.30	
AE038-8															91.67	83.51	83.57	80.13	79.96	80.23	80.09	80.28	79.22	
DSM 23676 ^T																83.44	83.48	80.02	79.89	80.09	79.96	80.06	80.03	
CIP 102111 ^T																	98.22	81.19	80.63	81.03	80.95	80.12	79.97	
S18																		81.20	80.88	81.11	80.93	80.24	80.75	
Mu109																				90.72	82.33	84.53	79.86	78.51
SJ5-8 ^T																					81.89	83.91	79.66	78.77
DSM 18261 ^T																						82.68	79.88	79.59
JC43 ^T																							80.23	79.78
5401308 ^T																								81.91
ATCC 49030 ^T																								

Additional file 3. Orthology

This additional file is the list of 25,376 orthologous gene clusters in the 23 *Brevibacterium* genomes. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 4. Orthology



Additional file 5. Galactose-galactonate-lactate-acetate-ethanol-citrate

Additional file 5.1.1. Presence of genes with a putative function in D-galactose and D-galactonate catabolism (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	Strain ^a EC number	Strains																						
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeorgali</i> S15-8*	<i>B. mchreliheri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturgense</i> 5401308*
D-galactose catabolism (Leloir pathway)	aldose 1-epimerase	<i>galM</i>	5.1.3.3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
	UDP-galactose 4-epimerase	<i>galE</i>	5.1.3.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	galactokinase	<i>galK</i>	2.7.1.6	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	UDP-glucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>galT</i>	2.7.7.12	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
D-galactonate catabolism	transcriptional regulator, IclR family			1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	<i>dgoK</i>	4.1.2.21	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	<i>dgoA</i>	2.7.1.58	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	galactonate dehydratase	<i>dgoD</i>	4.2.1.6	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0
	Putative D-galactonate transporter	<i>dgoT</i>		1	1	0	0	2	0	2	0	1	1	2	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 5.1.2. Presence of genes with a putative function in D-galactose and D-galactonate catabolism (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 5.2.1. Presence of genes with a putative function in lactate catabolism (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Function	Function category	Strain ^a Predicted protein product	Strain ^a																							
			<i>B. aurantiacum</i> 8 (6)	<i>B. aurantiacum</i> 6 (3)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodium</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AEO38-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mchreliheri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturgense</i> 5401308*	
Lactate transporter		Lactate permease	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lactate dehydrogenase (LDH)	NAD-dependent (nLDH)	NAD-dependent L-LDH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
	NAD-independent (iLDH)	quinone-dependent D-iLDH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		quinone-dependent L-iLDH	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	3	2	2	1	1	0	1	0	0	1	1
		Dld II-type quinone/cytochrome -dependent D-iLDH	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1		
quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1		

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 5.2.2. Presence of genes with a putative function in lactate catabolism (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 5.3.1. Presence of genes with a putative function in acetate catabolism (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Strain ^a	<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodium</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravenburgense</i> 5401308*
Predicted protein product																							
monocarboxylic acid transporter MctC	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0	0	0
acetyl-CoA synthase ^b	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bProtein matching to the TIGR protein family HMM TIGR02188

Additional file 5.3.2. Presence of genes with a putative function in acetate catabolism (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 5.4.1. Presence of genes with a putative function in ethanol catabolism (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Predicted protein product	Strain ^a	COG ID																																														
		<i>B. aurantiacum</i> 8(6)						<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*					<i>B. sp.</i> 239c			<i>B. antiquum</i> P10			<i>B. antiquum</i> CNRZ 918			<i>B. iodium</i> ATCC 49514*			<i>B. sp.</i> AE038-8		<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*		<i>B. linens</i> VCM10		<i>B. linens</i> ATCC 9172*		<i>B. linens</i> Mu101		<i>B. casei</i> CIP 102111*		<i>B. casei</i> S18		<i>B. album</i> DSM 18261*		<i>B. senegalense</i> JC43*		<i>B. sp.</i> Mu109		<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*		<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030*	
NAD-dependent aldehyde dehydrogenase	COG1012	19	19	19	18	20	24	20	17	18	17	19	27	31	20	21	21	21	20	10	12	15	8	9																								
Zn-dependent alcohol dehydrogenase	COG1064	3	2	4	3	3	4	4	4	4	4	3	4	6	3	3	3	3	7	7	9	7	1	1																								

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 5.4.2. Presence of genes with a putative function in ethanol catabolism (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 5.5.1. Presence of genes with a putative function in citrate import (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Predicted protein product	Strain ^a	TC number																						
		Group aurantiacum/sandarakinum/antiquum						Group linens/siliguriense/iodinum				Group casei		Other strains										
citrate-Mg ²⁺ :H ⁺ or citrate-Ca ²⁺ :H ⁺ symporter, CitMHS family	2.A.11	2	1	1	1	1	2	1	0	0	1	2	2	3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
Na ⁺ /citrate or Na ⁺ /malate symporter, 2-HCT family	2.A.24	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 5.5.2. Presence of genes with a putative function in citrate import (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 6. Lipid-glycerol

Additional file 6.1.1. Presence of genes with a putative function in lipid and glycerol catabolism (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Function / Pathway	Function category	Predicted protein product	Strain ^a EC number or TC number or KO term	Strains																						
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravenspurgense</i> 5401308*
Lipase / Esterase	Secreted ^b lipase/esterase	triacylglycerol lipase	EC 3.1.1.3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
		glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	EC 3.1.4.46	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	Non-secreted lipase/esterase	putative lipase/esterase		30	32	28	31	28	33	35	23	24	27	27	26	28	25	23	31	31	28	23	24	26	8	15
Fatty acid transporter		short-chain fatty acids transporter	TC 2.A.73	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	5	4	1	2
beta-oxidation	acyl-CoA synthesis ^c	acyl-CoA synthetase	K01897	4	4	3	5	3	2	5	2	3	4	3	3	3	2	2	3	3	9	7	11	9	6	2
	beta-oxidation ^d	acyl-CoA dehydrogenase	K00232 / K00249 / K00255	4	5	5	7	4	10	7	6	7	5	6	8	6	5	5	5	5	12	11	11	12	5	3
		enoyl-CoA hydratase	K01692	3	3	3	3	3	6	4	3	3	3	4	3	3	3	3	3	3	8	5	5	5	6	2
		enoyl-CoA hydratase /3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	K01782	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
		3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	K07516	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
	3-ketoacyl-CoA thiolase	K00632	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	0	
Methylcitrate cycle		2-methylcitrate synthase	EC 2.3.3.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		2-methylcitrate dehydratase	EC 4.2.1.79	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
		2-methylisocitrate lyase	EC 4.1.3.30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Glycerol catabolism	aerobic pathway	glycerol kinase	EC 2.7.1.30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		glycerol-3-phosphate dehydrogenase	EC 1.1.5.3	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	anaerobic pathway	glycerol dehydrogenase	EC 1.1.1.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
		dihydroxyacetone kinase	EC 2.7.1.29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bPutative signal sequences were computed by the Integrated Microbial Genomes (IMG) database using SignalP

^cAssignments based on KEGG Orthology http://www.genome.jp/kegg-bin/show_module?M00086

^dAssignments based on KEGG Orthology http://www.genome.jp/kegg-bin/show_module?M00087

Additional file 6.1.2. Presence of genes with a putative function in lipid and glycerol catabolism (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 6.2. Abundance of AtoE genes (TC n°2.A.73). Assignments were done according to COG group n°2031, using the Integrated Microbial Genomes (IMG) system.

Function	Strain ^a																<i>Brevibacterium</i> ^b	<i>Actinobacteria</i> ^c								
	COG group	<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandaracinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp. 239c</i>	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp. AE038-8</i>	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*			<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp. Mu109</i>	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravenispurgense</i> 5401308*	
Short chain fatty acids transporter	COG2031	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	5	4	1	2		1.6	0.1

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandaracinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bMean values obtained for the 23 *Brevibacterium* strains investigated in the present study

^cMean values obtained for the 5726 genomes belonging to the class *Actinobacteria* present in the IMG database (Apr. 2017)

Additional file 7.1.2. Presence of putative excreted proteases/peptidases (the IMG locus tags are indicated for each MEROPS family of proteins; the genes with a LPXTG cell wall anchor domain are underlined; contiguous genes are in bold).

This file can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 7.2.1. Presence of genes involved in amino acid and 4-aminobutyrate degradation pathways (the number of predicted genes is indicated for each protein) (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	Strain ^a EC number																										
				B. aurantiacum 8(6)	B. aurantiacum CNRZ 920	B. aurantiacum 6(3)	B. aurantiacum ATCC 9174	B. aurantiacum ATCC 9175*	B. sandarakinum DSM 22082*	B. sp. 239c	B. antiquum CNRZ 918	B. antiquum P10	B. iodinum ATCC 49514*	B. sp. AEO38-8	B. siliguriense DSM 23676*	B. linens VCM10	B. linens ATCC 9172*	B. linens Mu101	B. casei CIP 102111*	B. casei S18	B. album DSM 18261*	B. senegalense JG43*	B. sp. Mu109	B. jeotgali SJ5-8*	B. mchreliheri ATCC 49030*	B. rovenspurgense 5401308*			
Proline degradation via PutA	bifunctional proline dehydrogenase / L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	<i>putA</i>	1.5.5.2 / 1.2.1.88	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Glutamate degradation via glutamate dehydrogenase	NAD-specific glutamate dehydrogenase		1.4.1.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Arginine degradation via arginine decarboxylase	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0		
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Serine degradation via L-serine ammonia-lyase	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Alanine degradation via alanine dehydrogenase	L-alanine dehydrogenase	<i>ald</i>	1.4.1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0		
Phenylalanine degradation via phenylacetyl-CoA ligase	phenylacetyl-CoA ligase	<i>paaK</i>	6.2.1.30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA	<i>paaA</i>	1.14.13.149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaB	<i>paaB</i>	1.14.13.149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaC	<i>paaC</i>	1.14.13.149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaD	<i>paaD</i>	1.14.13.149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaE	<i>paaE</i>	1.14.13.149	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerase	<i>paaG</i>	5.3.3.18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	oxepin-CoA hydrolase / 3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA semialdehyde dehydrogenase	<i>paaZ</i>	3.3.2.12 / 1.2.1.91	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase / 3-oxoadipyl-CoA thiolase PaaJ	<i>paaJ</i>	2.3.1.223 / 2.3.1.174	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	<i>paaF</i>	4.2.1.17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>	1.1.1.35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
	Phenylacetic acid degradation protein PaaI, thioesterase	<i>paaI</i>	3.1.2.-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandaracinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 7.2.1. Presence of genes involved in amino acid and 4-aminobutyrate degradation pathways (the number of predicted genes is indicated for each protein) (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	Strain ^a EC number	Strains																							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodium</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AEO38-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JG43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mchrelheri</i> ATCC 49030*	<i>B. rrvenspurgense</i> 5401308*	
Threonine degradation via threonine aldolase	L-threonine aldolase	<i>itaE</i>	4.1.2.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Threonine degradation via threonine dehydratase	threonine dehydratase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Methionine degradation via methionine gamma-lyase	L-methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tyrosine degradation via the homoprotocatechuate pathway	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	<i>hpaD</i>	1.13.11.15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2-hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde dehydrogenase	<i>hpaE</i>	1.2.1.60	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	putative homoprotocatechuate catabolism bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaFG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2-hydroxyhepta-2,4-dienedioate hydratase	<i>hpaH</i>	4.2.1.163	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	4-hydroxy-2-ketopimelate aldolase	<i>hpaI</i>	4.1.2.52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	NAD(P) ⁺ -dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Histidine degradation via histidine ammonia-lyase	Histidine ammonia-lyase	<i>hutH</i>	4.3.1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	Urocanate hydratase	<i>hutU</i>	4.2.1.49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	imidazolonepropionase	<i>hutI</i>	3.5.2.7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	formimidoylglutamate deiminase	<i>hutF</i>	3.5.3.13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	putative N-formylglutamate deformylase	<i>hutG</i>	3.5.1.68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4-aminobutyrate (GABA) degradation	4-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	2.6.1.19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	NAD(P)-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 7.2.2. Presence of genes involved in amino acid and 4-aminobutyrate degradation pathways (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 8. Iron

Additional file 8.1.1. Presence of genes with a putative function in iron acquisition (the number of predicted genes is indicated for each protein) (1/2).

Function	Function category	Predicted protein product	Strain ^a EC number	Strains																							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodium</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeorigali</i> S15-8*	<i>B. mbravelneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturnense</i> 5401308*	
Siderophore biosynthesis and utilization	hydroxamate-type siderophore biosynthesis	lysine N6-hydroxylase	1.14.13.59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
		L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase	4.1.1.86	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Siderophore synthetase component		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
		lysine decarboxylase	4.1.1.18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
	catecholate or mixed catecholate/hydroxamate siderophore biosynthesis	non-ribosomal siderophore peptide synthetase component			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
		Glycosyltransferase IroB			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	1.3.1.28		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		isochorismate synthase	5.4.4.2		1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	2.7.7.58		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		isochorismatase	3.3.2.1		0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		putative transferase component of siderophore synthetase			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		4'-phosphopantetheinyl transferase EntD			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	MbtH protein			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	L-ornithine N5-oxygenase	1.14.13.195		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
isochorismate pyruvate lyase	4.2.99.21		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
siderophore exporter	Putative siderophore exporter			0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Fe3+/siderophore transporter	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component	3.6.3.34		7	6	7	5	5	3	4	2	3	3	3	3	4	3	3	4	4	4	2	8	3	4	4	
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			11	10	9	9	9	5	6	4	6	5	5	6	5	5	5	7	7	9	4	14	5	5	7	
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			12	11	12	7	10	5	9	6	7	8	7	6	8	7	7	8	8	5	3	9	3	4	4	
iron release from siderophores	siderophore interacting protein			5	6	8	3	4	3	4	2	2	5	4	3	2	2	3	3	3	4	3	7	3	1	2	

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 8.1.1. Presence of genes with a putative function in iron acquisition (the number of predicted genes is indicated for each protein) (2/2).

Function	Function category	Predicted protein product	Strain ^a EC number																								
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mui101	<i>B. casei</i> CP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mui109	<i>B. jeorjali</i> SI5-8*	<i>B. mchelleri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravenstrupense</i> 5401308*	
Siderophore-independent iron transport	Mn ²⁺ /Fe ²⁺ transporter	Mn ²⁺ /Fe ²⁺ transporter		5	5	5	5	6	7	5	4	4	5	4	5	8	6	5	7	6	4	4	3	3	2	3	
	Fe ²⁺ /Fe ³⁺ transporter	iron uptake system component EfeU		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
		iron uptake system component EfeO		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
		deferrochelatase/peroxidase EfeB		0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	
ABC-type iron transporter	Putative ATPase component of ABC-type iron transport system Putative permease component of ABC-type iron transport system Putative substrate binding component of ABC-type iron transport system	3.6.3.30		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
				0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 8.1.2. Presence of genes with a putative function in iron acquisition (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 8.2. Hydroxamate gene clusters

This additional file is the schema of hydroxamate-type siderophore biosynthesis gene clusters in 15 *Brevibacterium* strains. It can be found online at:

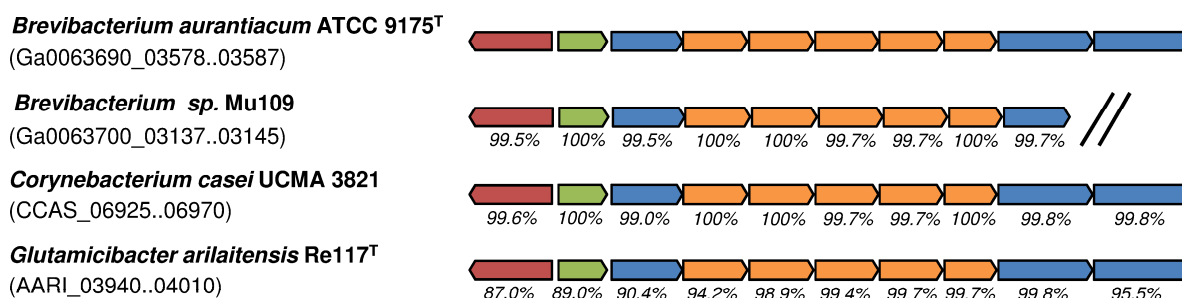
<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 8.3. Catecholate gene clusters

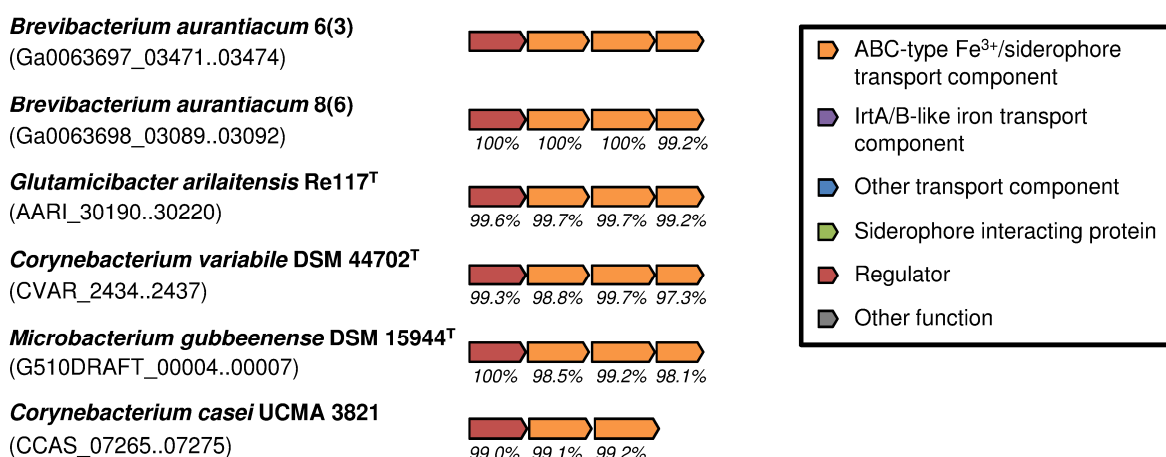
This additional file is the schema of catecholate-type siderophore biosynthesis gene clusters in *B. sp.* Mu109 and *B. aurantiacum* ATCC 9174. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

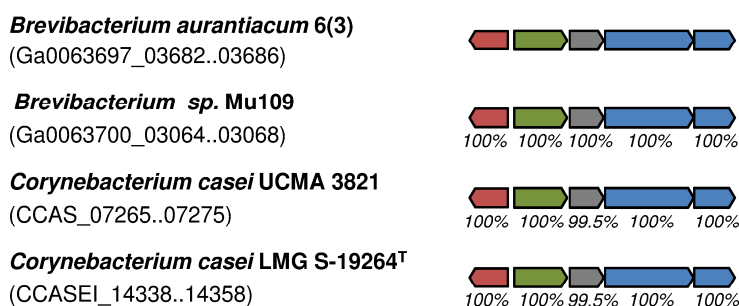
A. Cluster Iron-Brev1 (= ActinoRUSTI)



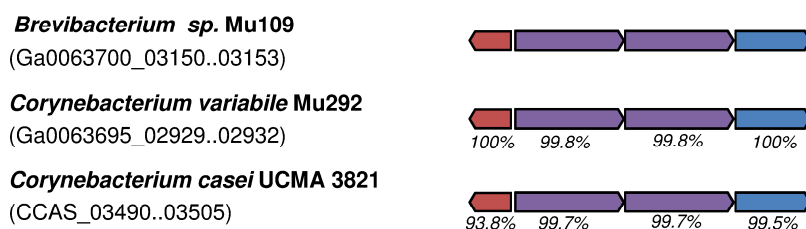
B. Cluster Iron-Brev2



C. Cluster Iron-Brev3



D. Cluster Iron-Brev4



Gene clusters shared between *Brevibacterium* strains isolated from cheeses and cheese-associated strains belonging to other genera. Gene locus tags are indicated in parentheses, percentages of amino acid identity are indicated in italics.

Additional file 10. Osmotolerance

Additional file 10.1.1. Presence of genes with a putative function in osmoprotectant biosynthesis (the number of predicted genes is indicated for each protein).

Osmoprotectant	Predicted protein product	Gene symbol	Strain ^a EC number	Strains																							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AEO38-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JCA3*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbreliheri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturnense</i> 5401308*	
Ectoine	aspartate kinase		2.7.2.4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	aspartate semialdehyde dehydrogenase		1.2.1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	diaminobutyrate aminotransferase	<i>ectB</i>	2.6.1.76	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
	diaminobutyrate acetyltransferase	<i>ectA</i>	2.3.1.178	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	
	ectoine synthase	<i>ectC</i>	4.2.1.108	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	
	ectoine dioxygenase	<i>ectD</i>		1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
	Glycine-betaine	choline dehydrogenase		1.1.99.1	1	2	1	1	1	3	2	1	0	0	0	2	3	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
betaine-aldehyde dehydrogenase			1.2.1.8	3	4	3	3	3	4	3	3	3	2	2	2	5	2	2	3	3	4	3	3	3	1	1	
choline oxidase			1.1.3.17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	
Trehalose	Predicted trehalose synthase		5.4.99.16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	trehalose 6-phosphate synthase		2.4.1.15	1	1	1	1	3	1	1	1	1	2	3	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
	trehalose 6-phosphate phosphatase		3.1.3.12	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

Additional file 10.1.2. Presence of genes with a putative function in osmoprotectant biosynthesis (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 10.2. Abundance of osmolyte transporter genes. Assignments were done according to COG group or Pfam domain, using the Integrated Microbial Genomes (IMG) system.

Function	Strain ^a COG group or Pfam domain	<i>Brevibacterium</i> ^b											<i>Actinobacteria</i> ^c														
		<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp. 239c</i>	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp. AE038-8</i>	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp. Mu109</i>	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbrellneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturnense</i> 5401308*			
betaine/carnitine/choline transporters (BCCT)	COG1292	7	7	7	8	8	7	8	8	8	8	8	7	7	6	6	5	5	6	5	4	6	6	2	3	6.3	1.1
Multiple resistance and pH adaptation antiporters (Mrp systems) ^d	COG1006	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2.0	0.5
Sodium Solute Symporters (SSS)	PF00474	9	10	8	9	8	9	11	5	6	5	8	10	7	6	7	6	6	11	8	10	7	1	2	7.3	1.7	
Na ⁺ /H ⁺ antiporters	COG0025, 1055, 1757, 3004, 3067, 3263	7	6	6	4	5	4	5	4	4	6	4	5	6	5	6	4	4	3	0	0	0	2	0	3.9	4.0	
ABC-type proline/glycine betaine transport systems	COG1125, 4175, 1174, 4176, 1732, 2113	3	3	3	3	3	11	9	3	3	4	4	7	3	3	3	3	3	9	10	4	11	0	3	4.7	6.1	

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandarakinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bMean values obtained for the 23 *Brevibacterium* strains investigated in the present study

^cMean values obtained for the 5726 genomes belonging to the class *Actinobacteria* present in the IMG database (Apr. 2017)

^dEstimated by the abundance in MnhC subunits

Additional file 11. Bacteriocines

Additional file 11.1.1. Presence of genes with a putative function in bacteriocin biosynthesis (the number of predicted genes is indicated for each protein) (1/2).

Bacteriocin group	Bacteriocin subgroup	Predicted protein product	Strain ^a Pfam	Strains																							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> 6(3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandarakinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodinum</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AE038-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jejuensis</i> S15-8*	<i>B. mchrelii</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturnensis</i> 5401308*	<i>C. casei</i> LMG S-19264 ^b
Antimicrobial protein	Linocin M18-related	Uncharacterized protein, linocin/CFP29 family	PF04454	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	
RIPPs ^c	Lanthipeptide	Class III lanthipeptide synthetase	PF05147, PF00069	0	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
		Lanthipeptide precursor peptide		0	2	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
		ABC transport system components	PF00005, PF02687, PF00664	0	1	0	2	0	0	0	3	3	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3
		Prolyl oligopeptidase	PF00326	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	Lactococcin 972-related	Lactococcin 972-related precursor peptide	PF09683	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothetical immunity protein		2	2	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ABC transport system ATP-binding protein	PF00005	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Linear azol(in)e-containing peptides (LAPs)	LAP precursor peptide		2	0	6	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		SagB-type dehydrogenase domain-containing protein	PF00881	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		YcaO cyclodehydratase	PF02624	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cyclodehydratase-docking protein fused protein			1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Methyltransferase domain-containing protein		PF08241	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
ABC transport system components	PF00005, PF00664	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group *aurantiacum*/*sandarakinum*/*antiquum*; in blue: group *linens*/*siliguriense*/*iodinum*; in purple: group *casei*; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bIn *Corynebacterium casei* LMG S-19264, only the lanthipeptide genes present in the BreLI Island are listed

^cRibosomally synthesized and post-translationally modified peptides

Additional file 11.1.1. Presence of genes with a putative function in bacteriocin biosynthesis (the number of predicted genes is indicated for each protein) (2/2).

Bacteriocin group	Bacteriocin subgroup	Predicted protein product	Strain ^a Pfam	Strains																							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> CNRZ 920	<i>B. aurantiacum</i> (3)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9174	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175*	<i>B. sandaracinum</i> DSM 22082*	<i>B. sp.</i> 239c	<i>B. antiquum</i> CNRZ 918	<i>B. antiquum</i> P10	<i>B. iodium</i> ATCC 49514*	<i>B. sp.</i> AEO38-8	<i>B. siliguriense</i> DSM 23676*	<i>B. linens</i> VCM10	<i>B. linens</i> ATCC 9172*	<i>B. linens</i> Mu101	<i>B. casei</i> CIP 102111*	<i>B. casei</i> S18	<i>B. album</i> DSM 18261*	<i>B. senegalense</i> JC43*	<i>B. sp.</i> Mu109	<i>B. jeotgali</i> SJ5-8*	<i>B. mcbreilneri</i> ATCC 49030*	<i>B. ravensturgense</i> 5401308*	<i>C. casei</i> LMG S-19264 ^b
RiPPs ^c	Linaridin	Linaridin precursor peptide		1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Alpha/beta hydrolase family protein, cypH homolog	PF12697	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Hypothetical protein, cypL homolog		1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Flavoprotein, cypD homolog	PF02441	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ABC transport system ATPase component, cypT homolog	PF00005	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Sporulation delaying protein (SDP)-related	antimicrobial peptide, SdpC family		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		antimicrobial peptide system protein, SdpA family		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		antimicrobial peptide system protein, SdpB family		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

^a*Brevibacterium* strains are colored according to their phylogenetic groups. In green: group aurantiacum/sandaracinum/antiquum; in blue: group linens/siliguriense/iodinum; in purple: group casei; in red: the other strains. Strains isolated from cheese are in bold; type strains are marked with an asterisk

^bIn *Corynebacterium casei* LMG S-19264, only the lanthipeptide genes present in the BreLI Island are listed

^cRibosomally synthesized and post-translationally modified peptides

Additional file 11.1.2. Presence of genes with a putative function in bacteriocin biosynthesis (the IMG locus tags are indicated for each protein).

This file can be found online at: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 11.2. BreLI Island

This additional file is the schema of the BreLI Island in *B. antiquum* P10, *B. antiquum* CNRZ 918, *B. linens* ATCC 9172^T, *B. aurantiacum* ATCC 9174 and *Corynebacterium casei* LMG S-19264. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 11.3. Lactococcin 972-related

This additional file is the schema of lactococcin 972-related bacteriocin gene clusters in five *B. aurantiacum* strains (8(6), 6(3), CNRZ 920, ATCC 9174 and ATCC 9175^T), *B. sp.* 239c and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 972 plasmid pBL1. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 11.4. LAP

This additional file is the schema of linear azol(in)e-containing peptides (LAPs) gene clusters in *B. aurantiacum* 6(3), *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, *B. aurantiacum* ATCC 9174 and *B. aurantiacum* 8(6). It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 11.5. Linaridin

This additional file is the schema of linaridin gene clusters in *B. aurantiacum* 8(6), *B. sp.* 239c and *Streptomyces sp.* OH-4156. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

Additional file 11.6. SDP-related

This additional file is the schema of sporulation delaying protein (SDP)-related gene clusters in *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, *B. aurantiacum* 6(3) and *B. aurantiacum* CNRZ 920. It can be found online at:

<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>

References

1. Bockelmann W. Secondary Cheese Starter Cultures. In: Law BA, Tamime AY, editors. Technol. Cheesemaking Second Ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010. p. 193–230.
2. Irlinger F, Layec S, Hélinck S, Dugat-Bony E. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. FEMS Microbiol. Lett. 2015;362:1–11.
3. Monnet C, Landaud S, Bonnarne P, Swennen D. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. FEMS Microbiol. Lett. 2015;362:1–9.
4. Brennan NM, Ward AC, Beresford TP, Fox PF, Goodfellow M, Cogan TM. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. Appl. Environ. Microbiol. 2002;68:820–30.
5. Feurer C, Vallaëys T, Corrieu G, Irlinger F. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a French soft, red-smear cheese? J. Dairy Sci. 2004;87:3189–97.
6. Goerges S, Mounier J, Rea MC, Gelsomino R, Heise V, Beduhn R, et al. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South German red smear cheese. Appl. Environ. Microbiol. 2008;74:2210–7.
7. Gori K, Ryssel M, Arneborg N, Jespersen L. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. Microb. Ecol. 2013;65:602–15.
8. Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, et al. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. Appl. Environ. Microbiol. 2005;71:6489–500.
9. Rea MC, Görges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, et al. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. J. Dairy Sci. 2007;90:2200–10.
10. Rattray FP, Fox PF. Aspects of enzymology and biochemical properties of *Brevibacterium linens* relevant to cheese ripening: a review. J. Dairy Sci. 1999;82:891–909.
11. Forquin-Gomez M-P, Weimer BC, Sorieul L, Kalinowski J, Vallaëys T. The Family *Brevibacteriaceae*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. Prokaryotes Actinobacteria 4th Ed. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 141–53.
12. Onraedt A, Soetaert W, Vandamme E. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. Biotechnol. Lett. 2005;27:527–33.
13. Gavrish EI, Krauzova VI, Potekhina NV, Karasev SG, Plotnikova EG, Altyntseva OV, et al. Three new species of brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov. and *Brevibacterium permense* sp. nov. Mikrobiologiya. 2004;73:218–25.
14. Montel M-C, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, et al. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. Int. J. Food Microbiol. 2014;177:136–54.
15. Schröder J, Maus I, Trost E, Tauch A. Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. BMC Genomics. 2011;12:545.

16. Monnet C, Loux V, Gibrat J-F, Spinnler E, Barbe V, Vacherie B, et al. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PloS One*. 2010;5:e15489.
17. Bonham KS, Wolfe BE, Dutton RJ. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. *eLife*. 2017;6.
18. Markowitz VM, Chen I-MA, Chu K, Pati A, Ivanova NN, Kyrpides NC. Ten years of maintaining and expanding a microbial genome and metagenome analysis system. *Trends Microbiol*. 2015;23:730–41.
19. Magoč T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinforma. Oxf. Engl*. 2011;27:2957–63.
20. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol. J. Comput. Mol. Cell Biol*. 2012;19:455–77.
21. Markowitz VM, Chen I-MA, Palaniappan K, Chu K, Szeto E, Grechkin Y, et al. IMG: the Integrated Microbial Genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:D115-122.
22. Huntemann M, Ivanova NN, Mavromatis K, Tripp HJ, Paez-Espino D, Palaniappan K, et al. The standard operating procedure of the DOE-JGI Microbial Genome Annotation Pipeline (MGAP v.4). *Stand. Genomic Sci*. 2015;10:86.
23. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:W16-21.
24. Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, et al. antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:W237-243.
25. van Heel AJ, de Jong A, Montalbán-López M, Kok J, Kuipers OP. BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:W448-453.
26. Hammami R, Zouhir A, Le Lay C, Ben Hamida J, Fliss I. BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. *BMC Microbiol*. 2010;10:22.
27. Mende DR, Sunagawa S, Zeller G, Bork P. Accurate and universal delineation of prokaryotic species. *Nat. Methods*. 2013;10:881–4.
28. Walter F, Albersmeier A, Kalinowski J, Rückert C. Complete genome sequence of *Corynebacterium casei* LMG S-19264T (=DSM 44701T), isolated from a smear-ripened cheese. *J. Biotechnol*. 2014;189:76–7.
29. Almeida M, Hébert A, Abraham A-L, Rasmussen S, Monnet C, Pons N, et al. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics*. 2014;15:1101.
30. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 1990;215:403–10.
31. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol*. 2000;302:205–17.
32. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32:1792–7.
33. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree 2--approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS One*. 2010;5:e9490.

34. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016;33:1870–4.
35. Contreras-Moreira B, Vinuesa P. GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79:7696–701.
36. Li L, Stoeckert CJ, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res.* 2003;13:2178–89.
37. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:33–6.
38. Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002;52:1043–7.
39. Konstantinidis KT, Tiedje JM. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102:2567–72.
40. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007;57:81–91.
41. Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:19126–31.
42. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 1994;44:846–9.
43. Michel V, Martley FG. *Streptococcus thermophilus* in cheddar cheese--production and fate of galactose. *J. Dairy Res.* 2001;68:317–25.
44. Mounier J, Rea MC, O'Connor PM, Fitzgerald GF, Cogan TM. Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73:7732–9.
45. Jiang T, Gao C, Ma C, Xu P. Microbial lactate utilization: enzymes, pathogenesis, and regulation. *Trends Microbiol.* 2014;22:589–99.
46. Pinchuk GE, Rodionov DA, Yang C, Li X, Osterman AL, Dervyn E, et al. Genomic reconstruction of *Shewanella oneidensis* MR-1 metabolism reveals a previously uncharacterized machinery for lactate utilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106:2874–9.
47. Jolkver E, Emer D, Ballan S, Krämer R, Eikmanns BJ, Marin K. Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 2009;191:940–8.
48. Auchter M, Arndt A, Eikmanns BJ. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene *ald* of *Corynebacterium glutamicum* by RamA and RamB. *J. Biotechnol.* 2009;140:84–91.
49. Hajri T, Abumrad NA. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu. Rev. Nutr.* 2002;22:383–415.
50. Muñoz-Elías EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol. Microbiol.* 2006;60:1109–22.

51. Bott M, Niebisch A. The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. J. Biotechnol. 2003;104:129–53.
52. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. 2016;44:D343-350.
53. Rattray FP, Bockelmann W, Fox PF. Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. Appl. Environ. Microbiol. 1995;61:3454–6.
54. Nomura M, Kimoto H, Someya Y, Furukawa S, Suzuki I. Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. J. Dairy Sci. 1998;81:1486–91.
55. Miethke M, Monteferrante CG, Marahiel MA, van Dijl JM. The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. Biochim. Biophys. Acta. 2013;1833:2267–78.
56. Khan AG, Shouldice SR, Kirby SD, Yu R, Tari LW, Schryvers AB. High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from *Haemophilus influenzae* is required for acquiring iron from transferrin. Biochem. J. 2007;404:217–25.
57. Bernard T, Jebbar M, Rassouli Y, Himdi-Kabbab S, Hamelin J, Blanco C. Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. Microbiology. 1993;139:129–36.
58. Zeisel SH, Mar M-H, Howe JC, Holden JM. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. J. Nutr. 2003;133:1302–7.
59. Frings E, Kunte HJ, Galinski EA. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. FEMS Microbiol. Lett. 1993;109:25–32.
60. Kempf B, Bremer E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Arch. Microbiol. 1998;170:319–30.
61. Swartz TH, Ikewada S, Ishikawa O, Ito M, Krulwich TA. The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters? Extremophiles. 2005;9:345–54.
62. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. Nat. Prod. Rep. 2013;30:108–60.
63. Meindl K, Schmiederer T, Schneider K, Reicke A, Butz D, Keller S, et al. Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 2010;49:1151–4.
64. Bierbaum G, Sahl H-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. Curr. Pharm. Biotechnol. 2009;10:2–18.
65. Zhang Q, Yu Y, Vélasquez JE, van der Donk WA. Evolution of lanthipeptide synthetases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012;109:18361–6.
66. Müller WM, Ensle P, Krawczyk B, Süssmuth RD. Leader peptide-directed processing of labyrinthopeptin A2 precursor peptide by the modifying enzyme LabKC. Biochemistry (Mosc.). 2011;50:8362–73.
67. Völler GH, Krawczyk B, Ensle P, Süssmuth RD. Involvement and unusual substrate specificity of a prolyl oligopeptidase in class III lanthipeptide maturation. J. Am. Chem. Soc. 2013;135:7426–9.

68. Bi D, Xu Z, Harrison EM, Tai C, Wei Y, He X, et al. ICEberg: a web-based resource for integrative and conjugative elements found in Bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D621-626.
69. Martínez B, Fernández M, Suárez JE, Rodríguez A. Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid-encoded bicistronic operon. *Microbiol. Read. Engl.* 1999;145 (Pt 11):3155–61.
70. Sánchez C, Hernández de Rojas A, Martínez B, Argüelles ME, Suárez JE, Rodríguez A, et al. Nucleotide sequence and analysis of pBL1, a bacteriocin-producing plasmid from *Lactococcus lactis* IPLA 972. *Plasmid.* 2000;44:239–49.
71. Haft DH, Basu MK, Mitchell DA. Expansion of ribosomally produced natural products: a nitrile hydratase- and Nif11-related precursor family. *BMC Biol.* 2010;8:70.
72. Lee SW, Mitchell DA, Markley AL, Hensler ME, Gonzalez D, Wohlrab A, et al. Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:5879–84.
73. Claesen J, Bibb M. Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:16297–302.
74. Claesen J, Bibb MJ. Biosynthesis and regulation of grisemycin, a new member of the linaridin family of ribosomally synthesized peptides produced by *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 2011;193:2510–6.
75. Liu W-T, Yang Y-L, Xu Y, Lamsa A, Haste NM, Yang JY, et al. Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:16286–90.
76. Pérez Morales TG, Ho TD, Liu W-T, Dorrestein PC, Ellermeier CD. Production of the cannibalism toxin SDP is a multistep process that requires SdpA and SdpB. *J. Bacteriol.* 2013;195:3244–51.
77. Price-Whelan A, Dietrich LEP, Newman DK. Rethinking “secondary” metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nat. Chem. Biol.* 2006;2:71–8.
78. Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo M, Ludwig W, et al. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition) Volume 5: The Actinobacteria.* New York: Springer Science & Business Media; 2012.
79. Rattray FP, Fox PF, Healy A. Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine alpha s1-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:501–6.
80. Rattray FP, Fox PF, Healy A. Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine beta-casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:2468–71.
81. Masoud W, Jakobsen M. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int. Dairy J.* 2005;15:69–77.
82. Noordman WH, Reissbrodt R, Bongers RS, Rademaker JLW, Bockelmann W, Smit G. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *J. Appl. Microbiol.* 2006;101:637–46.
83. Monnet C, Back A, Irlinger F. Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012;78:3185–92.

84. Kastman EK, Kamelamela N, Norville JW, Cosetta CM, Dutton RJ, Wolfe BE. Biotic Interactions Shape the Ecological Distributions of *Staphylococcus* Species. *mBio*. 2016;7:e01157-16.
85. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002;56:117–37.
86. Valdés-Stauber N, Scherer S. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994;60:3809–14.
87. Eppert I, Valdés-Stauber N, Götz H, Busse M, Scherer S. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated *in situ* on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:4812–7.
88. Valdes-Stauber N, Scherer S. Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996;62:1283–6.
89. Kato F, Eguchi Y, Nakano M, Oshima T, Murata A. Purification and Characterization of Linecin-A, a Bacteriocin of *Brevibacterium linens*. *Agric. Biol. Chem.* 1991;55:161–6.
90. Maisnier-Patin S, Richard J. Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995;61:1847–52.
91. Kämpfer P, Schäfer J, Lodders N, Busse H-J. *Brevibacterium sandarakinum* sp. nov., isolated from a wall of an indoor environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2010;60:909–13.
92. Maizel D, Utturkar SM, Brown SD, Ferrero MA, Rosen BP. Draft Genome Sequence of *Brevibacterium linens* AE038-8, an Extremely Arsenic-Resistant Bacterium. *Genome Announc.* 2015;3:e00316-15.
93. Roux V, Robert C, Gimenez G, Raoult D. Draft genome sequence of *Brevibacterium massiliense* strain 541308T. *J. Bacteriol.* 2012;194:5151–2.
94. Kokcha S, Ramasamy D, Lagier J-C, Robert C, Raoult D, Fournier P-E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Brevibacterium senegalense* sp. nov. *Stand. Genomic Sci.* 2012;7:233–45.
95. Ganesan B, Seefeldt K, Weimer BC. Fatty acid production from amino acids and alpha-keto acids by *Brevibacterium linens* BL2. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:6385–93.

II. Étude des interactions biotiques entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei* dans un fromage modèle

A. Résumé

La croissance des microorganismes à la surface des fromages dépend non seulement de facteurs abiotiques (structure et composition du caillé, température, humidité...) mais aussi de facteurs biotiques, c'est-à-dire des interactions avec les autres microorganismes présents dans le fromage. L'objectif de ce travail était d'étudier les interactions biotiques impliquant des bactéries du genre *Brevibacterium* dans l'environnement fromager *via* un modèle d'interaction entre ces bactéries et *Hafnia alvei*, une bactérie productrice de composés d'arômes qui est présente dans certains ferments d'affinage. Pour cela, nous avons développé un modèle de mini-fromage représentatif de la surface du fromage, dans lequel *Debaryomyces hansenii* est utilisé comme levure désacidifiante. Ce modèle de mini-fromage a été utilisé pour évaluer l'impact de *H. alvei* sur la croissance de différentes souches fromagères de *Brevibacterium*, et *vice versa*. Certaines associations de souches ont été ensuite sélectionnées pour l'étude des profils d'expression des ARN messagers par la méthode RNA-seq.

Les tests de croissance dans les mini-fromages ont révélé une forte stimulation de certaines souches de *Brevibacterium* par *H. alvei*, et dans la majorité des cas une stimulation de *H. alvei* par *Brevibacterium*. Deux souches de l'espèce *B. aurantiacum* qui présentaient des comportements différents par rapport à *H. alvei* ont été sélectionnées pour les études transcriptomiques : la souche 8(6), stimulée par *H. alvei*, et la souche ATCC 9175^T, qui ne l'était pas. Ces expériences ont mis en évidence différents phénomènes d'interaction entre *Brevibacterium* et *H. alvei*, notamment au niveau de l'acquisition du fer, du métabolisme soufré, de la protéolyse, de la lipolyse et du catabolisme du D-galactonate. En absence de *H. alvei*, les gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores étaient moins exprimés chez la souche 8(6) que chez ATCC 9175^T, alors que ceux impliqués dans l'assimilation du soufre et dans la biosynthèse des acides aminés soufrés l'étaient davantage. La présence de *H. alvei* réprimait l'expression de ces gènes chez la souche 8(6) mais n'avait pas d'impact chez la souche ATCC 9175^T. Concernant *H. alvei*, l'expression de gènes impliqués dans le catabolisme du glycérol et des acides aminés, notamment le catabolisme de la méthionine *via* la méthionine γ -lyase, était stimulée en présence de chacune des deux souches de *Brevibacterium*. Les analyses transcriptomiques ont également révélé que les gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate chez *B. aurantiacum* 8(6) et *H. alvei* étaient exprimés au cours de leur croissance dans les mini-fromages et y étaient soumis à une régulation transcriptionnelle.

Il est probable qu'en absence de *H. alvei*, la plus faible croissance de *B. aurantiacum* 8(6) par rapport à celle de *B. aurantiacum* ATCC 9175^T soit due à une carence en fer liée à une moindre expression des gènes de synthèse de sidérophores. Le phénomène de mutualisme observé entre *B. aurantiacum* 8(6) et *H. alvei* pourrait s'expliquer par la stimulation de la souche 8(6) par les sidérophores sécrétés par *H. alvei*, cette dernière bénéficiant en retour des activités protéolytiques et lipolytiques de la souche 8(6), qui génèrent des composés énergétiques à partir des caséines et des triglycérides du caillé. Ces résultats soulignent le rôle important de l'acquisition du fer, de la protéolyse et de la lipolyse comme mécanismes sous-jacents aux interactions biotiques dans les communautés microbiennes fromagères.

B. Publication

Biotic interaction between *Brevibacterium* and *Hafnia alvei* in cheese

Article to be submitted

Abstract

Brevibacterium strains are commonly used during the manufacturing of cheese, where they contribute to the typical sensory properties of the final product. Little is known about the impact of biotic interactions on the growth of *Brevibacterium* strains in cheese. Here we developed a lab scale mini-cheese model to investigate the interactions between *Brevibacterium* strains and *Hafnia alvei*. The latter bacterium is able to produce volatile sulfur compounds and is sometimes associated to *Brevibacterium* strains in commercial ripening cultures. We discovered a strain-specific mutualistic interaction between *Brevibacterium* strains and *Hafnia alvei*, and transcriptomic analyses of selected strain combinations revealed potential mechanisms of biotic interactions concerning iron acquisition, proteolysis, lipolysis, sulfur metabolism and D-galactonate catabolism. We proposed an explanation of the mutualistic relationship between *Brevibacterium* and *H. alvei*, in which *Brevibacterium* strains would benefit from siderophore production by *H. alvei*, and the latter would be stimulated by the energy compounds liberated from caseins and triglycerides through the action of the proteases and lipases secreted by *Brevibacterium*.

Importance

Ripening cultures are widely used in surface-ripened cheese production but they contain strains that sometimes fail to grow on the cheese surface. The design of ripening cultures is for now rather empirical and the biotic relationships between strains are insufficiently considered. The recent technical advances and cost reduction of high-throughput sequencing technologies offer interesting opportunities for the study of the molecular mechanisms underlying the biotic interactions. By applying dual RNA-seq in a lab scale model cheese, we revealed that iron acquisition *via* siderophore-mediated uptake is probably involved in strain-specific mutualistic interactions between *Brevibacterium* strains and *Hafnia alvei*, which are two common ripening agents for surface-ripened cheeses. This suggests that the iron acquisition systems of cheese-associated microorganisms could be taken into account for the selection of strains and their association in ripening cultures.

Keywords

Brevibacterium, *Hafnia alvei*, Cheese, Microbial communities, Interspecies interactions, Biotic interactions, Transcriptome, Dual RNA-seq

Microbial communities from rinds of surface-ripened cheeses contain various types of bacteria, yeasts and molds. These microorganisms, which may originate from the milk, the ripening environment or the ripening cultures, interact together and contribute to the development of cheese flavor, texture and appearance [1–3]. Traditionally, the production of smear-ripened cheeses involved a common step of “old-young smearing”, in which a smear fluid derived from mature (“old”) cheeses is used to inoculate the surface of freshly made (“young”) cheeses. This technique ensures the transfer of the microorganisms that contribute to the ripening process, but its major drawback is the high risk of spreading undesirable contaminants such as *Listeria monocytogenes* [4, 5]. Nowadays, selected ripening cultures are widely used in the cheese industry in order to standardize the manufacturing processes, to provide specific sensory properties and to outcompete pathogens or spoilage microorganisms

[6]. However, it has been shown that strains from commercial ripening cultures, despite their massive inoculation, frequently do not establish themselves on the cheese surface, which can be dominated by adventitious strains [2, 7]. This highlights the need for developing ripening cultures that are able to better grow on the cheese surface.

Brevibacterium is a good example of ripening culture component that may have a problematic growth in cheese [8–13]. *Brevibacterium* strains contribute to cheese proteolysis and lipolysis, and produce red-orange pigments as well as volatile sulfur compounds (VSCs) that are of major importance for cheese flavor [14–17]. In the past, *B. linens* was considered to be the major *Brevibacterium* species of cheeses. In 2004, this species was split into three species: *B. linens*, *B. antiquum* and *B. aurantiacum* [18], and the latter is now regarded as the most common *Brevibacterium* species of surface-ripened cheeses [19]. Other *Brevibacterium* species, such as *B. casei* and not-yet described *Brevibacterium* species, have also been isolated from cheeses [19].

The ability of microorganisms to establish themselves on the surface of cheeses depends on several properties, such as the ability to use the energy sources present in cheese, to acquire iron, to tolerate low pH at the beginning of ripening and to adapt to high salt concentrations and moisture levels [20]. In a previous study of 23 *Brevibacterium* strains, including twelve strains isolated from cheeses, we used comparative genomic approaches to investigate the repertoire of genes potentially involved in the ability to grow on the cheese surface [21]. It is noteworthy that some of the genomic features that distinguish the *Brevibacterium* strains may concern biotic interactions with other microorganisms present in cheeses, such as the secretion of proteases and triacylglycerol lipases, the acquisition of iron or the production of bacteriocins [21]. Little is known about the interactions of *Brevibacterium* strains with other microorganisms during the ripening of cheese, and how these interactions contribute to stimulate or to inhibit the growth of *Brevibacterium*. Like most cheese surface bacteria, *Brevibacterium* has a low tolerance to acidity and therefore requires the presence of yeasts that increase the pH of the cheese at the beginning of ripening [17]. It has also been suggested that *Brevibacterium* is stimulated by the vitamins produced by the yeasts [22] and that its methanethiol production could be toxic toward molds [23].

The manipulation of experimental communities is very useful to better understand the interactions between cheese surface microorganisms. For example, Kastman *et al.* [24] described a species-specific stimulation of *Staphylococcus equorum* by the fungus *Scopulariopsis*, which seemed to be linked to iron utilization pathways. In another study, experimental communities were used to show that the dispersal of motile bacteria across cheese surface is promoted by the physical networks created by filamentous fungi [25]. Studies of reconstituted communities benefit from recent technical advances and cost reductions of high-throughput sequencing technologies (HTS), which now allow researchers to capture accurately the transcriptomes of two or more species present in the same sample. This relatively new approach, known as dual RNA-seq, offers a more complete view for dissecting interspecies interactions [26].

Hafnia alvei is a gram-negative species which can be isolated from raw milk [27, 28] and various types of cheeses [29–31]. It is also used as ripening agent for surface-ripened cheeses, and several commercial cultures associate this species to *Brevibacterium* strains. Interestingly, in preliminary studies, we noticed that *H. alvei* sometimes stimulated the growth of *Brevibacterium* (unpublished results). As the molecular mechanisms involved in this property are unknown and could potentially help to design improved ripening cultures, we aimed, in the present work, to study the biotic interactions between *H. alvei* and *Brevibacterium*. For that purpose, we set up a lab scale mini-cheese model in which the yeast *Debaryomyces hansenii* is used to increase the pH of the cheese, thereby favoring the growth

of surface bacteria. This model was used to evaluate the impact of *H. alvei* on the growth of several *Brevibacterium* strains and to study microbial interactions in selected strain combinations by transcriptomic and biochemical analyses.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions

The strains used in the present study are listed in Table 1. All these strains were originally isolated from cheeses. The yeast *Debaryomyces hansenii* was grown in potato dextrose broth (BD Difco™; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) and the *Brevibacterium* strains and *Hafnia alvei* were grown in brain heart infusion broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Two successive cultures were performed before inoculation of the cheese curd. In the first culture, the strains were grown under aerobic conditions (rotary shaker at 250 rpm) at 25°C in 50-ml conical flasks containing 10 ml of growth medium. After incubation for 48 h, a 250-ml conical flask containing 50 ml of the corresponding medium was inoculated with 1 ml of the previous culture and incubated for 24 h under the same conditions.

Lab scale mini-cheese production

The curd used for the model cheese production was a non-brined curd provided by an industrial cheesemaker. It was manufactured from pasteurized milk using a mesophilic starter culture composed of *Lactococcus* strains, and according to the typical Raclette-type manufacturing process. Blocks of approximately 500 g were wrapped in plastic bags and stored at -20°C. The curd blocks were thawed for 24h at +4°C and grated with an electric grater. A saline solution (NaCl 70.1 g/l) was added to the curd at a final concentration equivalent to 1.7 g NaCl / 100 g and the mixture was then homogenized for 5 min at 24,000 rpm with a mechanical blender (Ultra-Turrax model T25; Ika Labor Technik, Staufen, Germany). The salted curd was autoclaved for 15 min at 108°C and the subsequent stages of model cheese production were carried out under aseptic conditions. The sterilized curd was mixed and subsequently cooled to 20°C. The cultures of the yeast and bacteria were centrifuged at 4,500 x g for 10 min at 4°C, cells were washed and re-suspended in physiological water (NaCl 9 g/l) and added to the curd at the final concentration of 10⁴ (yeast) or 10⁶ (bacteria) CFU/g. Six point two grams (6.2 g) of inoculated curd was then transferred onto a circular plastic grid (diameter, 2.7 cm) which rested on a disposable cap (Kim-Kap™, DWK Life Sciences, Rockwood, TN, USA) in a disposable 40-ml sample container (Gosselin™, Dominique Dutscher, Brumath, France). The container cap was unscrewed (three-quarters of a turn) to allow air exchange and the mini-cheeses were placed in an incubator at 15°C. Sampling was done at 28 days (at 21 and 28 days for transcriptomic analyses), and three separate mini-cheeses (four for the transcriptomic analyses) were sampled for each condition. The mini-cheeses used in this study are representative mainly of the cheese surface due to the low thickness of the loaf (approximately 1 cm).

Microbial analyses

Each mini-cheese was mixed with a spatula, and 0.5 g of sample was then mixed with 9.5 ml of physiological water (NaCl 9 g/l). After homogenization with an Ultra-Turrax blender for 1 min at 20,500 rpm, 10-fold serial dilutions were prepared in physiological water

and plated in duplicate on agar plates. *Debaryomyces hansenii* colonies were counted on yeast extract-glucose-chloramphenicol agar (Biokar Diagnostics) after 3 days of incubation at 25°C. Colonies of bacteria were counted on brain heart infusion agar (Biokar Diagnostics) supplemented with 50 mg/l amphotericin (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), which inhibits the growth of fungi, after 3 days of incubation at 25°C. The *Brevibacterium* strains and *Hafnia alvei* could be counted differentially on this medium because of their distinct colony morphologies.

Measurement of pH and evaluation of the proteolytic and lipolytic activities

The pH values were measured on the mini-cheeses that were mixed with a spatula. Proteolytic activity was determined on calcium caseinate agar modified according to Frazier and Rupp (Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 1% (w/v) skim-milk powder (BD Difco™). Lipolytic activity was determined on tributyrin agar (Sigma Aldrich) supplemented with 1% (w/v) tributyrin (Sigma Aldrich). Ten µl of cell suspensions at 10⁶ CFU/ml in physiological water (NaCl 9 g/l) were spot-inoculated onto the plates, which were then incubated at 15°C or 25°C for 21 days. The proteolytic and lipolytic activities were evaluated by the formation of a clear zone around the spots.

Metabolites extraction and analysis by UHPLC-MS and HPLC-UV

All cheeses were frozen at -20°C until extraction. The metabolite extraction procedure was adapted from the method previously described by Le Boucher *et al.* [32]. Briefly, cheese samples of approximately 2 g were ten-fold (w/w) diluted in deionized water (Milli-Q Reagent Grade Water System, Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). The mixture was then homogenized with an Ultra-Turrax blender for 1 min at 20,500 rpm and the homogenate was centrifuged at 10,000 x g for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered and centrifuged for 30 min at 8000 x g and 4°C on centrifugal filter units with a molecular cut-off of 10 kDa (Vivaspin 20, Sartorius, Palaiseau, France).

The filtrate was then diluted in Formic acid 1% for analyses by UHPLC-MS (UHPLC Ultimate 3000 and HR-MS-Q EXACTIVE, Thermo Fisher, France). UHPLC conditions were as follows: metabolites were separated on a Hypersil GOLD phenyl column (Length = 15 mm, Internal diameter = 2.1 mm, Particles size = 3 µm, Thermo Fisher, France). The pressure at the beginning of the gradient was 120 bars and the column temperature was 25°C. The flow was 0.25 ml/min and the solvents were D: acetonitrile (HPLC quality) and B: ultra-pure water + nonafluoropentanoic acid (3 mM). The elution gradient was as follows: 4 min at 98% B + 2% D, then 98% to 2% B in D for 6 min, and finally 2% B and 98% D during 3 min. The injection volume was 5 µl and the injector temperature was 7°C. The duration of one analysis was 14 minutes. Mass spectrometric detection was performed with a quadrupole-orbitrap with an electrospray source operated in the positive ionization mode. Full scans were acquired with a scan range of 3.7 scan/sec and a mass range from 50 to 700 u.m.a. (unified atomic mass unit) with a resolution of 70,000. Data were identified and quantified using the TraceFinder software (Thermo Fisher) according to the calibration solution (Supplemental material 1.1).

Lactose, citric acid, galactose, lactic acid, glycerol, acetic acid and ethanol were determined by HPLC (Waters S.A.S., Saint-Quentin, France). Separation was performed on a Biorad Aminex HPX-87H column (300 mm x 7.8 mm; Biorad, Richmond, USA), equipped with a cation H1 Micro-Guard column (30 mm x 4.6 mm; Biorad) at an eluent flow rate of 0.6 ml/min (e2695 pump; Waters S.A.S.) and a temperature of 35°C. 5 mM H₂SO₄ was used as

eluent. Quantification was performed using a 410 refractive index (RI) detector and a 2489 UV/Visible detector (Waters S.A.S.) at 210 nm, with external standards (Sigma) of known amounts of commercially pure substances prepared fresh in filtered, deionized water (Supplemental material 1.2). Results were analyzed by with the EmPOWER software (Waters S.A.S.).

Extraction of RNA from cheese samples, rRNA depletion and RNA sequencing

RNA was extracted from 500-mg mini-cheese samples without prior separation of microbial cells, as previously described [33], except that UptiZol reagent (Interchim, Montluçon, France) was used instead of TRIzol, that the Phase Lock Gel tubes were replaced by MaXtract High Density tubes (Qiagen, Germantown, MD, USA), and bead beating was performed on a Precellys Evolution bead beater (Bertin, Montigny-le-Bretonneux, France) using two 20-s mixing sequences at a speed of 10,000 rpm. In addition, in order to increase the concentration of RNA, the content of two RNA extraction tubes from the same mini-cheese sample was pooled after the bead-beating step. Purified RNA was quantified with Qubit RNA assay kits on the Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and RNA quality was analyzed with an Agilent model 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA, USA) using RNA 6000 NANO chips, according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was adjusted to 100 ng/μl with RNase-free water, and DNase treatment was performed using TURBO™ DNase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A second DNase treatment was performed on 1000 ng of total RNA (Baseline Zero DNase, Epicentre), and rRNA was then depleted using the Epicentre Ribo-Zero™ Magnetic Gold Kit (Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France) for bacteria (reference MRZB12424) and for yeasts (reference MRZY1324), as described previously [34]. Directional RNA-seq libraries were constructed using the ScriptSeq V2 RNA-seq library preparation kit (Illumina), according to the manufacturer's recommendations (11 PCR cycles were performed). Libraries were pooled in equimolar proportions and sequenced (Single Read 75 pb) on an Illumina NextSeq500 instrument, using a NextSeq 500 High Output 75 cycles kit. Demultiplexing was done with the bcl2fastq2 conversion software (V2.2.18.12) and adapters were trimmed with Cutadapt 1.15 [35]. Reads with a size of less than 10 bp after trimming were discarded.

Mapping against reference genomes

Sequencing reads were mapped against the appropriate reference database using Bowtie short read aligner version 1.2.1.1 [36] with the following parameters: -a -m 1 --best --strata -v 2 -t -S. A maximum of two mismatches was allowed for each sequencing read. The reference databases were composed of the coding DNA sequences (CDSs) of the strains that were inoculated in the mini-cheeses, except for *D. hansenii*, for which mapping was done on the genome of *D. hansenii* CBS767. The NCBI BioProject accession numbers of the strains used for the mapping are: PRJEB19815 (*B. aurantiacum* ATCC 9175^T), PRJEB19868 (*B. aurantiacum* 8(6)), PRJEB6257 (*H. alvei* GB001) and PRJNA13832 (*D. hansenii* CBS767). The numbers of reads that mapped onto the reference genomes were counted using HTSeq-count version 0.10.0 [37] with the following parameters: -s yes -t CDS -i locus_tag -m union. Only reads that mapped to unique sequences were further analyzed. Statistics of sequencing reads mapping to the CDSs databases are provided in Table 2.

RNA-seq data analyses

Sequencing reads that mapped to the CDSs databases were retrieved from the raw dataset. Data were filtered to remove genes displaying an average of <10 reads per sample across the dataset. Normalization was performed against each species: for each sample, the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding species and multiplied by a factor 1,000,000 (bacteria) or 10,000,000 (yeast). Functional classification of the transcriptomic dataset was performed using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) annotations [38]. Differential expression analysis was conducted using the DESeq2 package [39] implemented in Galaxy (<http://migale.jouy.inra.fr/galaxy/>). Raw p-values were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure [40], which assesses the False Discovery Rate. Gene transcripts with an adjusted $p < 0.05$ were considered to be differentially expressed between two conditions.

Sequence accession numbers

The raw Illumina data for all the samples was deposited in the European Nucleotide Archive of the European Bioinformatics Institute under the accession number PRJEB30420.

RESULTS

Impact of *H. alvei* on the growth of *Brevibacterium* strains in mini-cheeses

In order to evaluate the impact of *H. alvei* on *Brevibacterium*, we measured the growth of nine different *Brevibacterium* strains in mini-cheeses containing the deacidifying yeast *D. hansenii*, in presence or in absence of *H. alvei*. The yeast and each bacterium were inoculated at 10^4 and 10^6 CFU/g, respectively.

In the absence of *H. alvei*, three *Brevibacterium* strains, i.e. *B. aurantiacum* ATCC 9174, ATCC 9175^T and CNRZ 920, had cell counts higher than 2×10^{10} CFU/g at day 28, whereas only a slight growth was observed for *B. antiquum* P10 (5.5×10^8 CFU/g) and *B. linens* Mu101 (7.2×10^7 CFU/g) (Figure 1). The four other strains, i.e. *B. aurantiacum* 8(6), *B. antiquum* CNRZ 918, *B. linens* ATCC 9172^T and *Brevibacterium* sp. 239c, reached an intermediate growth level, ranging from 1.9×10^9 CFU/g for *B. linens* ATCC 9172^T to 5.2×10^9 CFU/g for *B. aurantiacum* 8(6). The presence of *H. alvei* stimulated the growth of five *Brevibacterium* strains, which corresponded to one of the four *B. aurantiacum* strains (8(6)), to the two *B. antiquum* strains (CNRZ 918 and P10) and to the two *B. linens* strains (ATCC 9172^T and Mu101). The increase in cell count varied from about 3-fold for *B. antiquum* CNRZ 918 to about 80-fold for *B. linens* Mu101. It is noteworthy that there was no stimulation by *H. alvei* for the three *Brevibacterium* strains that had the highest growth levels in the absence avec *H. alvei* (ATCC 9174, ATCC 9175^T and CNRZ 920) whereas a stimulation was observed for five of the six *Brevibacterium* strains that had lower growth levels in the absence of *H. alvei*.

The impact of *Brevibacterium* on the growth of *H. alvei* in the mini-cheeses is shown in Figure 2. In the absence of *Brevibacterium*, *H. alvei*, which was inoculated at 10^6 CFU/g, only grew weakly (2.7×10^7 CFU/g at day 28). Eight of the nine *Brevibacterium* strains significantly increased *H. alvei* cell counts at day 28 ($p < 0.05$). The increase of *H. alvei* cell count varied from about 3-fold when it was co-cultured with *B. antiquum* P10 to about 13-fold when co-cultured with *B. linens* ATCC 9172^T. In all mini-cheeses co-inoculated with *H.*

alvei and a *Brevibacterium* strain, the latter was dominant in term of viable cell concentration (Figure 3).

In the absence of *H. alvei*, *Brevibacterium* strains had no major impact on *D. hansenii* counts at day 28, except with *B. aurantiacum* CNRZ 920 and *Brevibacterium* sp. 239c, where a decrease of about 3-fold was observed (Figure 4). *Brevibacterium aurantiacum* ATCC 9174, ATCC 9175^T, CNRZ 920 and *Brevibacterium* sp. 239c increased the pH at day 28. In four of the nine *D. hansenii* / *Brevibacterium* / *H. alvei* co-cultures, there was a significantly lower growth ($p < 0.05$) of *D. hansenii* in comparison to the cultures in absence of bacteria, and an increase of pH was observed in eight of these co-cultures. There was a correlation between the decrease of *D. hansenii* cell counts and the increase of pH (Figure 5A). This was not observed for the *Brevibacterium* cell counts, as the mini-cheeses with the highest *Brevibacterium* counts also corresponded to cheeses with a pH >7 (Figure 5B). These results indicate that the bacteria also contributed to increase the pH of the mini-cheeses, and that *D. hansenii* was inhibited samples that had the highest pH levels.

Proteolytic and lipolytic activities of the microorganisms

Proteolysis and lipolysis are key biochemical processes for the growth of microorganisms in cheese, as they generate small peptides, amino acids, glycerol and fatty acids that can be used as energy sources or cellular constituents (amino acids). In order to determine whether differences in the ability of *Brevibacterium* strains to grow in the mini-cheeses could be due to their proteolytic or lipolytic activities, we evaluated these activities on calcium caseinate and tributyrin agar media, respectively (Table 3). In some strains, these activities were shown to be temperature dependent. For example, *B. linens* Mu101 displayed a strong proteolytic activity at 25°C, but none at 15°C. There was no evident correlation between the ability of *Brevibacterium* strains to grow in the *D. hansenii* / *Brevibacterium* co-cultures (Figure 1) and their proteolytic or lipolytic activities. In addition, as no proteolytic and lipolytic activity could be detected in *H. alvei* at 15°C, these activities were probably not involved in the growth stimulation of some *Brevibacterium* strains by *H. alvei* (Figure 1). However, one may hypothesize that one of the factors that contributed to the stimulation of *H. alvei* in the mini-cheeses by *Brevibacterium* strains could be the proteolytic and lipolytic activities of *Brevibacterium*. The yeast *D. hansenii* showed no proteolytic activity on calcium caseinate agar.

Transcriptomic analysis of the biotic interactions between *Brevibacterium* and *H. alvei*

Overview of the transcriptomic data

In the mini-cheese experiments, *H. alvei* stimulated part of the *Brevibacterium* strains, and most of the *Brevibacterium* strains stimulated *H. alvei*. RNA-seq analyses were performed in order to gain insight into the potential molecular mechanisms underlying the biotic interactions between these bacteria. For that purpose, mini-cheeses containing the deacidifying yeast *D. hansenii* were performed with several combinations of *H. alvei* and *Brevibacterium* (Table 4), and sampled after 21 and 28 days of ripening at 15°C. The two *B. aurantiacum* strains 8(6) and ATCC 9175^T were selected for these experiments, because their responses to the presence of *H. alvei* were different. Strain 8(6) was stimulated by *H. alvei*, in contrast to strain ATCC 9175^T, which was slightly inhibited (Figure 1). These strains belong to the same species and have an Average Nucleotide Identity of 99.74% [21].

The mean numbers of sequencing reads generated in the four mini-cheese replicates of the twelve biological conditions were between 76 and 90 millions, and between 58.8 and 64.6% of the sequencing reads mapped to unique sequences of the CDSs databases (Table 2). *Debaryomyces hansenii* accounted for most of the mapped reads (Figure 6). The number of sequencing reads mapped to the *B. aurantiacum* 8(6) genome was higher in the presence of *H. alvei* (approx. 6-fold increase at day 21 and 15-fold increase at day 28), which may be the result of the growth stimulation of *B. aurantiacum* 8(6) by *H. alvei*. The proportion of CDSs from the reference genomes that were detected (detection cut-off was set to a mean number of 10 reads per CDS in the cheese replicates) was between 95.8 and 96.5% for *D. hansenii*, between 80.6 and 87.3% for *H. alvei*, between 65.1 and 86.1% for *B. aurantiacum* 8(6), and between 93.2 and 95.5% for *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, depending on the biological condition (Table 5). For strain 8(6), there was a higher proportion of detected CDSs when it was co-cultivated with *H. alvei*.

The transcriptomes of the individual species were normalized against the corresponding species (read numbers for each CDS were divided by the sum of the reads that mapped to CDSs of the species) and compared in the different biological conditions. Inoculation of *H. alvei* in the mini-cheeses had a lower impact on the transcriptome of *D. hansenii* than on that of the two *Brevibacterium* strains, and the transcriptome of *B. aurantiacum* 8(6) was more impacted than that of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T (Figure 7). Indeed, the percentage of genes included in the log₂ fold change interval -1.0 to +1.0 (i.e., a fold change varying from 0.5 to 2) was 91.2, 97.5 and 99.7% at day 21 and 88.9, 93.3 and 97.4% at day 28 for *B. aurantiacum* 8(6), *B. aurantiacum* ATCC 9175^T and *D. hansenii*, respectively. In addition, inoculation of *B. aurantiacum* 8(6) or *B. aurantiacum* ATCC 9175^T in the mini-cheeses had a larger impact on the transcriptome of *H. alvei* than of *D. hansenii* (Figures 8 and 9).

For each of the four strains, the global distribution of the KEGG categories within the transcriptomes was quite similar in the different biological conditions (Figure 10). However, for *B. aurantiacum* 8(6), co-cultivation with *H. alvei* decreased the proportion of sequencing reads from the KEGG category Membrane transport.

Differential expression analysis of the transcriptomes

Differential expression analyses of the transcriptomes were performed for each of the four strains in the different biological conditions. This analysis confirmed that the presence of *H. alvei* had more impact on the *B. aurantiacum* 8(6) transcriptome than on that of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T (Table 6). Indeed, the number of genes differentially expressed in presence versus in absence of *H. alvei* was higher for strain 8(6) than for strain ATCC 9175^T, especially at day 21. For *H. alvei*, the number of genes that were up- or down-regulated in presence versus in absence of *Brevibacterium* strains was quite similar with *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175^T (Table 7). The transcriptome of *D. hansenii* was more impacted by the presence of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T than by the presence of *B. aurantiacum* 8(6) or *H. alvei*.

For each strain, we determined the KEGG functional categories of the up- and down-regulated genes in the different conditions at day 28. The *B. aurantiacum* 8(6) genes that were up-regulated in the presence of *H. alvei* generated more KEGG entries in the Carbohydrate metabolism and Lipid metabolism categories than the genes that were down-regulated (Figure 11A). The opposite tendency was observed for the Energy metabolism, Membrane transport, Metabolism of other amino acids, and Nucleotide metabolism categories. The enrichment in down-regulated genes in the KEGG Membrane transport category is in concordance with the

decrease in proportion of this category observed in whole-transcriptome analysis of strain 8(6) (Figure 10). The *B. aurantiacum* ATCC 9175^T genes that were up-regulated in presence of *H. alvei* generated more KEGG entries in the Carbohydrate metabolism category than the genes that were down-regulated, and the opposite was observed for the Replication and repair and Signal transduction categories (Figure 11B). There were thus differences in the functional profiles of the differentially expressed genes of the two *Brevibacterium* strains. Concerning the *H. alvei* transcriptome, we noticed that in the presence of *B. aurantiacum* 8(6) or of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T there was an over-representation of up-regulated genes compared to down-regulated genes in the KEGG Cell motility and Lipid metabolism categories (Figure 12). *Debaryomyces hansenii* genes that were up-regulated in the presence of *H. alvei* generated more KEGG entries in the Amino acid metabolism and Transport and catabolism categories than the genes that were down-regulated (Figure 13A), and less entries in the Lipid metabolism and Translation categories. *Debaryomyces hansenii* genes that were up-regulated in the presence of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T generated more KEGG entries in the Carbohydrate metabolism, Energy metabolism, Metabolism of cofactors and vitamins and Signal transduction categories than the genes that were up-regulated (Figure 13B), and less entries in the Cell growth and Death and Lipid metabolism categories.

The metatranscriptomic data provide a large amount of information regarding the biotic interactions between the investigated strains during their growth in the mini-cheeses. The most interesting findings are described hereafter.

Catabolism of D-galactonate, lactate, acetate, ethanol and citrate

Brevibacterium aurantiacum 8(6) expressed the genes encoding the enzymes of the D-galactonate catabolism pathway and these genes were strongly repressed in the presence of *H. alvei* (Figure 14 and Supplemental material 2). The latter strain also expressed the enzymes of this pathway, and the highest expression levels were observed when it was co-cultured with *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, whose genome does not encode the pathway (Figure 14 and Supplemental material 3). D-galactonate was detected in the cheese curd before inoculation at a concentration of 10.3 ± 0.3 $\mu\text{mol/kg}$ by UHPLC-MS analysis, and it increased to 56.0 ± 3.1 $\mu\text{mol/kg}$ in the mini-cheeses inoculated with *D. hansenii* at day 28 (Table 8). These results suggest that some D-galactonate is produced in the mini-cheeses by *D. hansenii* and that this compound is probably catabolized by *B. aurantiacum* 8(6) and *H. alvei*. *Hafnia alvei* increased the expression of the genes encoding the three subunit quinone/cytochrome-dependent L-iLDH complex LldEFG in *B. aurantiacum* 8(6) (Supplemental material 2). This enzyme catalyzes the oxidation of lactate, which is an energy source for many ripening bacteria. *Hafnia alvei* also increased expression of the monocarboxylic acid transporter MctC, which is an uptake system for acetate, propionate and pyruvate, in the two *Brevibacterium* strains. Orthologs of the *Corynebacterium glutamicum* genes *adhA* and *ald*, which are responsible for ethanol catabolism [41, 42], are present and form a cluster in the two *B. aurantiacum* strains, and their expressions were stimulated by *H. alvei* at day 28. We also observed that the *H. alvei* *citTGXFEDC* gene cluster, which encodes the enzymes involved in citrate catabolism, was repressed in the presence of the *Brevibacterium* strains (Supplemental material 3).

Nitrogen metabolism

On calcium caseinate agar, the two *B. aurantiacum* strains had a proteolytic activity, but no activity was detected for *D. hansenii* and *H. alvei* (Table 3). The presence of *H. alvei*

had no major impact on the expression of putative excreted proteases/peptidases in the two *B. aurantiacum* strains (Supplemental material 4). In absence of *H. alvei*, the two *B. aurantiacum* strains had similar expression levels for most of the amino acid catabolic pathways, except that of phenylalanine, in which strain 8(6) had a higher expression level, and that of methionine, in which it had a lower expression level (Figure 15 and Supplemental material 5). Presence of *H. alvei* decreased the expression of the phenylalanine catabolic pathway in the two *Brevibacterium* strains, and there was also a decrease in expression of this pathway in *H. alvei* when it was co-cultivated with *Brevibacterium* (Figure 15 and Supplemental material 5, 6). Presence of *H. alvei* decreased the expression of the proline and alanine catabolic pathways in *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, but the latter had not a marked impact on the expression of these pathways in *H. alvei*. Interestingly, co-cultivation of *H. alvei* with the *Brevibacterium* strains, and especially with strain 8(6), considerably increased its expression of two genes encoding methionine gamma-lyase, an enzyme involved in methionine catabolism. This suggests that there is a higher methionine availability for *H. alvei* when *Brevibacterium* is present. This is in agreement with the metabolomic analyses, which revealed a higher concentration of methionine at day 28 in the mini-cheeses inoculated with *D. hansenii*, *H. alvei* and a *Brevibacterium* strain in comparison to the mini-cheeses inoculated with only *D. hansenii* and *H. alvei* (Table 8). In addition, presence of *B. aurantiacum* 8(6) increased the expression of the threonine degradation pathways *via* threonine dehydrogenase and *via* threonine ammonia-lyase, and of the serine degradation pathway *via* L-serine ammonia-lyase in *H. alvei*. Expression of the *H. alvei* *gabT* and *gabD* genes, which are involved in gamma-aminobutyrate (GABA) degradation, decreased in the presence of *Brevibacterium* strains. In *E. coli*, these genes are induced by nitrogen limitation [43], one may thus hypothesize that the presence of *Brevibacterium* increased the availability of nitrogen sources for *H. alvei*.

The expression of several *D. hansenii* genes involved in nitrogen metabolism was impacted by the presence of *H. alvei* and *Brevibacterium* in the mini-cheeses (Supplemental material 7). Interestingly, when *H. alvei* and *B. aurantiacum* 8(6) were inoculated simultaneously in the mini-cheeses, there was a higher expression level of the pathways for glutamate degradation to alpha-ketoglutarate, for glutamate degradation to GABA, and for GABA degradation to succinate (Figure 16). This suggests that the combination of *H. alvei* and *B. aurantiacum* 8(6) increased the availability of glutamate for *D. hansenii*. Furthermore, presence of the two bacteria decreased expression of the genes involved in the utilization of two other nitrogen sources: ammonium and urea. In *Saccharomyces cerevisiae*, urea is considered as a poor nitrogen source and its uptake and catabolism is repressed *via* the nitrogen catabolism repression (NCR) process in the presence of rich nitrogen sources [44]. Higher nitrogen availability was confirmed by the metabolomic analyses, which showed that the mini-cheeses inoculated simultaneously with *H. alvei* and *B. aurantiacum* 8(6) had the highest total concentration of free amino acids among all the investigated conditions (Figure 17 and Table 8).

Lipid catabolism

On tributyrin agar at 15°C, the two *B. aurantiacum* strains and *D. hansenii* had a lipolytic activity, but no activity was detected for *H. alvei* (Table 3). This was in accordance with genomic analyses, which revealed that only the *H. alvei* genome did not encode a putative secreted triacylglycerol lipase. The expression level of the *B. aurantiacum* ATCC 9175^T triacylglycerol lipase increased in the presence of *H. alvei*, especially at day 28 (Supplemental material 8). When *B. aurantiacum* ATCC 9175^T was inoculated in the mini-cheeses, there was also a higher expression level of *H. alvei* genes involved in beta-oxidation

at day 28 (Supplemental material 9). Interestingly, expression of the *H. alvei* glycerol degradation pathway *via* glycerol dehydrogenase increased considerably in the presence of *Brevibacterium*. One may thus hypothesize that the glycerol liberated by the triacylglycerol lipase secreted by the *Brevibacterium* strains could be used by *H. alvei* as an energy source. Glycerol was detected in the mini-cheeses by HPLC but no significant difference between the investigated conditions could be observed (Table 9). In *D. hansenii*, some differences in expression levels of genes involved in lipid catabolism were observed in the 12 biological conditions, however no common pattern could be distinguished (Supplemental material 10).

Iron acquisition

The expression patterns of iron acquisition genes differed considerably in the two *Brevibacterium* strains. The genomes of these strains encode an orthologous, hydroxamate-type siderophore biosynthesis cluster (Supplemental material 11). In absence of *H. alvei*, the siderophore biosynthesis gene cluster had a higher expression level in strain ATCC 9175^T than in strain 8(6), possibly revealing a higher level of siderophore production in strain ATCC 9175^T (Figure 18 and Supplemental material 11). In presence of *H. alvei*, expression of the siderophore biosynthesis genes in strain 8(6) strongly decreased, whereas no difference was observed for their orthologs in strain ATCC 9175^T. In absence of *H. alvei*, the global expression level of genes encoding ABC-type Fe³⁺/siderophore components and siderophore interacting proteins (involved in iron release from the siderophores) was higher in strain 8(6) than in ATCC 9175^T, possibly revealing a higher investment of strain 8(6) in the import of Fe³⁺/siderophore complexes. In presence of *H. alvei*, expression of most genes encoding ABC-type Fe³⁺/siderophore components and siderophore interacting proteins decreased in strain 8(6), whereas no major difference was observed in strain ATCC 9175^T. Furthermore, all the 21 orthologs that are present in the two *Brevibacterium* strains and have a detectable expression level were repressed in strain 8(6). The repression of *B. aurantiacum* 8(6) iron acquisition genes in the presence of *H. alvei* suggests that there is a higher iron availability for strain 8(6) when it is co-cultivated with *H. alvei*. The two *B. aurantiacum* genomes encode ferritin [EC 1.16.3.2], which is a bacterial non-heme iron storage protein. In absence of *H. alvei*, the ferritin gene was more expressed in strain ATCC 9175^T than in 8(6), possibly revealing a higher level of intracellular iron storage. In addition, co-cultivation with *H. alvei* increased the expression of the *B. aurantiacum* 8(6) ferritin gene, which suggests that *H. alvei* increased the amount of intracellular iron in this strain. In contrast, there was a slight down-regulation of the *B. aurantiacum* ATCC 9175^T ferritin gene in the presence of *H. alvei*. One of the distinguishing features between the two investigated *B. aurantiacum* genomes is the presence of different horizontal gene transfer (HGT) clusters involved in iron acquisition. Indeed, the ActinoRUSTI region [45] is present only in strain ATCC 9175^T, whereas the cluster Iron-Brev2 is present only in strain 8(6) [21]. All genes from these clusters had a detectable expression level. Presence of *H. alvei* had no major impact on the expression of the Iron-Brev2 cluster, suggesting that it does not belong to the same regulon than most of the other iron acquisition genes from strain 8(6).

The *H. alvei* genome encodes a hydroxamate-type siderophore biosynthesis cluster (Supplemental material 12). At day 21, expression of this cluster decreased in the presence of the *Brevibacterium* strains, especially with strain ATCC 9175^T (Figure 18 and Supplemental material 12). There was also a decrease at day 28, but only in the presence of strain ATCC 9175^T. Presence of *Brevibacterium* strains decreased the expression level of the genes encoding the periplasmic protein TonB (Ga0116594_112230) and the TonB-dependent outer membrane siderophore receptor (Ga0116594_11037). TonB belongs to a protein complex that delivers energy for the transport of Fe³⁺/siderophores complexes through the outer membrane

of gram-negative bacteria [46]. There was also a lower expression of part of the ABC-type Fe³⁺/siderophore component genes, but many of these genes had a low expression level, which explains why only a slight decrease of the global expression level (cumulated reads) was observed. The iron storage protein identified in the genome of *H. alvei* is bacterioferritin [EC 1.16.3.1], which is a heme-containing protein. Expression of the bacterioferritin gene in *H. alvei* slightly increased in presence of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, whereas no difference was observed in the presence of *B. aurantiacum* 8(6).

As for the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the genome of *D. hansenii* does not contain siderophore biosynthesis genes, but encodes two different iron uptake systems: the reductive system, which involves the reductases of the FRE family, and the non-reductive system, which involves Fe³⁺/siderophore transporters [47] (Supplemental material 13). Some differences in expression levels of genes involved in iron acquisition were observed in the 12 biological conditions, but no common pattern could be distinguished. However, at day 28, there was a large decrease of the global expression level of these genes (cumulated reads) in the mini-cheeses inoculated with *D. hansenii* and *H. alvei* in comparison to the mini-cheeses inoculated with only *D. hansenii* (Figure 18).

Sulfur metabolism

In the mini-cheeses not inoculated with *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) had a higher expression level than *B. aurantiacum* ATCC 9175^T for many genes involved in sulfate or sulfonate assimilation (*cysN*, *cysD*, *cysH*, *cysJ*, *cysG*, *seuA*, *fixA*), in cysteine biosynthesis from sulfide (*cysE*, *cysK*), in methionine biosynthesis via transsulfuration or thiolation (*metX*, *metY*, *metB*, *aecD*, *metE2*), and in methionine import (*metNIQ*) (Supplemental material 14 and Figure 19). In addition, expression of *mgl*, a gene encoding methionine gamma-lyase, which catalyzes the breakdown of methionine to methanethiol (MTL), ammonium and α -ketobutyrate, was more expressed in strain ATCC 9175^T than in 8(6). These results suggest that there was a higher demand for sulfur amino acids in strain 8(6). Presence of *H. alvei* in the mini-cheeses decreased the expression of many genes involved in sulfate and sulfonate assimilation and in methionine biosynthesis in strain 8(6), especially at day 28. This suggests that there was a lower demand for sulfur amino acids in strain 8(6) when it was co-cultivated with *H. alvei*. A previous study revealed that a cluster encoding an oligopeptide ABC transporter in *B. aurantiacum* ATCC 9175^T is up-regulated during sulfur depletion [48]. This cluster corresponds to the locus tag Ga0063690_01287 to 01290 and is also present in strain 8(6) (locus tag Ga0063698_03334 to 03331). In the absence of *H. alvei*, the cluster was more expressed in strain 8(6) than in ATCC 9175^T, suggesting that more sulfur compounds were available in strain ATCC 9175^T than in strain 8(6). In addition, co-inoculation of strain 8(6) with *H. alvei* considerably decreased the expression of the four genes of the cluster at day 28. Concerning the expression of *H. alvei* genes involved in sulfur metabolism, we noticed that several genes involved in sulfate assimilation (*cysN*, *cysC*, *cysH*, *cysI*, *cysJ*) and in cysteine biosynthesis (*cysK*, *cysM*) were down-regulated in presence *B. aurantiacum* strains, and, as already mentioned, the *Brevibacterium* strains also increased *H. alvei* *mgl* expression (Supplemental material 15 and Figure 20). This suggests that *Brevibacterium* increased the availability of sulfur amino acids for *H. alvei*. In *D. hansenii*, some differences in expression levels of genes involved in sulfur metabolism were observed across the 12 biological conditions, but no common pattern could be distinguished (Supplemental material 16).

Metabolism of amines and polyamines

Concerning the expression of genes involved in amines/polyamines metabolism (Supplemental material 17-19), we observed that presence of *B. aurantiacum* 8(6) decreased the expression of the *H. alvei* *potFGHI* and *ydcSTUV* clusters, which are ABC-type polyamine import systems, both at day 21 and day 28.

DISCUSSION

Ripening cultures are widely used in the production of surface-ripened cheeses. The bacterial and fungal strains from these cultures have to establish themselves on the cheese surface in order to generate the desired sensory properties and to outcompete pathogens or spoilage microorganisms [49]. Contrary to lactic starter cultures, for which the growth is fast, short (several hours), and facilitated by a massive inoculation in milk that contains a relatively low concentration of competing microorganisms, the growth of microorganisms on the cheese surface takes much longer time (several weeks) and offers more opportunities for the development of adventitious microorganisms. To date, the design of ripening cultures is rather empirical and little is known about the biotic interactions within these cultures. Understanding the mechanisms underlying these interactions could help to improve strategies for selection of strains and their association in ripening cultures.

In this study, we investigated the biotic interactions between *Brevibacterium* strains and *H. alvei*, which are two ripening agents for surface-ripened cheeses. For this purpose, a lab-scale mini-cheese model was developed to mimic cheese-ripening conditions. The mini-cheeses were made from salted curd and ripening was conducted at 15°C for 28 days, thus mimicking the resource availability, the salty environment and the low temperature for microbial growth in cheese. These mini-cheeses, with a loaf thickness of approximately 1 cm, are representative mainly of the cheese surface. The yeast *D. hansenii* was used to deacidify the curd, which favored the growth of less acid-tolerant, aerobic bacteria. In surface-ripened cheeses, the general trend from the yeast domination during the early stages of ripening, followed by bacterial domination at the end of ripening, is well documented [50]. In our experiments, the culture containing only the deacidifying yeast *D. hansenii* increased the pH of the mini-cheeses from 5.1 (salted curd) to approximately 6.4 after 28 days of ripening. When the yeast was co-cultured with *Brevibacterium* strains, the pH of the mini-cheeses at day 28 reached up to 7.7, which demonstrated the contribution of *Brevibacterium* strains to the deacidification of cheese, which is the result of lactate consumption and ammonia production. Our results also indicate that in some cases, the presence of *Brevibacterium* strains, concomitant with the highest pH levels, led to a decrease of *D. hansenii* cell counts. It would be interesting to determine whether this decrease is due to the higher pH, or if other causes are involved, such as the competition for available nutrients or the excretion of toxic metabolites by bacteria.

In the mini-cheese models, we observed in some cases a large stimulation of *Brevibacterium* growth by *H. alvei* and in most of the cases a stimulation of *H. alvei* by *Brevibacterium*. Interestingly, *H. alvei* could stimulate *Brevibacterium* strains notwithstanding the fact that its growth level was much lower than that of *Brevibacterium* (1.3×10^8 CFU/g when co-cultured with *B. aurantiacum* 8(6), which represented less than 1% of the cell count of strain 8(6)). Furthermore, the impact of *H. alvei* on the growth of *Brevibacterium* depended on the *Brevibacterium* strain. For example, a mutualistic interaction, in which the two interacting species stimulate each other, was observed when *H. alvei* was associated to *B. aurantiacum* 8(6), whereas only *H. alvei* was stimulated in the *H. alvei* / *B. aurantiacum* ATCC 9175^T co-cultures. We used dual RNA-seq, which allows to

simultaneously capture the transcriptomes of two or more interacting partners [26], to study the interactions between *H. alvei* and *B. aurantiacum* 8(6), and between *H. alvei* and *B. aurantiacum* ATCC 9175^T. We also considered that the fact that the two investigated *Brevibacterium* strains are closely related, with an ANI value of 99.74% [21], makes it possible to compare the expression levels of orthologous genes, in order to better characterize the differences between these strains. Transcriptomic analyses revealed several potential mechanisms underlying the biotic interactions between the microorganisms in the mini-cheeses, which are summarized in Table 10.

The transcriptomic data strongly suggest that iron acquisition is involved in the strain specific interactions between *Brevibacterium* and *H. alvei*. Cheese is a highly iron-restricted habitat because of the low iron content of milk, the presence of sequestering compounds such as lactoferrin, the presence of oxygen and the high pH at the cheese surface during the growth of surface bacteria. It was also demonstrated that iron availability can be a limiting factor in the growth of typical aerobic bacteria at the cheese surface [33]. *Brevibacterium aurantiacum* 8(6) and ATCC 9175^T encode an orthologous siderophore biosynthesis gene cluster, but in absence of *H. alvei*, the corresponding genes are less expressed in strain 8(6) than in ATCC 9175^T, suggesting that the former strain produces less siderophores. In addition, the expression level of the ferritine gene is lower in this strain. The main function of ferritine is to store iron in the cells, and it was shown that in *Corynebacterium glutamicum*, this gene is repressed under low-iron condition, and induced in high-iron condition [51, 52]. It may be hypothesized that, in absence of *H. alvei*, the lower expression of siderophore biosynthesis genes in strain 8(6) than in ATCC 9175^T could cause of lower availability of iron, resulting in a lower growth. The reason for the lower expression of the siderophore biosynthesis genes in 8(6) is unknown. In the two strains, the sequences and positions of the putative promoter (-10 and -35 boxes) and of the fixation site of the iron regulator (consensus sequence TTAGGTTAGGCTAACCTAA) are identical, and there is only one mismatch between the 100 bp sequences upstream of the first coding sequence of the cluster (mismatch located 4 nucleotides downstream of the iron box). In addition, the amino acid sequences of the putative iron dependent regulators (ortholog of the *Corynebacterium glutamicum* *dtxR* gene) are fully identical in the two strains (locus tag Ga0063698_00747 in 8(6) and Ga0063690_00623 in ATCC 9175^T). Further studies are thus needed to explain the differences of expression levels of siderophore biosynthesis genes in the *Brevibacterium* strains. Co-cultivation of *B. aurantiacum* 8(6) with *H. alvei* strongly increased expression of its ferritin gene and strongly decreased the expression of most of its genes involved in iron acquisition, which includes siderophore biosynthesis genes, genes coding for ABC-type Fe³⁺/siderophore components and for siderophore interacting proteins. This is a typical response for increased iron availability, and suggests that strain *H. alvei* provided iron to *B. aurantiacum* 8(6), probably by the means of its production of siderophores. Indeed, the *H. alvei* genome contains a gene cluster encoding a hydroxamate-type siderophore. Appropriation of siderophores excreted by other organisms is a strategy that has been described in various microorganisms. For the recipient bacterium, such siderophores are known as "xenosiderophores" [53]. Interestingly, no major difference was observed in expression of *H. alvei* genes involved in iron acquisition and storage when it was co-cultured with *B. aurantiacum* 8(6). This suggests that, even if *B. aurantiacum* 8(6) consumed part of the siderophores produced by *H. alvei*, this did not decrease the iron availability for *H. alvei*. *Hafnia alvei* had no major impact on the expression of *B. aurantiacum* ATCC 9175^T genes involved in iron acquisition. This difference of behavior between the two *B. aurantiacum* strains might be due to two reasons. First, strain ATCC 9175^T may not have genes necessary for the uptake and/or the utilization of the siderophores produced by *H. alvei*. There are in fact several genes encoding ABC-type Fe³⁺/siderophore components or siderophore interacting proteins in strain 8(6) that don't have orthologs in strain ATCC 9175^T, and the genome of

strain 8(6) encodes more ABC-type Fe³⁺/siderophore components (30 vs. 24). Second, strain ATCC 9175^T, whose expression level of the siderophore biosynthesis cluster is higher than that of strain 8(6), may produce a sufficient amount of siderophores to support its growth in the mini-cheeses. The capacity of cheese-associated *Brevibacterium* strains to use xenosiderophores produced by other *Brevibacterium* strains was demonstrated *in vitro* [54]. In addition, stimulation of *Staphylococcus equorum* by the fungus *Scopulariopsis* was observed in experimental communities composed of cheese-associated strains, and was attributed to fungal siderophore production that relieves *S. equorum* of the costly production of the siderophore staphyloferrin B [24]. There is thus increasing evidence that iron acquisition plays an important role in the biotic interactions cheese surface microorganisms.

Our results suggest that *H. alvei* could benefit from the lipolytic activity of the two *Brevibacterium* strains. This was deduced from lipolytic plate assay, genomic analysis and transcriptomic analysis of the mini-cheeses. Indeed, no lipolytic activity was detected for *H. alvei* on tributyrin agar, and no gene encoding putative secreted triacylglycerol lipase was identified in its genome. In the presence of *B. aurantiacum* 8(6) or ATCC 9175^T, there was a strong up-regulation of *H. alvei* genes involved in the catabolism of glycerol, an energy substrate derived from triglyceride lipolysis. We may thus hypothesize that the growth of *H. alvei* is favored by the glycerol released from the cheese triglycerides through the action of the triacylglycerol lipase secreted by *Brevibacterium*.

Another potential mechanism of biotic interactions in the mini-cheeses is the proteolytic activity of *Brevibacterium*. Indeed, the investigated *Brevibacterium* strains showed proteolytic activity on calcium caseinate agar, whereas no activity was detected for *D. hansenii* and *H. alvei*. Transcriptomic data suggested that the presence of *B. aurantiacum* 8(6) or ATCC 9175^T increased nitrogen availability in the mini-cheeses for *H. alvei* and *D. hansenii*. One major change of the *H. alvei* transcriptome when it was co-cultured with *Brevibacterium* was an increased expression of the methionine catabolism pathway *via* methionine gamma-lyase. In several bacteria, such as *B. aurantiacum* [48], *Pseudomonas putida* [55] and *Citrobacter freundii* [56], it has been shown that the expression of the methionine gamma-lyase gene is induced by methionine. The methanethiol released in this reaction is a precursor for a wide variety of volatile sulfur compounds (VSCs) that contribute to cheese flavor [57]. Our results suggest that the catabolism of methionine by *H. alvei*, and in consequence its production of VSCs, are probably stimulated by the proteolytic activity of other cheese microorganisms.

The transcriptomic data revealed differences in the expression of the sulfur metabolism in *B. aurantiacum* ATCC 9175^T and *B. aurantiacum* 8(6). In absence of *H. alvei*, the genes involved in sulfur assimilation and sulfur amino acid biosynthesis were more expressed in strain 8(6) than in ATCC 9175^T and co-cultivation of these strains with *H. alvei* impacted only the expression of the genes in strain 8(6), where a strong repression was observed. This suggests that there was a lower availability of sulfur amino acids in strain 8(6) than in ATCC 9175^T and that the presence of *H. alvei* increased sulfur amino acid availability. Interestingly, as discussed above, in the present study we also presumed a similar difference between the *Brevibacterium* strains concerning the availability in iron. Currently, we don't know if there is a metabolic relation between iron availability and sulfur amino acid availability in *Brevibacterium* strains growing in cheese. One may speculate that in absence of *H. alvei*, the poor growth of *B. aurantiacum* 8(6) that resulted from the low iron availability also limited the amount of proteases secreted in the cheese, which consequence would be a low amount of free sulfur amino acids in the cheese. More experiments are needed to confirm or invalidate this hypothesis.

The present study also indicated that the D-galactonate catabolism genes of *B. aurantiacum* 8(6) and *H. alvei* GB001 were expressed during their growth in cheese. To our knowledge, the presence of D-galactonate in cheeses had never been investigated before. However, it was hypothesized that in some cheese varieties this compound could be produced by oxidation of residual lactose or galactose, and subsequently used as a growth substrate by some cheese microorganisms such as *Glutamicibacter arilaitensis* [58]. In the present study, we were able to detect galactonate in our mini-cheeses, albeit at a low concentration (from 10 to 61 $\mu\text{mol/kg}$), which confirms that this compound can be produced by some cheese microorganisms. D-galactonate production *via* a versatile L-arabinose dehydrogenase (AraDH) from *Azospirillum brasilense* was demonstrated in an engineered *Escherichia coli* [59]. Interestingly, the genome of the yeast *Debaryomyces hansenii* encodes a putative arabinose dehydrogenase (locus tag DEHA2B12980g), which might explain galactonate production in cheese by this microorganism.

In conclusion, this study illustrated the interest of dual RNA-seq analyses to provide insight into the molecular bases of biotic interactions between cheese surface microorganisms. By combining microbial, biochemical and transcriptomic analyses of lab scale mini-cheeses, we identified potential mechanisms underlying the strain-specific mutualism between *Brevibacterium* strains and *H. alvei*. When *H. alvei* is co-cultivated with *B. aurantiacum* 8(6), the latter is probably stimulated by the siderophores produced by *H. alvei*, and in parallel it probably stimulates *H. alvei* through the secretion of proteases and lipases, which generate energy substrates (Figure 21). Several examples of microbial communities containing strains that use siderophores released by other strains have been reported [52]. This behavior, often referred to as "cheat", represents probably an adaptive trait in environments in which siderophore production is functionally redundant. However, in the present example, there is rather a mutualistic interaction between the siderophore producer and its recipient. In the future, it could be interesting to take into account the iron acquisition systems of cheese-associated strains in order to improve the selection of the ripening culture components and their association in mixed cultures. In addition, it is possible that the iron metabolism of ripening cultures can influence the growth of adventitious strains or of pathogens at the surface of cheeses.

Figures

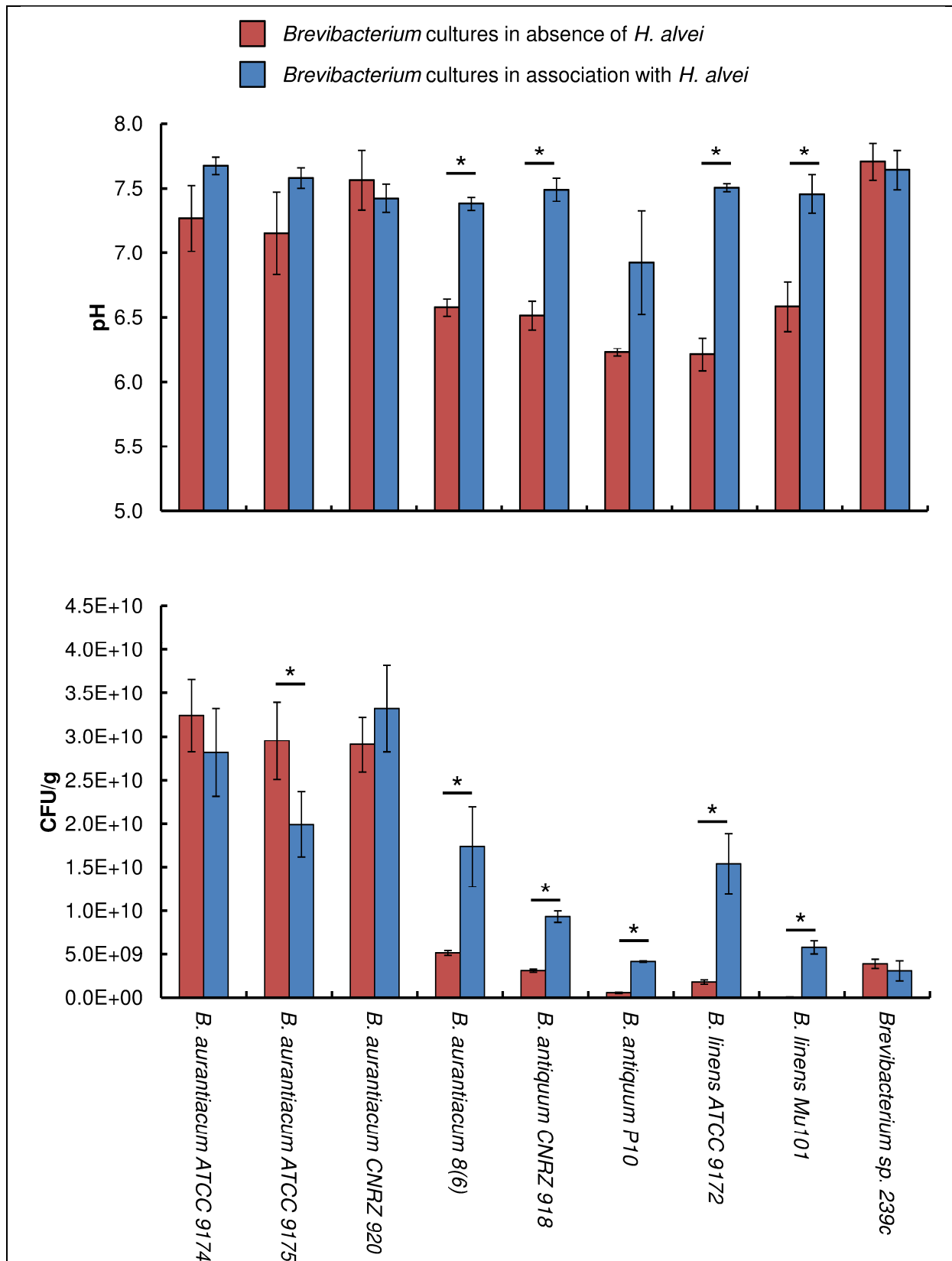


Figure 1. pH values and *Brevibacterium* counts at day 28 in mini-cheeses inoculated with a *Brevibacterium* strain in absence or in presence of *H. alvei*. The error bars represent the standard deviations (three cheese replicates), the asterisks indicate a significant difference between two conditions ($p < 0.05$, t-test).

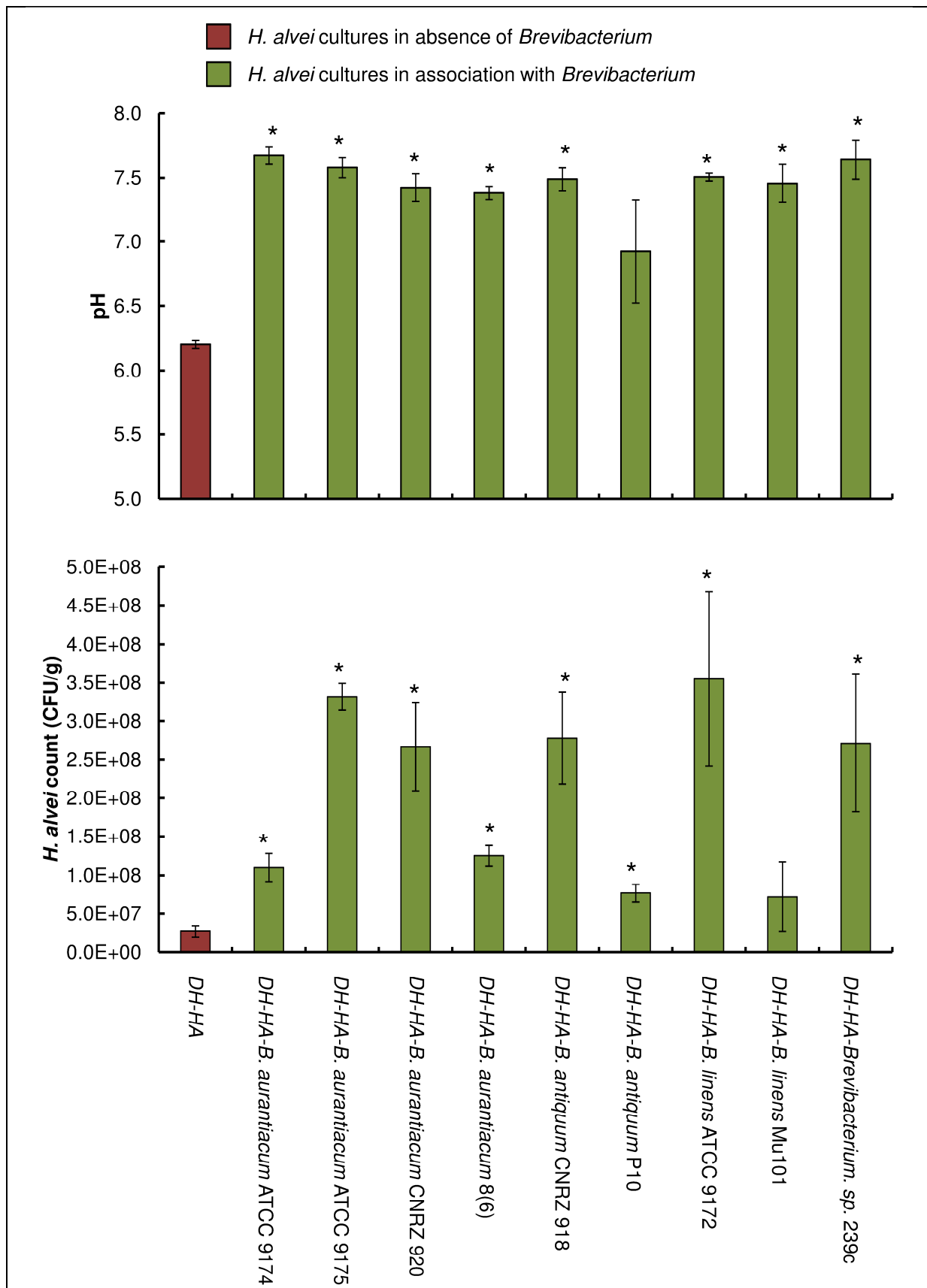


Figure 2. pH values and *Hafnia alvei* counts at day 28 in mini-cheeses inoculated with *H. alvei* in absence or in presence of a *Brevibacterium* strain. The error bars represent the standard deviations (three cheese replicates), the asterisks indicate a significant difference between the mini-cheeses inoculated with *H. alvei* in presence versus in absence of *Brevibacterium* strains ($p < 0.05$, t-test). The conditions are named according to the microorganisms present in the mini-cheeses; DH and HA correspond to the presence of *D. hansenii* and *H. alvei*, respectively.

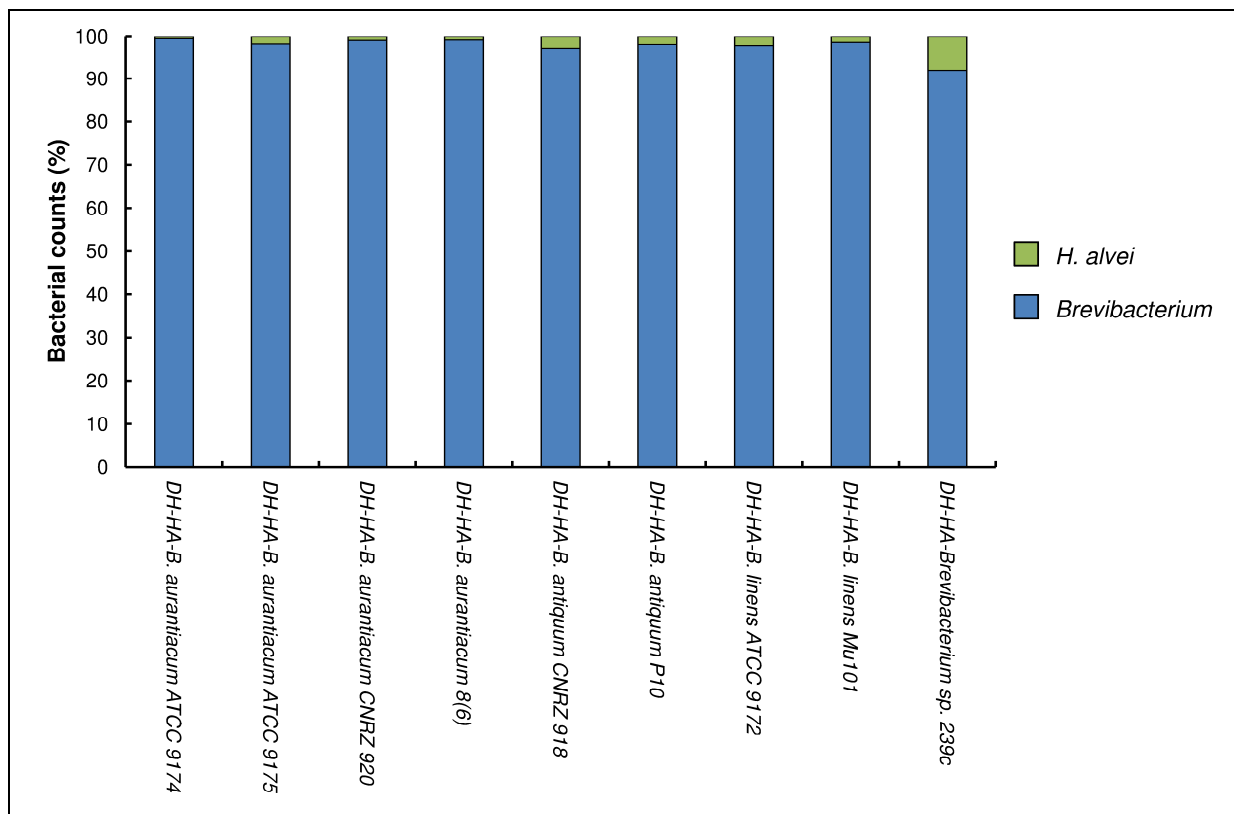


Figure 3. Distribution of bacterial counts at day 28 in the mini-cheeses co-inoculated with *Hafnia alvei* and a *Brevibacterium* strain. The conditions are named according to the microorganisms present in the mini-cheeses; DH and HA correspond to the presence of *D. hansenii* and *H. alvei*, respectively.

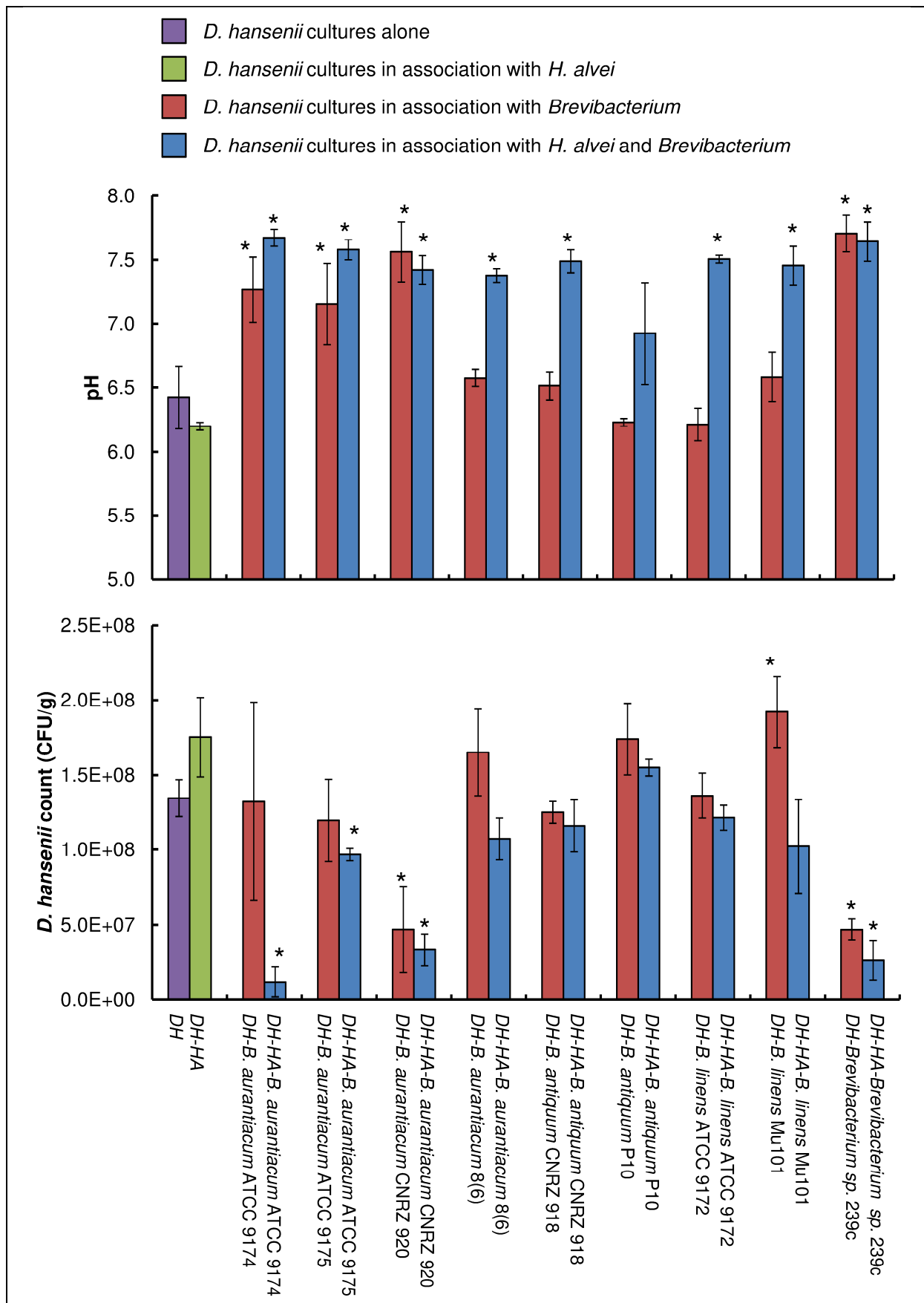
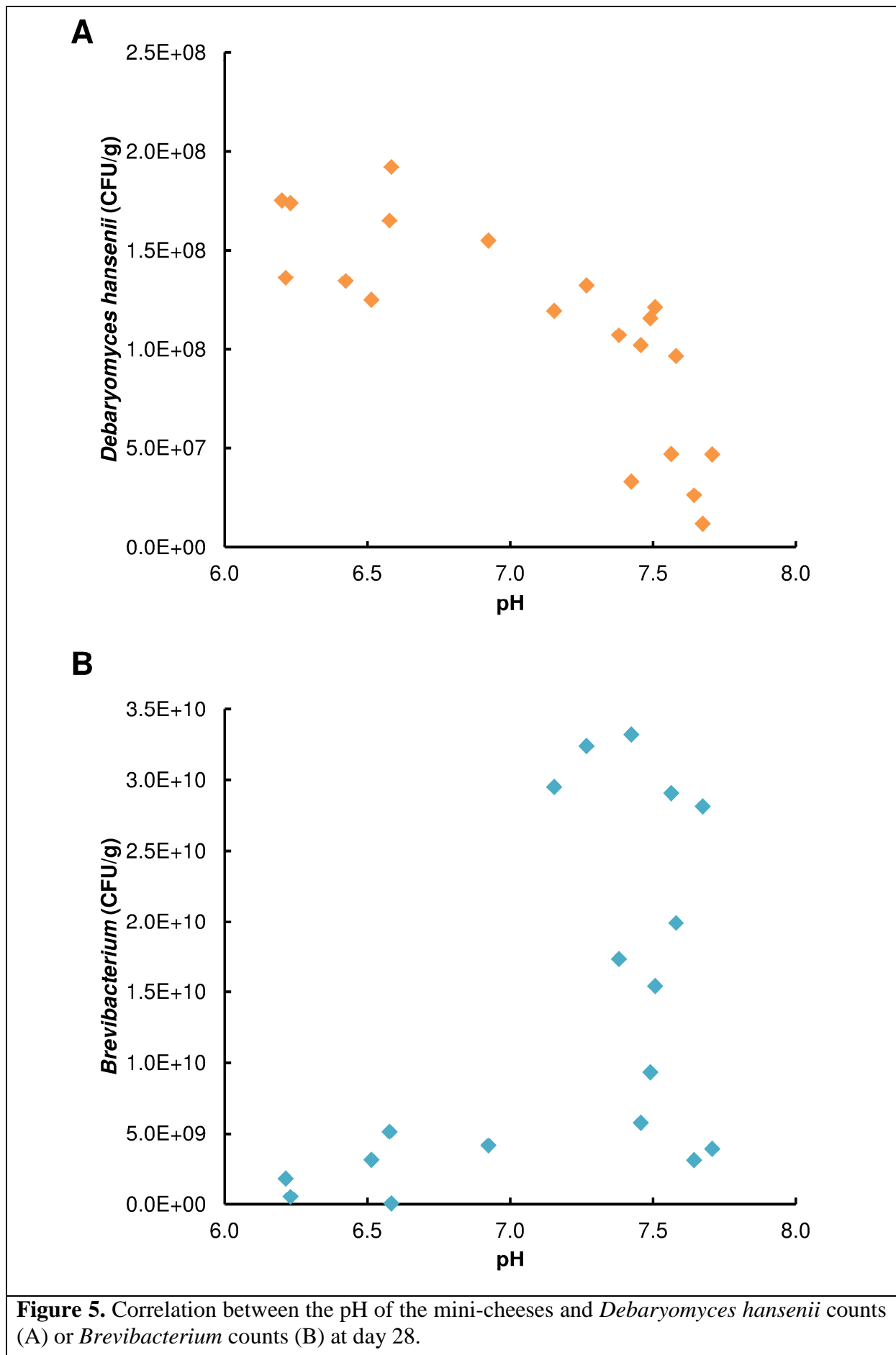


Figure 4. pH values and *Debaryomyces hansenii* counts in the mini-cheeses at day 28. The error bars represent the standard deviations (three cheese replicates), the asterisks indicate a significant difference *versus* the mini-cheeses inoculated with *D. hansenii* alone ($p < 0.05$, t-test). The conditions are named according to the microorganisms present in the mini-cheeses; DH and HA correspond to the presence of *D. hansenii* and *H. alvei*, respectively.



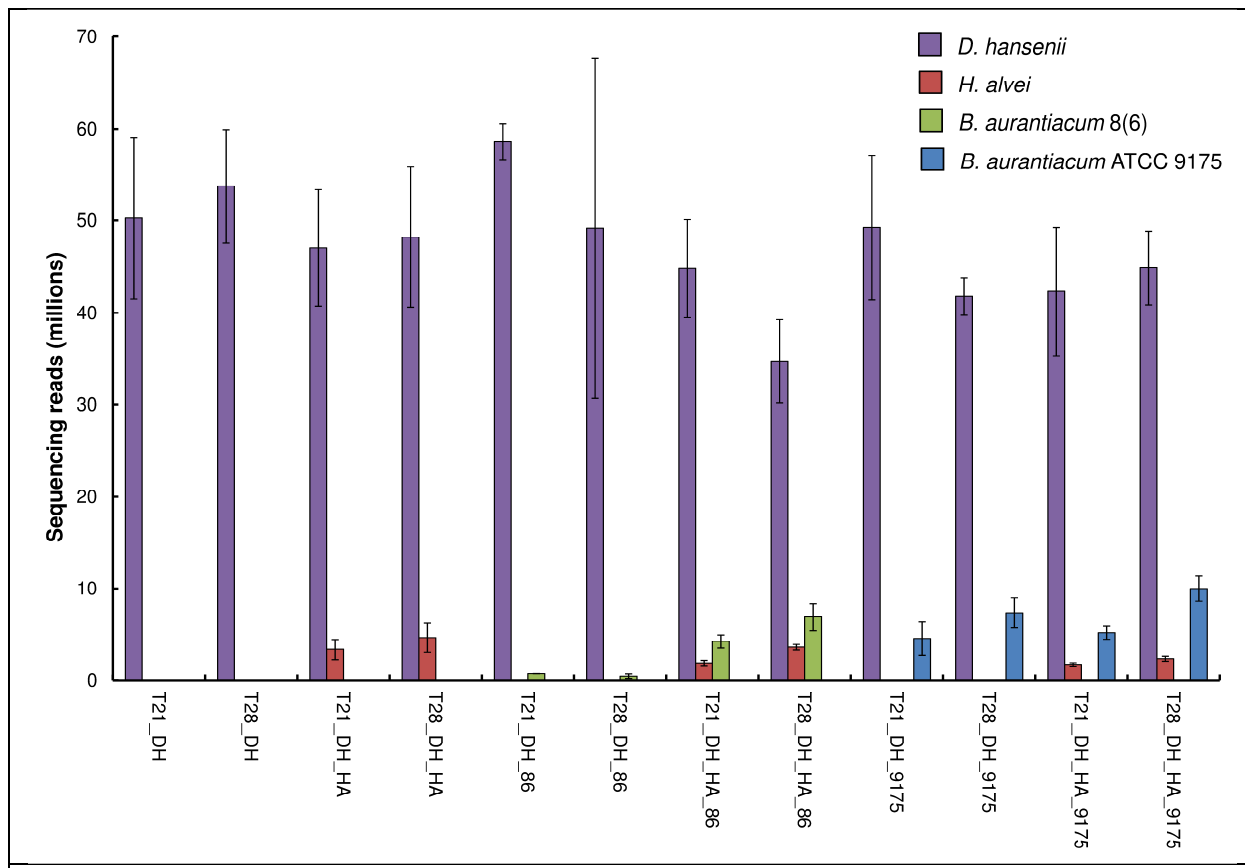
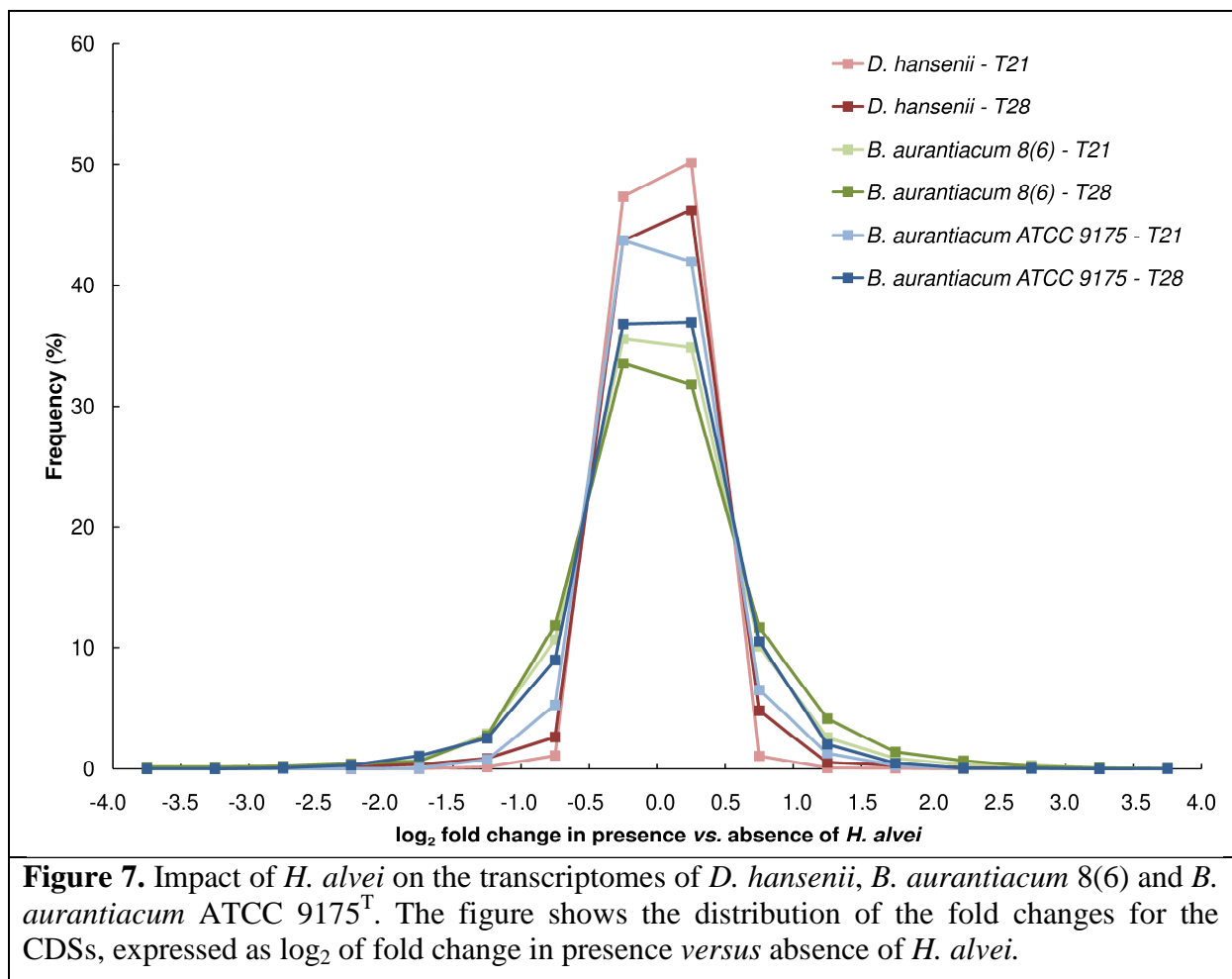
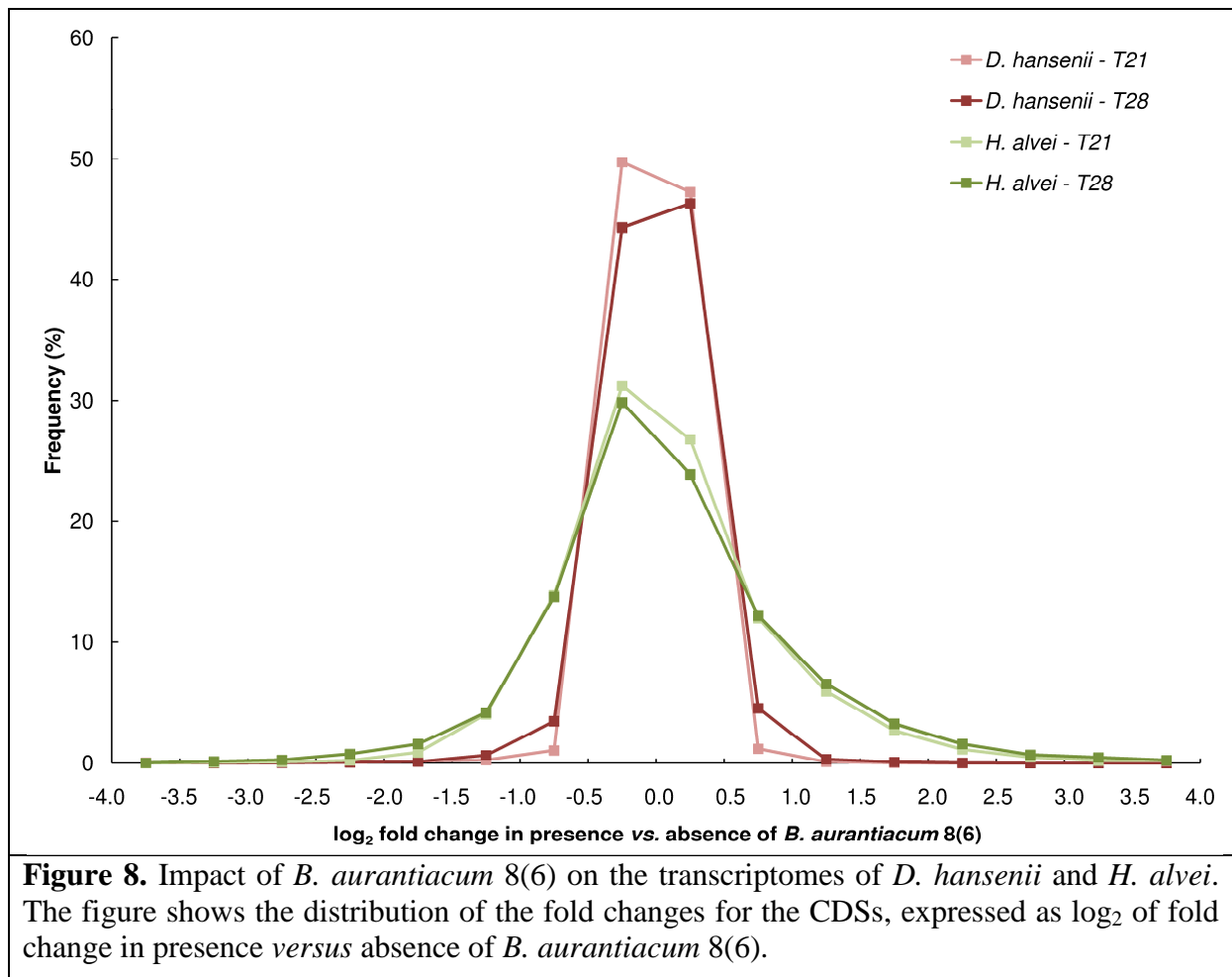
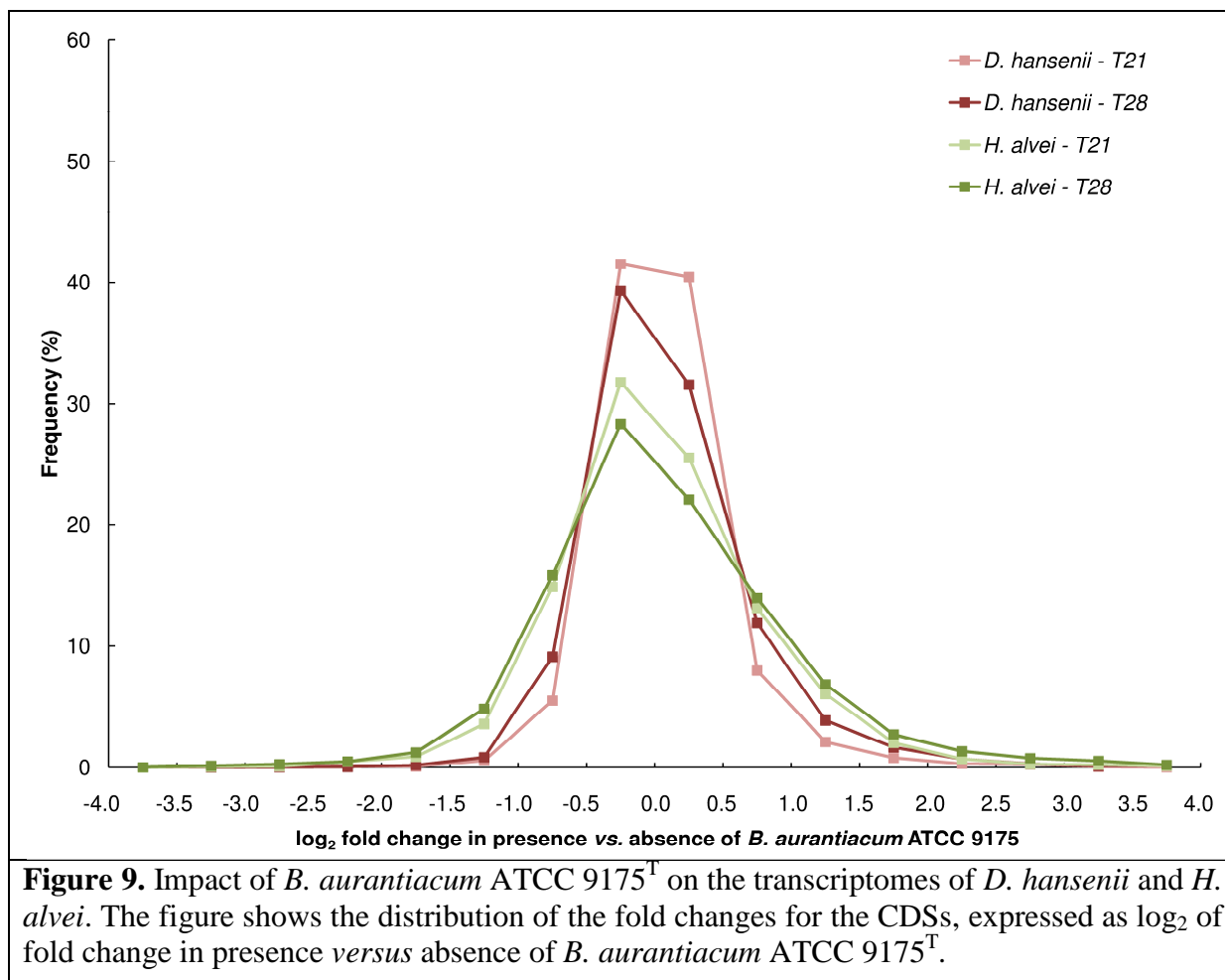
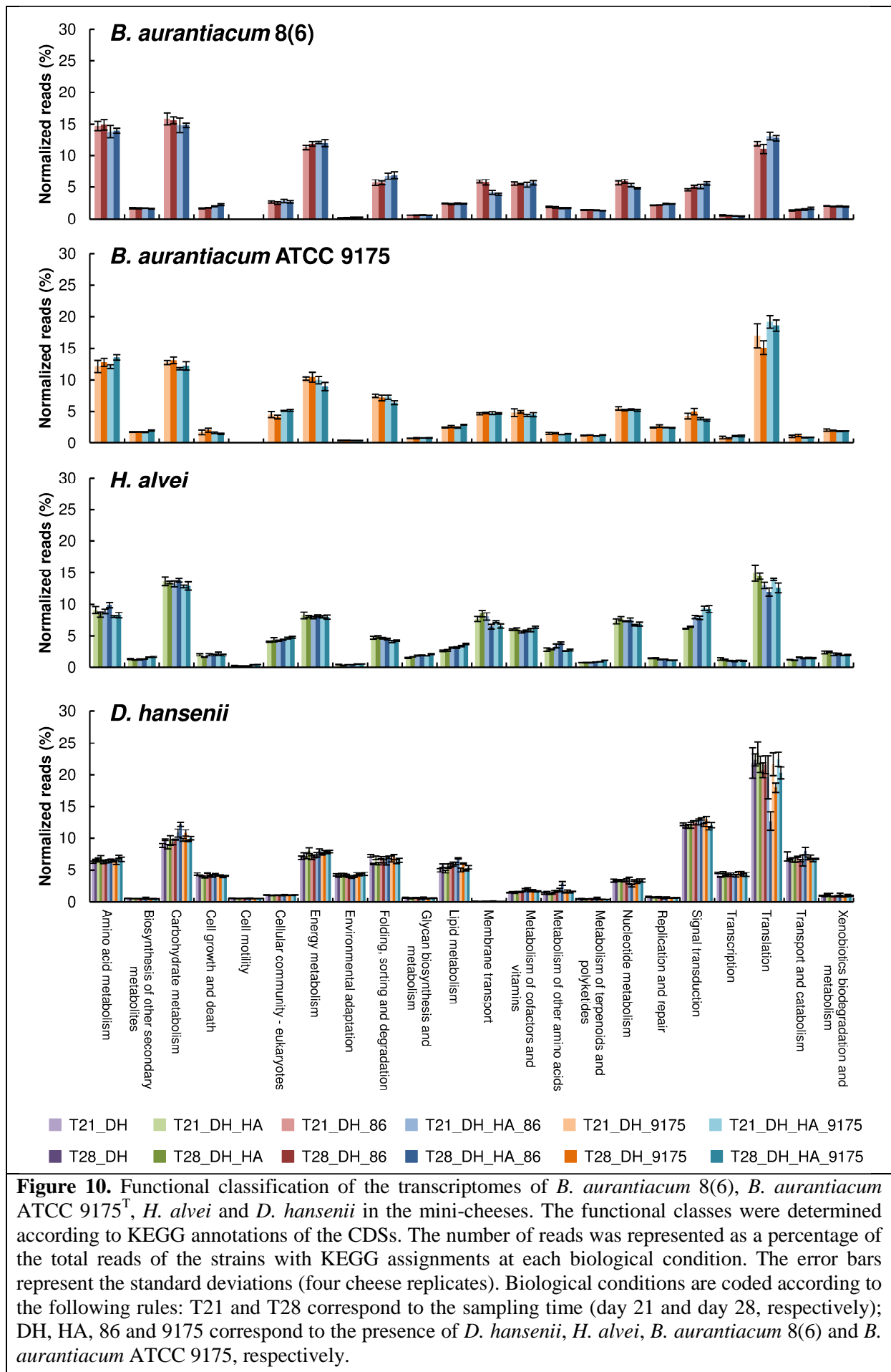


Figure 6. Distribution of the sequencing reads that mapped to unique sequences of the CDSs databases established from the reference genomes. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.









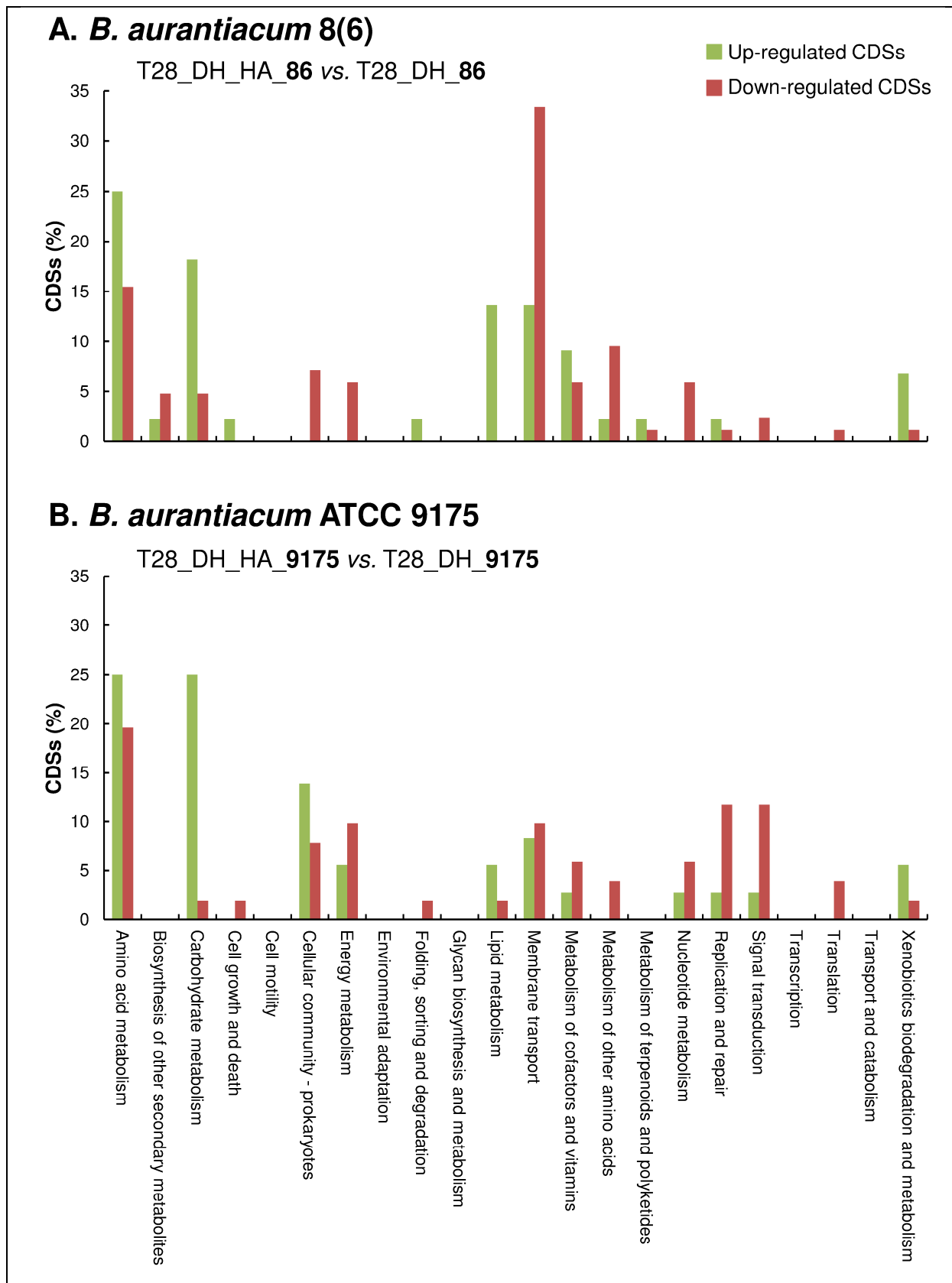
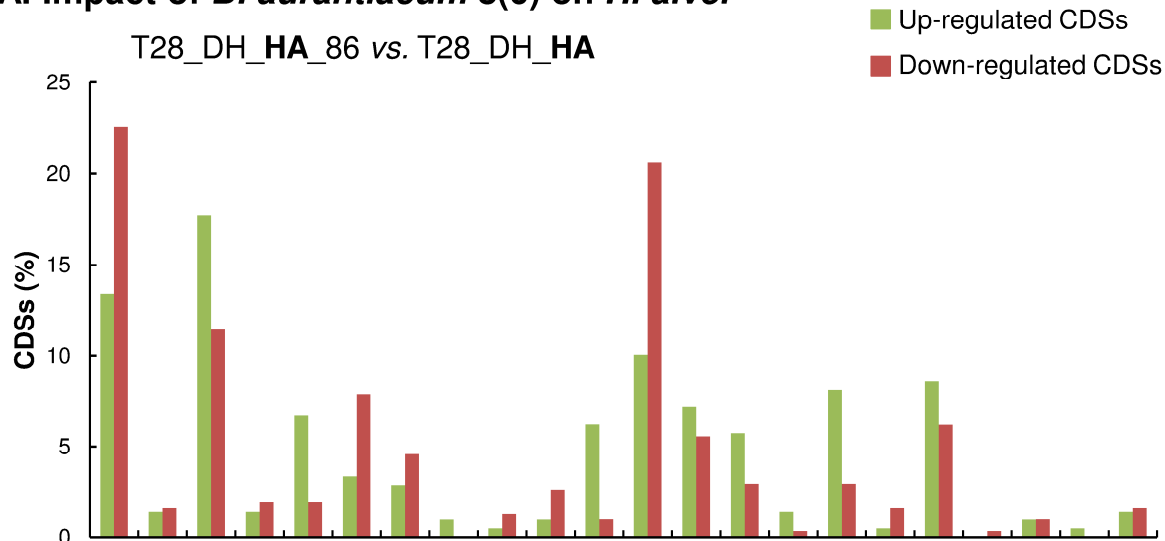


Figure 11. Functional classification of the CDSs of *B. aurantiacum* 8(6) (A) and *B. aurantiacum* ATCC 9175^T (B) that were differentially expressed in presence *versus* absence of *H. alvei* at day 28. Differential expression analysis was done with the DESeq2 package (adjusted p-value < 0.05). For each strain, results are represented as percentages relative to the sum of the KEGG entries generated from the up- or down-regulated genes. Biological conditions are coded according to the following rules: T28 corresponds to the sampling time (day 28); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

A. Impact of *B. aurantiacum* 8(6) on *H. alvei*



B. Impact of *B. aurantiacum* ATCC 9175 on *H. alvei*

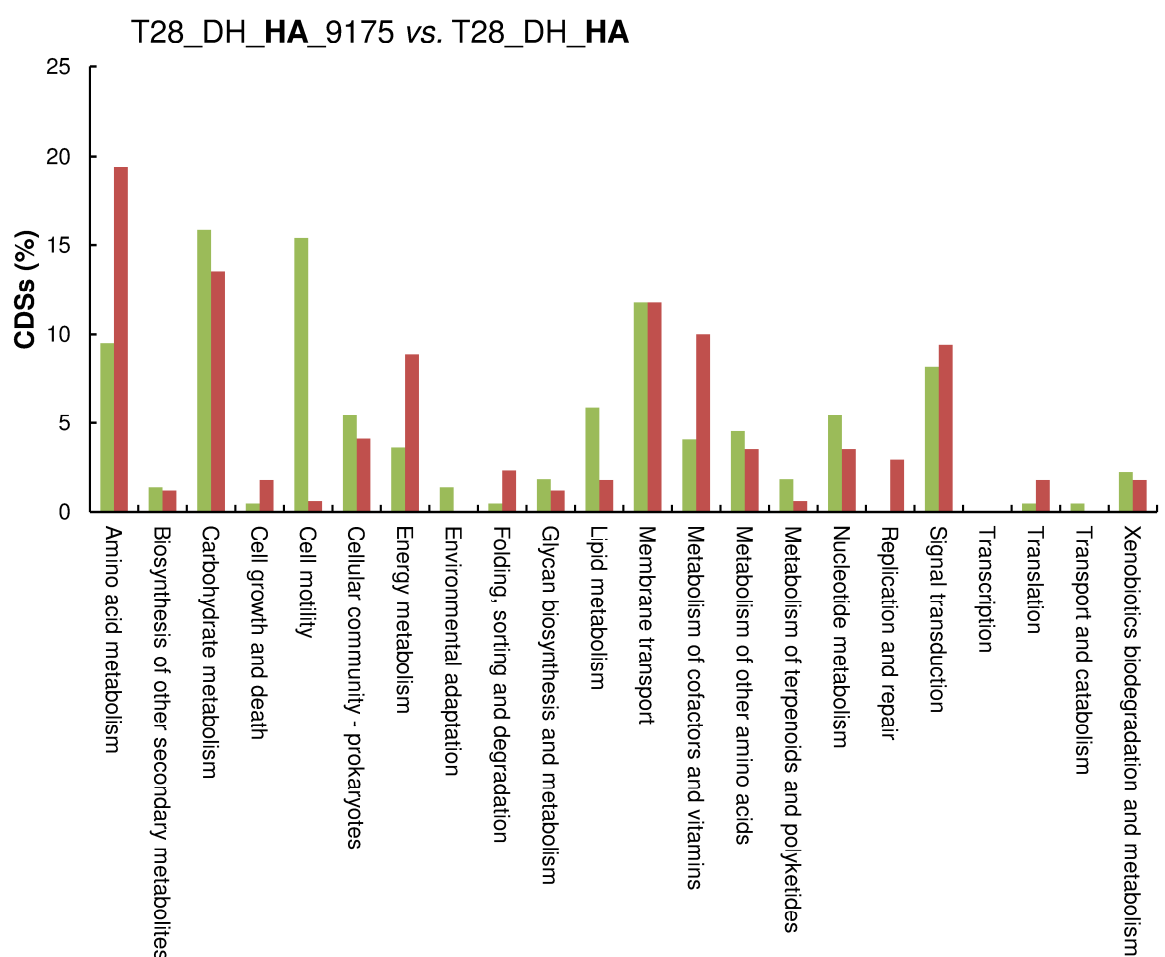
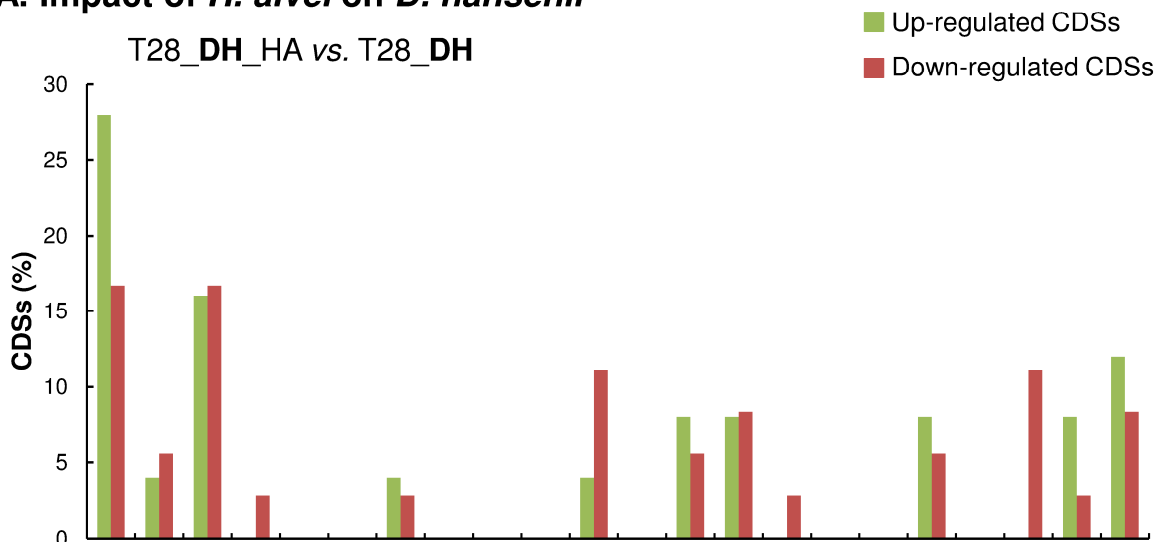


Figure 12. Functional classification of the CDSs of *H. alvei* that were differentially expressed in presence *versus* absence of *B. aurantiacum* 8(6) (A) or *B. aurantiacum* ATCC 9175 (B) at day 28. Differential expression analysis was done with the DESeq2 package (adjusted p-value < 0.05). Results are represented as percentages relative to the sum of the KEGG entries generated from the up- or down-regulated genes. Biological conditions are coded according to the following rules: T28 corresponds to the sampling time (day 28); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

A. Impact of *H. alvei* on *D. hansenii*



B. Impact of *B. aurantiacum* ATCC 9175 on *D. hansenii*

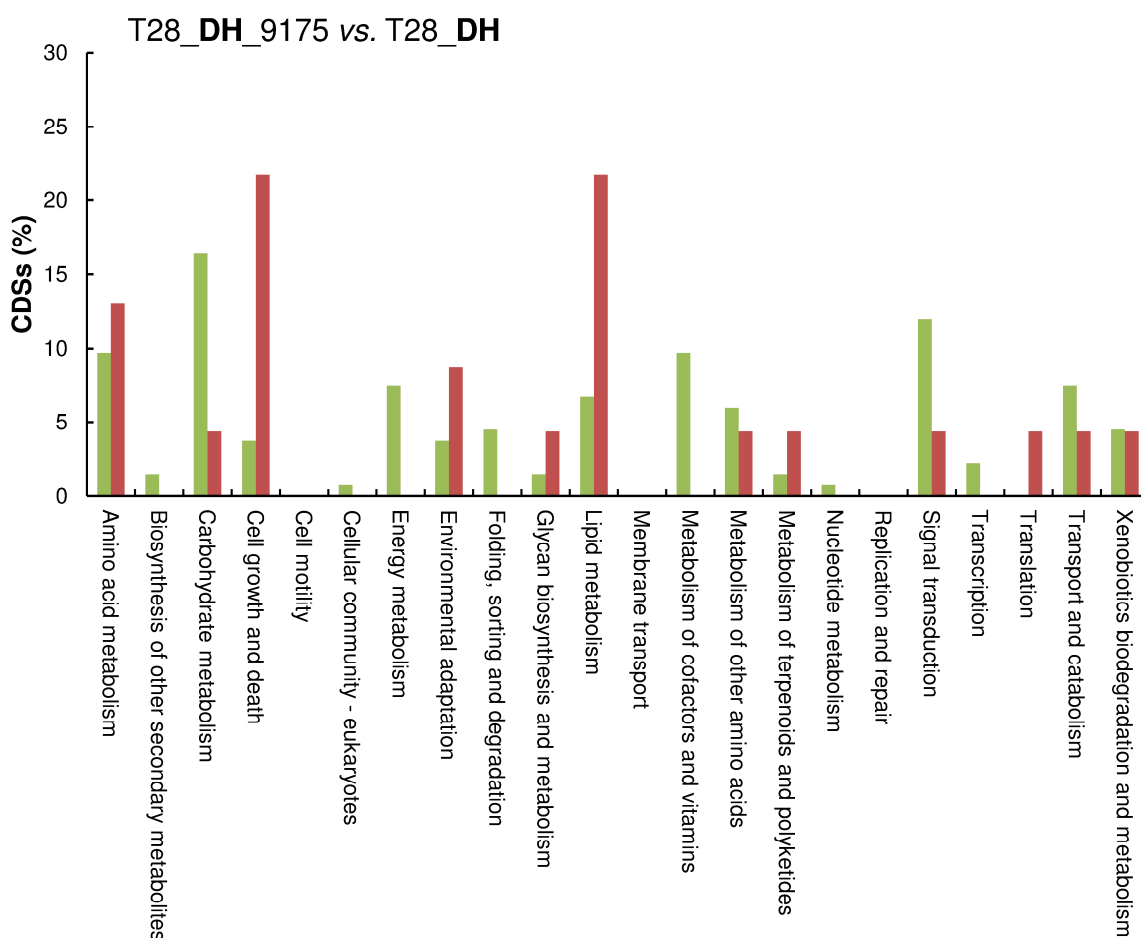
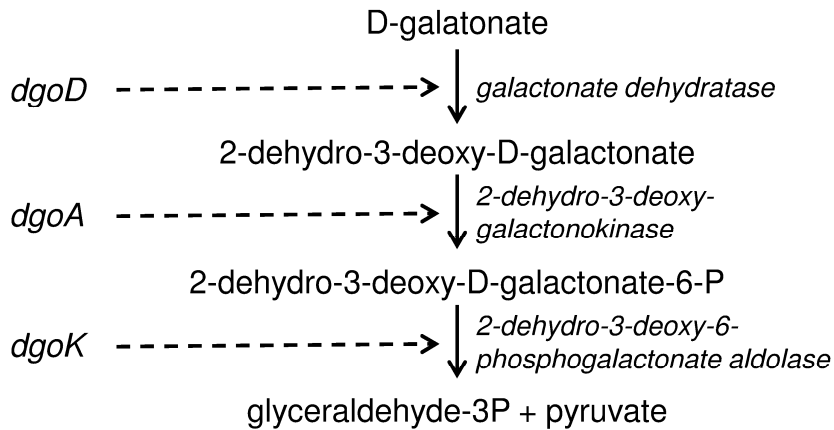


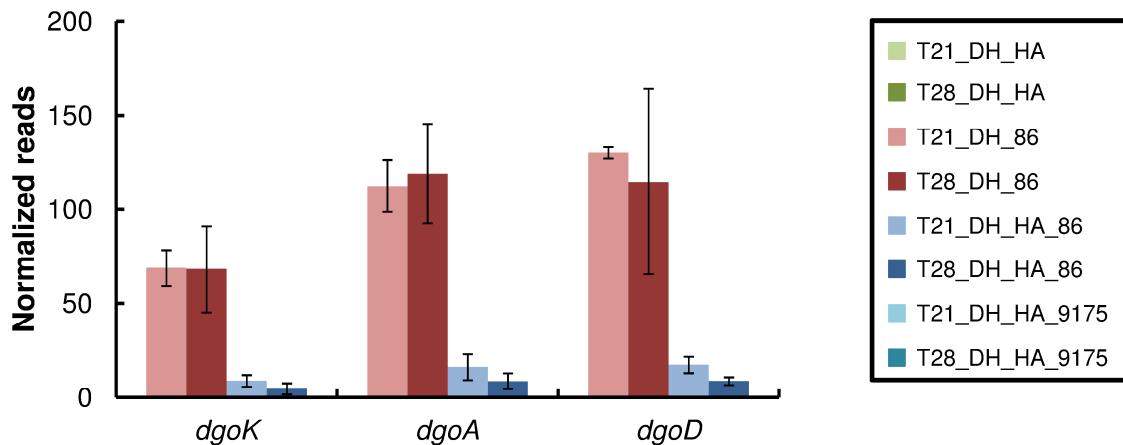
Figure 13. Functional classification of the CDSs of *D. hansenii* that were differentially expressed in presence *versus* absence of *H. alvei* (A) or *B. aurantiacum* ATCC 9175 (B) at day 28. Differential expression analysis was done with the DESeq2 package (adjusted p-value < 0.05). Results are represented as percentages relative to the sum of the KEGG entries generated from the up- or down-regulated genes. Biological conditions are coded according to the following rules: T28 corresponds to the sampling time (day 28); DH, HA and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei* and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

A. D-galactonate catabolism by the De Ley-Doudoroff pathway



B. Expression level of genes involved in D-galactonate catabolism

B. aurantiacum 8(6)



H. alvei

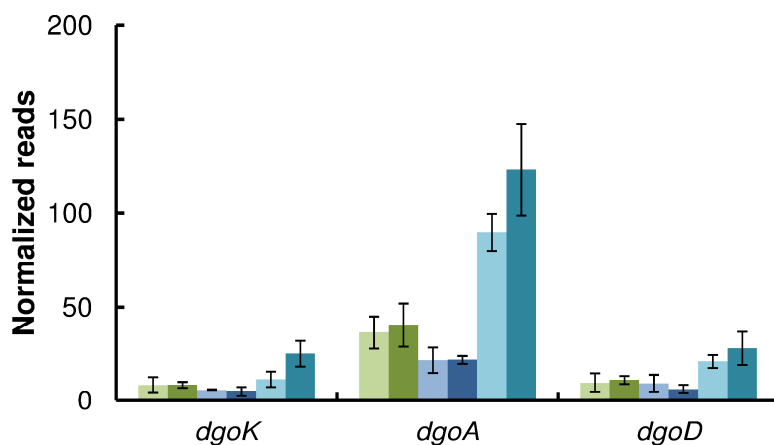


Figure 14. Expression of the D-galactonate catabolism pathway of the bacteria in the mini-cheeses. **A.** Scheme of D-galactonate catabolism by the De Ley-Doudoroff pathway. *dgoD*, *dgoA* and *dgoK* correspond to the genes encoding for galactonate dehydratase, 2-dehydro-3-deoxy-galactonokinase and 2-dehydro-3-deoxy-6-phosphogalactonate aldolase, respectively. **B.** Expression levels of the genes involved in D-galactonate catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *H. alvei*. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

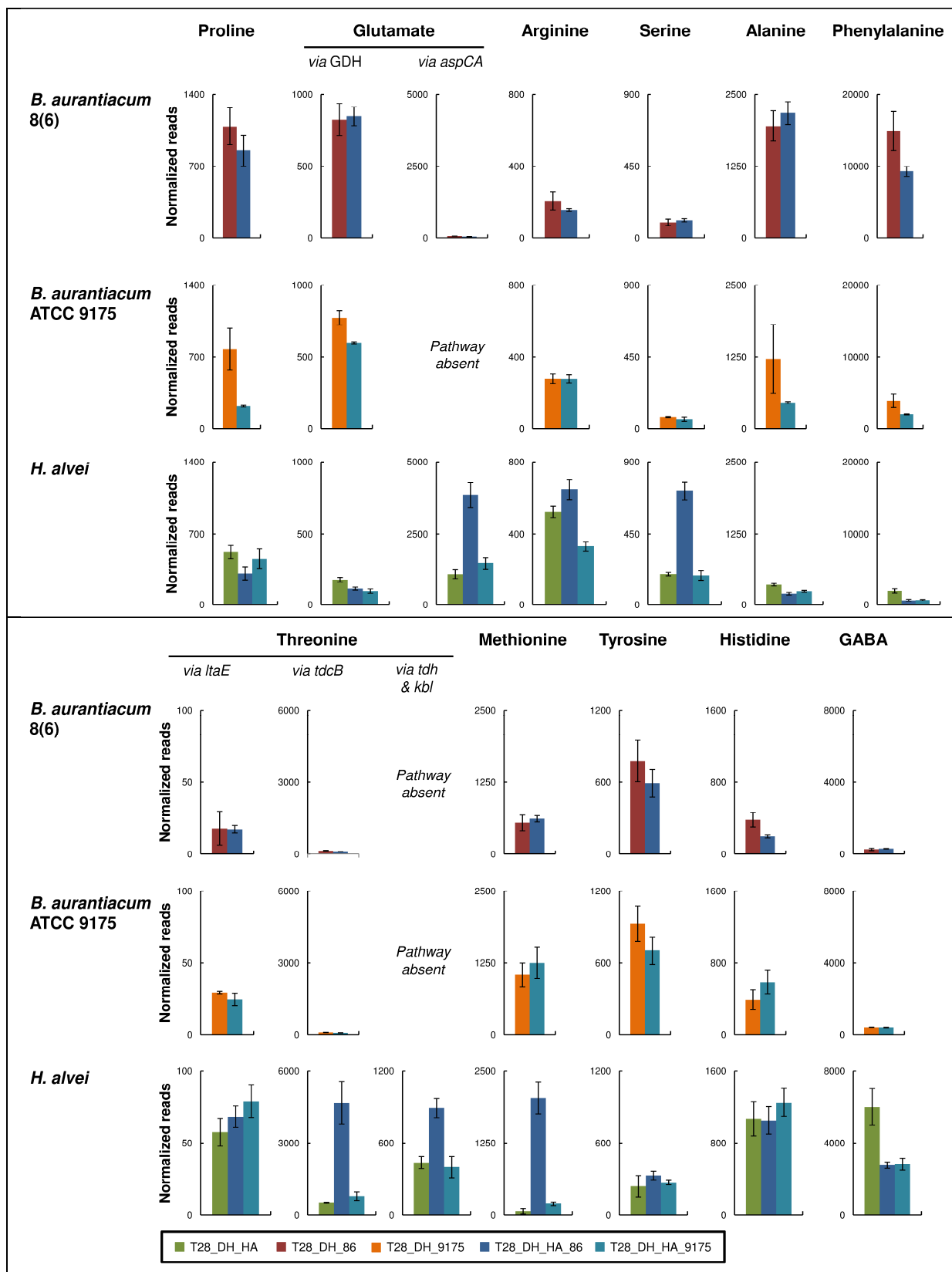


Figure 15. Expression of amino acid catabolism pathways of the bacteria in the mini-cheeses. The expression level of each pathway is represented as the sum of the sequencing reads that mapped to the genes of the corresponding pathway. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: T28 corresponds to the sampling time (day 28); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. GDH, glutamate dehydrogenase; *aspC*, aspartate aminotransferase; *aspA*, aspartate ammonia-lyase; *ltaE*, L-threonine aldolase; *tdcB*, threonine ammonia-lyase; *tdh*, L-threonine 3-dehydrogenase; *kbl*, 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase; GABA, gamma-aminobutyrate.

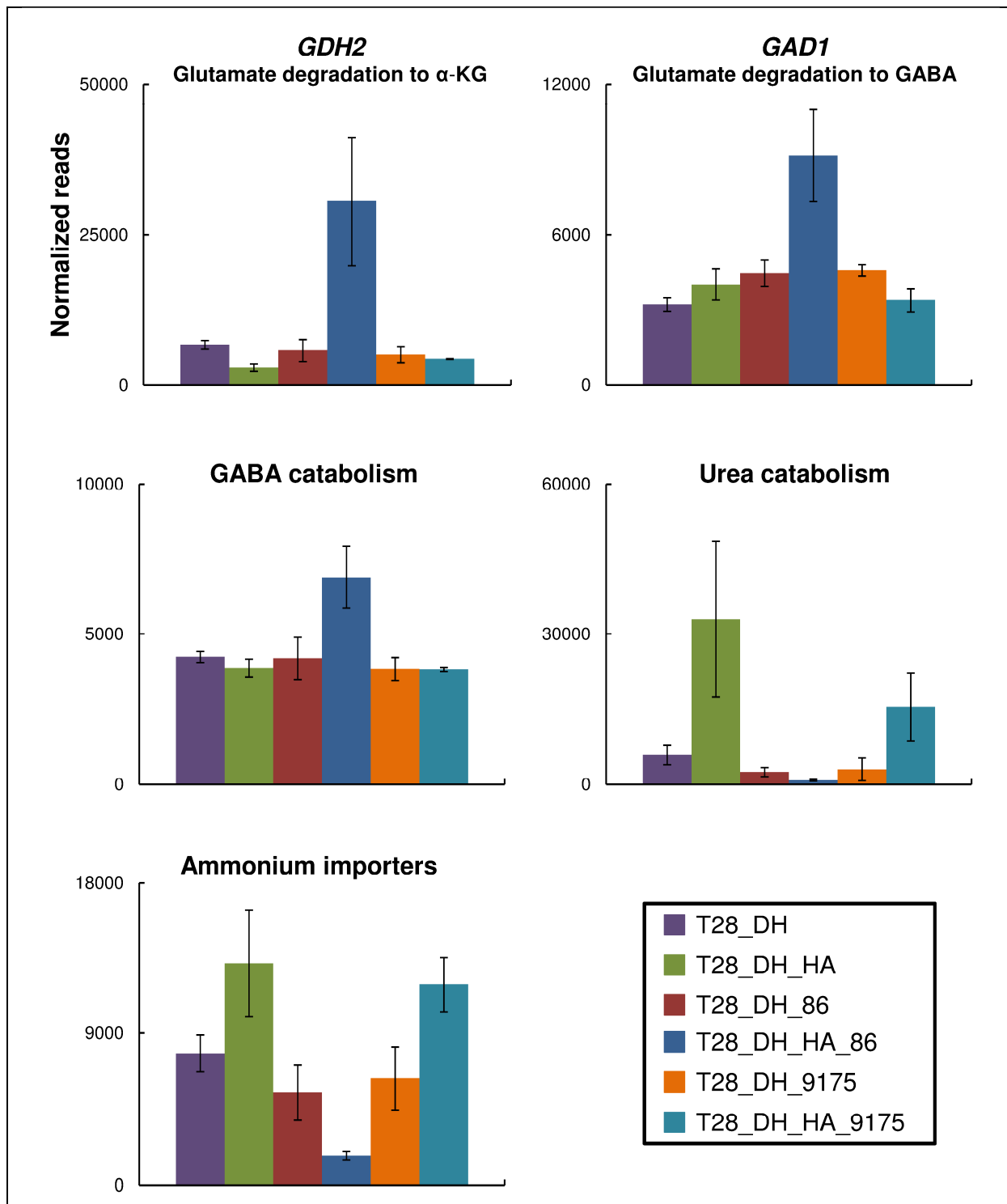


Figure 16. Expression of selected genes of *D. hansenii* involved in nitrogen catabolism. The expression level of GABA catabolism or urea catabolism pathway is represented as the sum of the sequencing reads that mapped to the genes of the corresponding pathway. The expression level of the ammonium importers is represented as the sum of the sequencing reads that mapped to the corresponding genes. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: T28 corresponds to the sampling time (day 28); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. α -KG, alpha-ketoglutarate; GABA, gamma-aminobutyrate.

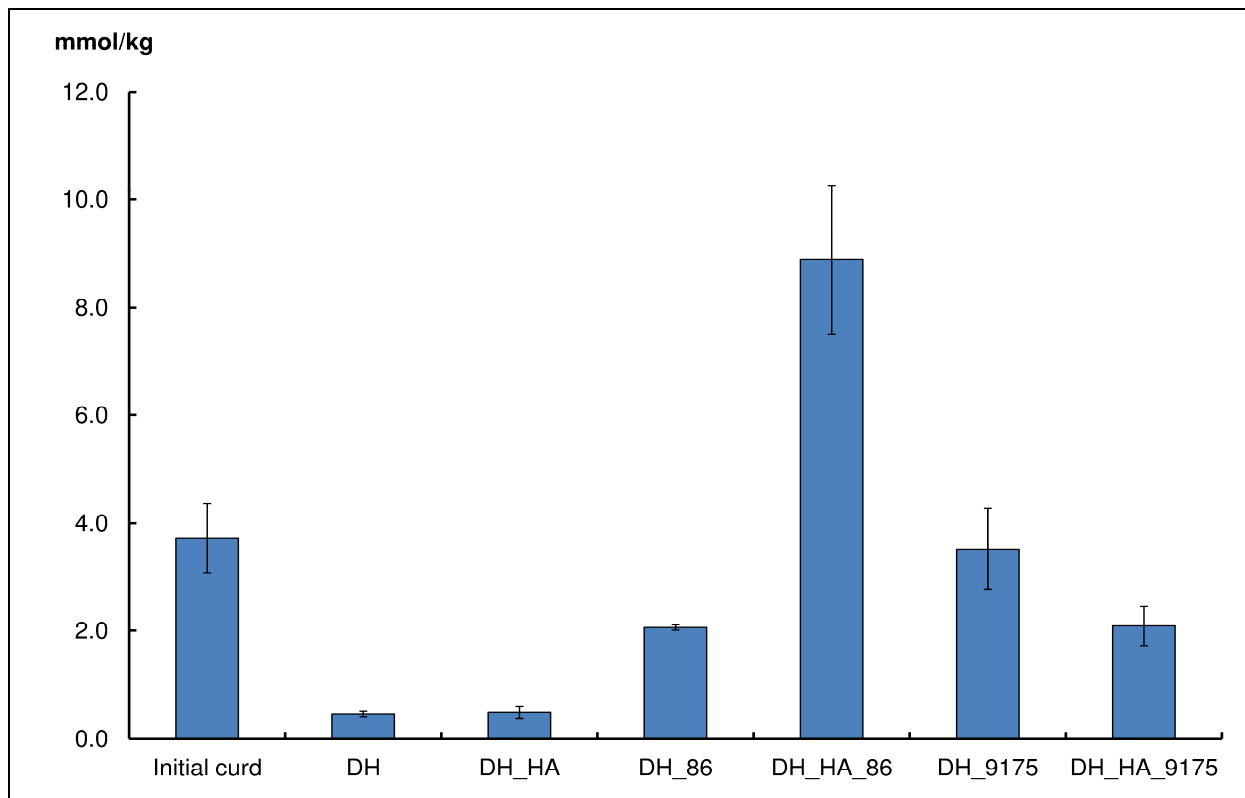


Figure 17. Total concentration of free amino acids in the mini-cheeses after 28 days of ripening. The error bars represent the standard deviations (three cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

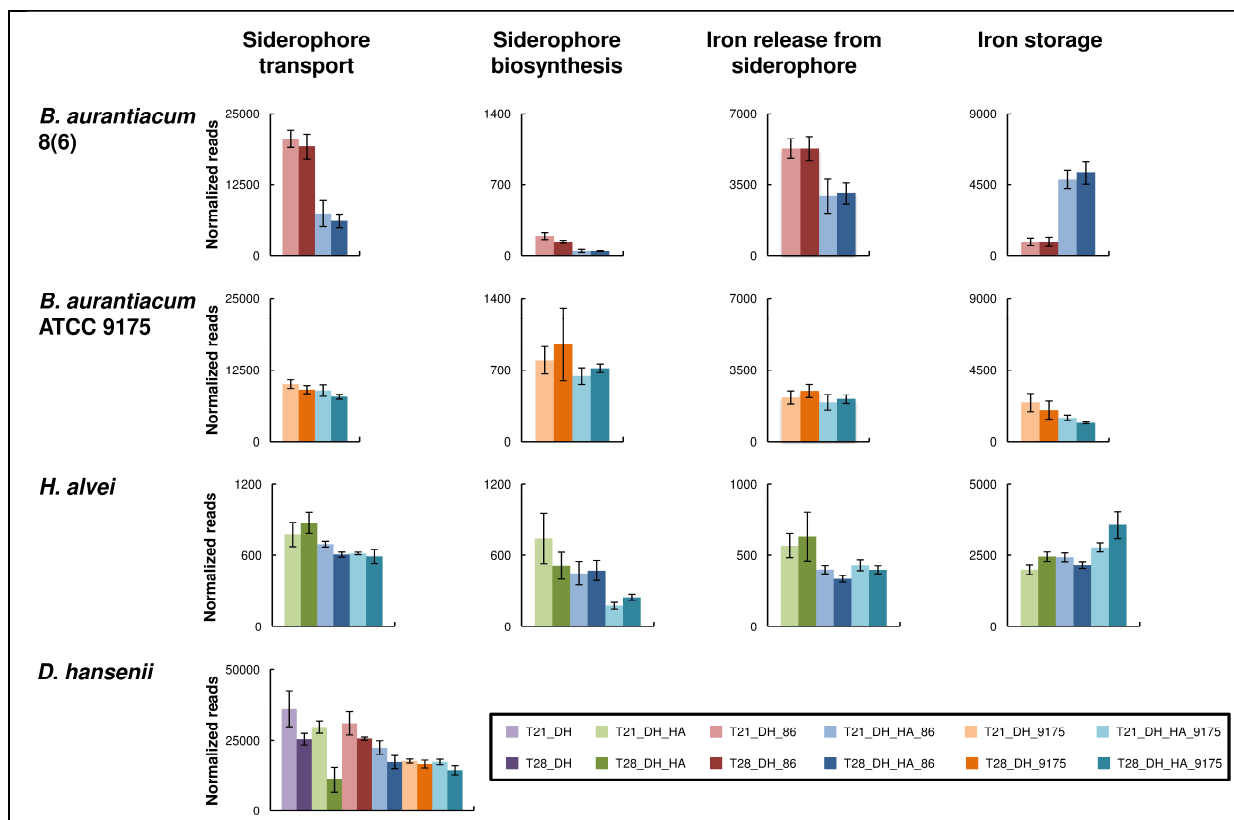


Figure 18. Expression of genes involved in iron acquisition in the mini-cheeses. The expression level for each type of genes is represented as the sum of the sequencing reads that mapped to the corresponding genes. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000 (bacteria) or 10,000,000 (yeast). The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Biological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively.

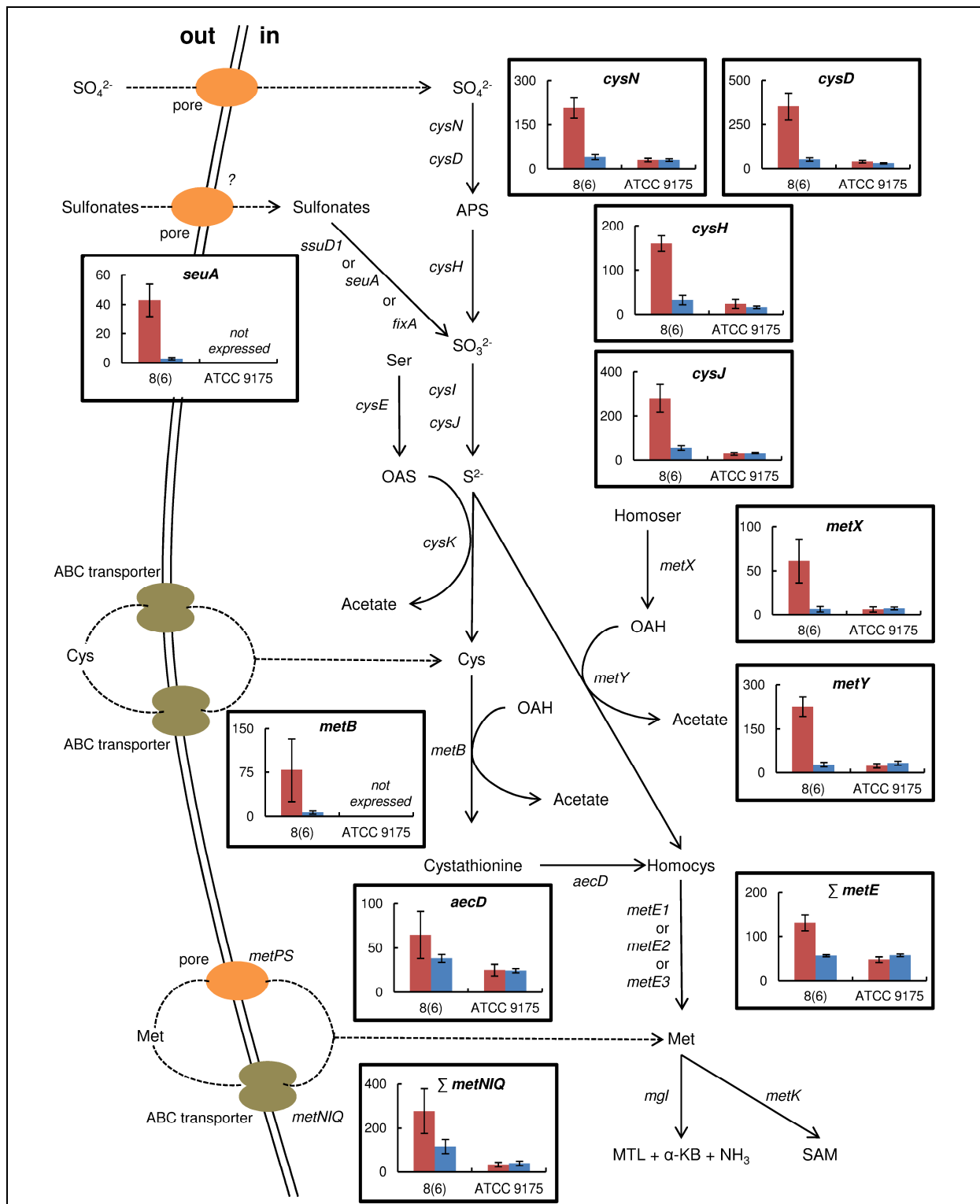


Figure 19. Expression level at day 28 of selected genes involved in sulfur metabolism in *Brevibacterium* strains grown in absence (red) or in presence (blue) of *H. alvei*. The expression level of the methionine synthases (*metE*) or of the high affinity methionine ABC transporter (*metNIQ*) is represented as the sum of the sequencing reads that mapped to the corresponding genes. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). Transporter genes: *metPS*, low-affinity methionine transporter; *metNIQ*, high-affinity methionine ABC transporter. Metabolism genes: *cysND*, sulfate adenylyltransferase; *cysH*, adenylyl sulfate reductase; *ssuD1*, alkanesulfonate monooxygenase; *seuA*, reduced flavin mononucleotide (FMN₂)-dependent alkanesulfonate monooxygenase; *fixA*, electron transfer flavoprotein; *cysI*, sulfite reductase; *cysE*, serine O-acetyltransferase; *cysK*, O-acetylserine-thiol-lyase; *metB*, cystathionine gamma-synthase; *aecD*, cystathionine beta-lyase; *metX*, homoserine O-acetyltransferase; *metY*, O-acetylhomoserine-thiol-lyase; *metE1-3*, cobalamin-independent methionine synthase; *mgl*, methionine gamma-lyase; *metK*, S-adenosylmethionine synthase. Compounds: APS, adenylyl sulfate; Ser, serine; OAS, O-acetylserine; Cys, cysteine; Homocys, homocysteine; Homoser, homoserine; OAH, O-acetylhomoserine; Met, methionine; MTL, methanethiol; α -KB, alpha-ketobutyrate; SAM, S-adenosylmethionine.

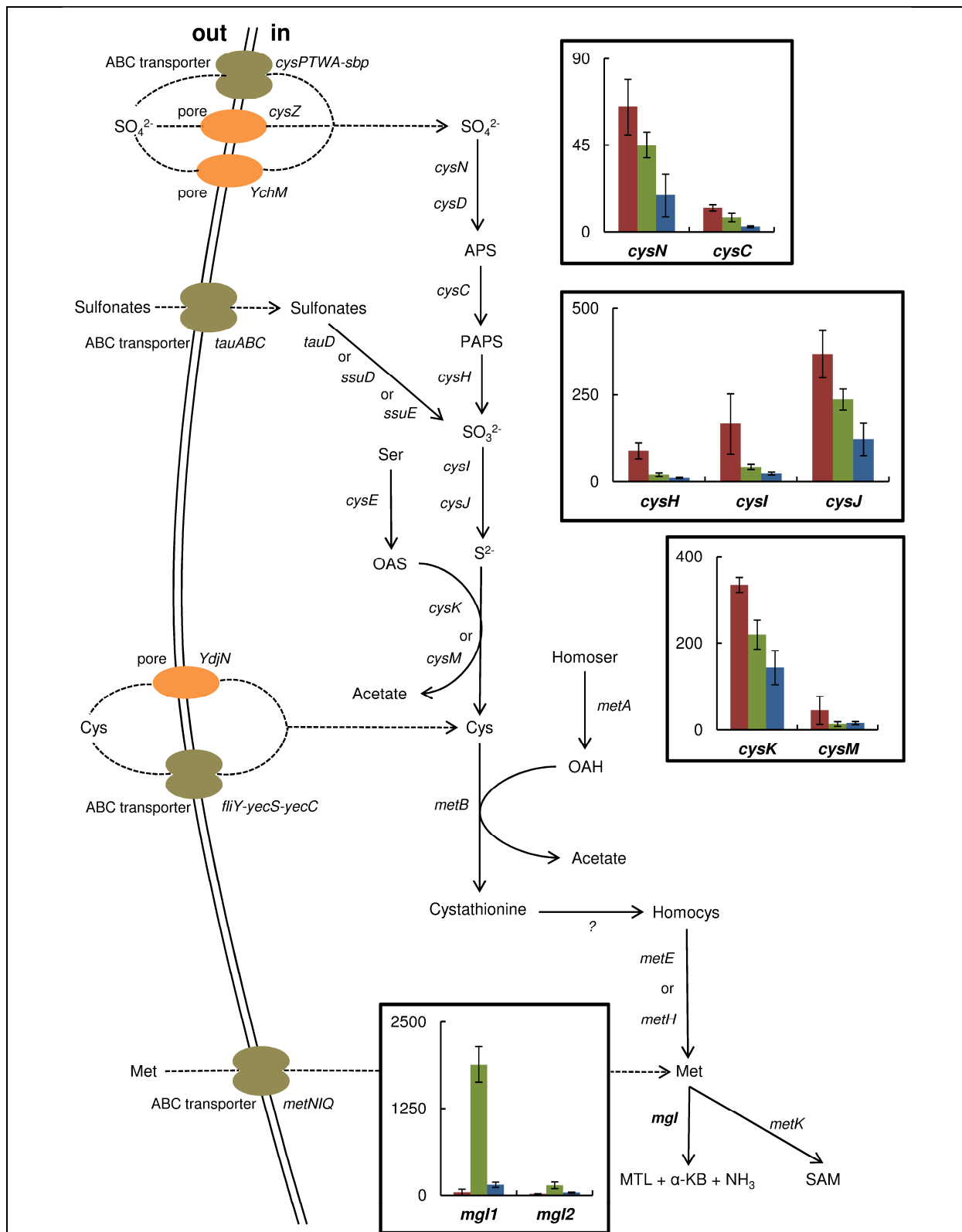


Figure 20. Expression level at day 28 of selected genes involved in sulfur metabolism in *H. alvei* grown in absence of *Brevibacterium* (red) or grown in presence of *B. aurantiacum* 8(6) (green) or of *B. aurantiacum* ATCC 9175 (blue). Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The error bars represent the standard deviations (four cheese replicates). *mgl1* corresponds to Ga0116594_105962, *mgl2* corresponds to Ga0116594_100764. Transporter genes: *cysPTWA-sbp*, sulfate ABC transporter; *YchM*, sulfate permease; *cysZ*, pH dependent sulfate transporter; *tauABC*: taurine ABC transporter; *ydjN*, cystine transporter; *fliY-yecS-yecC*, cystine ABC transporter; *metNIQ*, high-affinity methionine ABC transporter. Metabolism genes: *cysND*, sulfate adenylyltransferase; *cysC*, adenylylsulfate kinase; *cysH*, phosphoadenylylsulfate reductase; *tauD*, taurine dioxygenase; *ssuD*, alkanesulfonate monooxygenase; *ssuE*, flavin mononucleotide (FMN) reductase; *cysII*, sulfite reductase; *cysE*, serine O-acetyltransferase; *cysK*, cysteine synthase A; *cysM*, cysteine synthase B; *metA*, homoserine O-succinyltransferase; *metB*, cystathionine gamma-synthase; *metE*, cobalamin-independent methionine synthase; *metH*, cobalamin-dependent methionine synthase; *mgl*, methionine gamma-lyase; *metK*, S-adenosylmethionine synthase. Compounds: APS, adenylyl sulfate; PAPS, 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate; Ser, serine; OAS, O-acetylserine; Cys, cysteine; Homocys, homocysteine; Homoser, homoserine; OAH, O-acetylhomoserine; Met, methionine; MTL, methanethiol; α -KB, alpha-ketobutyrate; SAM, S-adenosylmethionine.

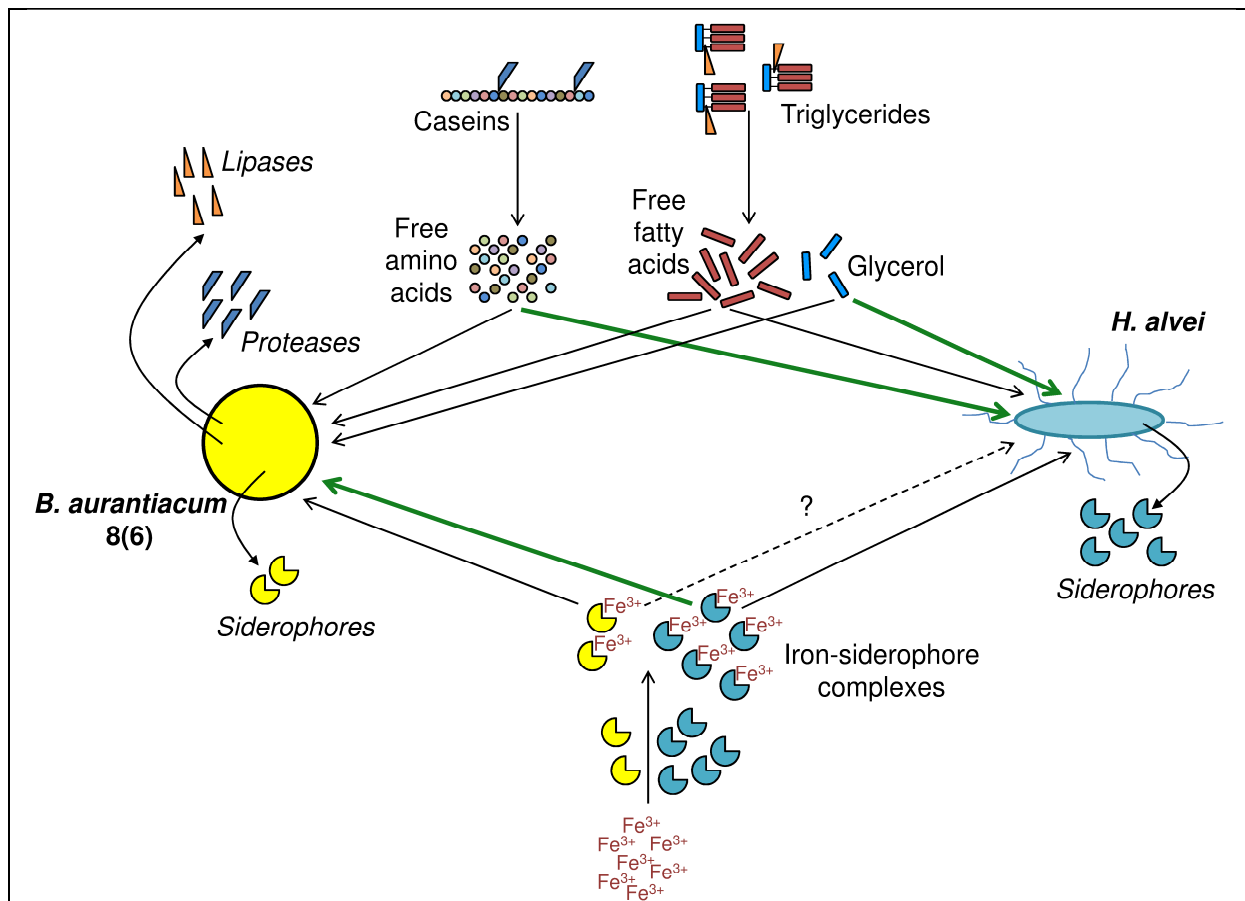


Figure 21. Proposed mechanisms involved in the mutualistic relationship between *B. aurantiacum* 8(6) and *H. alvei*. Green lines indicate processes by which a strain could stimulate its partner. Whether *H. alvei* is able to use siderophores produced by *B. aurantiacum* is not known.

Tables

Table 1. Strains used in the present study.

Species	Strain ^a	Source
Bacteria		
<i>Brevibacterium antiquum</i>	CNRZ 918	Beaufort cheese
<i>Brevibacterium antiquum</i>	P10	Murol cheese
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9174	Romadur cheese
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9175 ^T	Camembert cheese
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	CNRZ 920	Beaufort cheese
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	8(6)	Reblochon cheese
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC 9172 ^T	Harzer cheese
<i>Brevibacterium linens</i>	Mu101	Munster cheese
<i>Brevibacterium sp.</i>	239c	Camembert cheese
<i>Hafnia alvei</i>	GB001	Soft cheese
Yeast		
<i>Debaryomyces hansenii</i>	304	Goat cheese

^aStrains are from the following collections: American Type Culture Collections (ATCC), Rockville, MD, USA; Centre National de Recherche Zootechnique (CNRZ): collection now transferred to the International Centre for Microbial Resources - Food Associated Bacteria (CIRM-BIA), Rennes France. The other strains are from the GMPA culture collection (Unité Mixte de Recherche Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Thiverval-Grignon, France)

Table 2. Statistics of sequencing read mapping to the CDSs databases.

Biological condition ^a	Total reads ^b	Mapped reads (unique sequences)	% Mapped reads (unique sequences)	Mapped to DH CDSs	Mapped to HA CDSs	Mapped to 86 CDSs	Mapped to 9175 CDSs
T21_DH	79,905,467	50,257,046	62.9	50,257,046	-	-	-
T28_DH	83,733,859	53,757,920	64.2	53,757,920	-	-	-
T21_DH_HA	80,852,459	50,375,856	62.3	47,039,407	3,336,449	-	-
T28_DH_HA	81,811,905	52,847,087	64.6	48,235,272	4,611,815	-	-
T21_DH_86	88,754,767	55,922,116	63.0	55,155,168	-	766,948	-
T28_DH_86	77,531,552	49,641,338	64.0	49,193,119	-	448,219	-
T21_DH_HA_86	82,490,590	50,891,718	61.7	44,784,521	1,918,278	4,188,919	-
T28_DH_HA_86	76,757,851	45,158,865	58.8	34,728,532	3,565,966	6,864,367	-
T21_DH_9175	77,738,704	49,229,719	63.3	44,715,326	-	-	4,514,393
T28_DH_9175	78,689,129	48,293,916	61.4	40,965,092	-	-	7,328,824
T21_DH_HA_9175	76,494,878	49,181,358	64.3	42,281,922	1,751,470	-	5,147,966
T28_DH_HA_9175	90,021,222	57,232,757	63.6	44,867,825	2,363,684	-	10,001,248

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively

^bMean of the reads from the four cheese replicates

Table 3. Proteolytic and lipolytic activities of the strains used in this study.

Species	Strain	Proteolytic activity ^a		Lipolytic activity ^b	
		15°C	25°C	15°C	25°C
Bacteria					
<i>Brevibacterium antiquum</i>	CNRZ 918	+	+	++	+
<i>Brevibacterium antiquum</i>	P10	+	++	+	+++
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9174	+++	++	++	++
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	ATCC 9175 ^T	+	+	++	++
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	CNRZ 920	+++	+++	++	++
<i>Brevibacterium aurantiacum</i>	8(6)	++	+	++	++
<i>Brevibacterium linens</i>	ATCC 9172 ^T	+	+++	++	+++
<i>Brevibacterium linens</i>	Mu101	0	+++	+	++
<i>Brevibacterium sp.</i>	239c	+++	++	++	++
<i>Hafnia alvei</i>	GB001	0	0	0	+
Yeast					
<i>Debaryomyces hansenii</i>	304	0	0	++	++

^aDetermined on calcium caseinate agar

^bDetermined on tributyrin agar

All tests were carried out in triplicate

-, no halo was observed; +, radius of proteolytic/lipolytic zone < 2 mm; ++, 2-4 mm; +++, > 4 mm, radius was measured from the edge of the spot to the edge of the halo

Table 4. Strain combinations investigated in RNA-seq experiments.

Condition code	Culture composition				Ripening time at 15°C
	<i>D. hansenii</i> 304	<i>H. alvei</i> GB001	<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^T	
T21_DH	+	-	-	-	21 days
T21_DH_HA	+	+	-	-	
T21_DH_86	+	-	+	-	
T21_DH_9175	+	-	-	+	
T21_DH_HA_86	+	+	+	-	
T21_DH_HA_9175	+	+	-	+	
T28_DH	+	-	-	-	28 days
T28_DH_HA	+	+	-	-	
T28_DH_86	+	-	+	-	
T28_DH_9175	+	-	-	+	
T28_DH_HA_86	+	+	+	-	
T28_DH_HA_9175	+	+	-	+	

Table 5. Number and proportion of CDSs from the reference genomes that were detected.

Strain	Biological condition ^a	CDSs detected ^b	
		Nb	%
<i>D. hansenii</i> 304	T21_DH	6,051	96.28
	T28_DH	6,054	96.32
	T21_DH_HA	6,044	96.17
	T28_DH_HA	6,044	96.17
	T21_DH_86	6,063	96.47
	T28_DH_86	6,047	96.21
	T21_DH_HA_86	6,050	96.26
	T28_DH_HA_86	6,020	95.78
	T21_DH_9175	6,062	96.45
	T28_DH_9175	6,048	96.23
	T21_DH_HA_9175	6,048	96.23
	T28_DH_HA_9175	6,058	96.39
<i>H. alvei</i> GB001	T21_DH_HA	3,895	85.93
	T28_DH_HA	3,955	87.25
	T21_DH_HA_86	3,752	82.77
	T28_DH_HA_86	3,952	87.18
	T21_DH_HA_9175	3,655	80.63
	T28_DH_HA_9175	3,816	84.18
<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	T21_DH_86	2,979	72.82
	T28_DH_86	2,664	65.12
	T21_DH_HA_86	3,523	86.12
	T28_DH_HA_86	3,524	86.14
<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^T	T21_DH_9175	3,516	93.24
	T28_DH_9175	3,595	95.33
	T21_DH_HA_9175	3,559	94.38
	T28_DH_HA_9175	3,603	95.54

^aBiological condition: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, respectively

^b≥10 reads per CDS across all replicates

Table 6. Effect of *H. alvei* on the transcriptomes of the other microorganisms^a.

	<i>B. aurantiacum</i> 8(6)		<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^T		<i>D. hansenii</i> 304	
	Day 21 T21_DH_HA_86 vs. T21_DH_86	Day 28 T28_DH_HA_86 vs. T28_DH_86	Day 21 T21_DH_HA_9175 vs. T21_DH_9175	Day 28 T28_DH_HA_9175 vs. T28_DH_9175	Day 21 T21_DH_HA vs. T21_DH	Day 28 T28_DH_HA vs. T28_DH
Genes up-regulated ^b in presence of <i>H. alvei</i>	90	166	26	92	5	57
Genes down-regulated ^c in presence of <i>H. alvei</i>	125	149	22	139	3	94

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively

^b $p < 0.05$ according to DESeq2 and fold change ≥ 2

^c $p < 0.05$ according to DESeq2 and fold change ≤ 0.5

Table 7. Effect of *Brevibacterium* strains on the transcriptomes of the other microorganisms^a.

	<i>H. alvei</i>		<i>D. hansenii</i>	
	Day 21	Day 28	Day 21	Day 28
Effect of <i>B. aurantiacum</i> 8(6)	T21_DH_HA_86 vs. T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs. T28_DH_HA	T21_DH_86 vs. T21_DH	T28_DH_86 vs. T28_DH
Genes up-regulated ^a in presence of <i>B. aurantiacum</i> 8(6)	407	521	5	25
Genes down-regulated ^b in presence of <i>B. aurantiacum</i> 8(6)	197	279	29	55
Effect of <i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175[†]	T21_DH_HA_9175 vs. T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs. T28_DH_HA	T21_DH_9175 vs. T21_DH	T28_DH_9175 vs. T28_DH
Genes up-regulated in presence of <i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 [†]	364	489	209	422
Genes down-regulated in presence of <i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 [†]	175	273	47	66

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively

^b $p < 0.05$ according to DESeq2 and fold change ≥ 2

[†] $p < 0.05$ according to DESeq2 and fold change ≤ 0.5

Table 8. Quantification by UHPLC-MS of metabolites present in the mini-cheeses after 28 days of ripening*.

Metabolites**	Concentration ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)***						
	Initial curd	DH	DH_HA	DH_86	DH_HA_86	DH_9175	DH_HA_9175
<i>Amino acids</i>							
Aspartic acid	175.0 \pm 27.7 ^a	12.8 \pm 2.7 ^c	18.4 \pm 3.9 ^c	25.2 \pm 1.2 ^c	218.4 \pm 49.0 ^a	97.0 \pm 26.2 ^b	89.0 \pm 11.4 ^b
Serine	36.7 \pm 5.6 ^b	12.1 \pm 1.8 ^b	13.5 \pm 2.2 ^b	28.4 \pm 1.8 ^b	73.9 \pm 17.4 ^a	80.5 \pm 22.4 ^a	33.9 \pm 9.3 ^b
Glycine	37.8 \pm 6.1 ^b	11.7 \pm 0.8 ^c	15.5 \pm 1.2 ^c	17.8 \pm 1.5 ^c	55.7 \pm 9.5 ^a	39.8 \pm 9.0 ^b	24.5 \pm 2.7 ^c
Cysteine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Threonine	52.6 \pm 9.4 ^b	15.7 \pm 2.6 ^c	16.8 \pm 1.5 ^c	34.4 \pm 1.5 ^{bc}	112.8 \pm 15.9 ^a	137.7 \pm 29.8 ^a	60.2 \pm 9.7 ^b
Glutamic acid	238.6 \pm 41.3 ^c	36.5 \pm 9.1 ^c	128.5 \pm 39.7 ^c	133.0 \pm 16.6 ^c	1500.7 \pm 111.5 ^a	1162.5 \pm 99.7 ^b	980.5 \pm 209.9 ^b
Alanine	232.7 \pm 37.4 ^c	69.6 \pm 1.9 ^c	75.2 \pm 12.5 ^c	144.0 \pm 7.2 ^c	917.8 \pm 88.0 ^a	543.6 \pm 192.7 ^b	280.2 \pm 24.9 ^c
Proline	670.0 \pm 118.5 ^a	27.8 \pm 0.8 ^d	38.3 \pm 5.0 ^d	75.9 \pm 6.4 ^d	200.8 \pm 26.0 ^{bc}	262.7 \pm 43.0 ^b	127.1 \pm 13.6 ^{cd}
Valine	233.0 \pm 45.7 ^{bc}	72.3 \pm 17.1 ^c	54.3 \pm 21.8 ^c	410.6 \pm 21.1 ^b	1497.0 \pm 243.3 ^a	271.2 \pm 82.0 ^{bc}	122.1 \pm 24.4 ^c
Histidine	314.1 \pm 41.4 ^a	27.1 \pm 3.6 ^c	15.9 \pm 2.6 ^c	41.0 \pm 4.8 ^{bc}	74.5 \pm 18.5 ^b	37.2 \pm 11.3 ^{bc}	19.1 \pm 4.3 ^c
Methionine	14.7 \pm 2.9 ^b	9.9 \pm 2.4 ^b	10.7 \pm 4.0 ^b	31.1 \pm 6.2 ^b	79.0 \pm 13.2 ^b	65.4 \pm 26.5 ^a	35.6 \pm 11.4 ^b
Lysine	701.4 \pm 134.1 ^a	29.6 \pm 9.3 ^c	5.5 \pm 1.8 ^c	65.2 \pm 7.1 ^c	35.3 \pm 24.5 ^c	193.8 \pm 35.4 ^b	12.8 \pm 2.6 ^c
Arginine	2.8 \pm 0.6 ^c	2.8 \pm 0.6 ^c	1.5 \pm 0.6 ^c	6.3 \pm 1.3 ^c	14.4 \pm 6.0 ^b	27.0 \pm 4.5 ^a	7.2 \pm 1.5 ^c
Tyrosine	301.2 \pm 46.0 ^b	19.4 \pm 3.0 ^c	12.0 \pm 3.4 ^c	56.7 \pm 2.3 ^c	139.0 \pm 35.5 ^b	60.2 \pm 23.2 ^c	27.4 \pm 9.3 ^c
Isoleucine	79.8 \pm 14.7 ^c	31.7 \pm 7.7 ^c	23.3 \pm 9.7 ^c	141.5 \pm 4.9 ^b	388.3 \pm 64.8 ^a	52.0 \pm 13.3 ^c	22.9 \pm 3.6 ^c
Leucine	419.5 \pm 82.5 ^b	50.8 \pm 8.9 ^b	37.1 \pm 6.8 ^b	698.8 \pm 35.3 ^b	3266.9 \pm 688.8 ^a	369.5 \pm 121.9 ^b	184.7 \pm 48.0 ^b
Phenylalanine	215.3 \pm 32.1 ^b	26.9 \pm 4.4 ^c	18.7 \pm 2.7 ^c	150.4 \pm 8.6 ^c	316.6 \pm 74.8 ^a	124.9 \pm 28.1 ^{cd}	61.6 \pm 17.4 ^{de}
<i>Sulfur metabolites</i>							
Taurine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hypotaurine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Homocysteine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OAS	7.7 \pm 1.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cysteine sulfinic acid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glutathione	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cys-Gly	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cystathionine	12.8 \pm 2.1 ^{bc}	17.8 \pm 3.6 ^{ab}	12.1 \pm 3.1 ^{bc}	22.4 \pm 5.1 ^a	10.3 \pm 1.4 ^c	10.1 \pm 0.9 ^c	5.5 \pm 0.3 ^c
γ -Glu-Cys	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SAH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Polyamines</i>							
Histamine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tyramine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phenylethylamine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Putrescine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cadaverine	ND	ND	86.8 \pm 30.6 ^b	ND	211.7 \pm 40.7 ^a	ND	59.9 \pm 6.8 ^b
Spermine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spermidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Others</i>							
Galactonate	10.3 \pm 0.3 ^d	56.0 \pm 3.1 ^a	21.7 \pm 7.9 ^c	26.0 \pm 3.7 ^c	60.8 \pm 6.3 ^a	57.4 \pm 4.5 ^a	37.9 \pm 1.0 ^b
Ornithine	163.8 \pm 27.4 ^a	2.8 \pm 0.3 ^b	1.0 \pm 0.5 ^b	3.7 \pm 0.3 ^b	5.5 \pm 1.4 ^b	6.1 \pm 0.4 ^b	4.0 \pm 0.2 ^b

*Biological conditions are coded according to the following rules: DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively

**Abbreviations: OAS, *O*-acetylserine; SAM, *S*-adenosylmethionine; Cys-Gly, Cysteinyglycine; γ -Glu-Cys, Gamma-glutamylcysteine; SAH, *S*-adenosylhomocysteine

***Values are arithmetic mean ($N = 3$) \pm standard deviation. Mean values in the same row not followed by the same letter are significantly different at $P < 0.05$ (analysis of variance (ANOVA)). ND: not detected

Table 9. Quantification by HPLC of metabolites present in the mini-cheeses after 28 days of ripening*.

Metabolites	Concentration (mmol.kg ⁻¹)**						
	Initial curd	DH	DH_HA	DH_86	DH_HA_86	DH_9175	DH_HA_9175
Lactose	6.6 ± 1.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Galactose	1.4 ± 0.4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lactic acid	105.4 ± 21.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Citric acid	8.3 ± 0.9 ^a	4.5 ± 0.4 ^b	0.8 ± 0.2 ^c	4.2 ± 0.5 ^b	0.5 ± 0.1 ^c	1.2 ± 0.2 ^c	0.2 ± 0.1 ^c
Acetic acid	2.2 ± 0.3 ^a	ND	ND	0.9 ± 0.8 ^{ab}	2.4 ± 0.4 ^a	2.4 ± 0.3 ^a	1.4 ± 1.3 ^{ab}
Ethanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glycerol	2.5 ± 2.2 ^a	2.8 ± 0.8 ^a	7.0 ± 3.2 ^a	10.2 ± 5.3 ^a	5.1 ± 1.9 ^a	10.1 ± 4.0 ^a	9.6 ± 2.2 ^a

*Biological conditions are coded according to the following rules: DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively

**Values are arithmetic mean ($N = 3$) ± standard deviation. Mean values in the same row not followed by the same letter are significantly different at $P < 0.05$ (analysis of variance (ANOVA)). ND: not detected

Table 10. Potential biotic interactions between *D. hansenii*, *H. alvei* and *Brevibacterium* strains in the mini-cheeses.

Metabolism	Interaction between strains
Deacidification ^a	<ul style="list-style-type: none"> • Deacidification of cheese by <i>D. hansenii</i> favors the growth of <i>Brevibacterium</i> strains and <i>H. alvei</i>, which are more acid-sensitive than the yeast • <i>Brevibacterium</i> strains increase the deacidification of cheese, which may influence the growth of <i>D. hansenii</i> and <i>H. alvei</i>
Iron metabolism ^b	<ul style="list-style-type: none"> • In absence of <i>H. alvei</i>, <i>B. aurantiacum</i> 8(6) growth is more limited by iron than that of <i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175^T • Siderophore production by <i>H. alvei</i> increases the iron availability for <i>B. aurantiacum</i> 8(6)
Lipolysis ^{b,c}	<ul style="list-style-type: none"> • Lipolytic activity of <i>Brevibacterium</i> strains on triglycerides increases the release of glycerol in cheese that can be used by <i>H. alvei</i> as an energy substrate
Proteolysis ^{b,c}	<ul style="list-style-type: none"> • Proteolytic activity of <i>Brevibacterium</i> strains on caseins increases the nitrogen availability in cheese for <i>D. hansenii</i> and <i>H. alvei</i>
Sulfur metabolism ^b	<ul style="list-style-type: none"> • In absence of <i>H. alvei</i>, there is a lower sulfur amino acid availability for <i>B. aurantiacum</i> 8(6) than <i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175^T • The presence of <i>H. alvei</i> increases the sulfur amino acid availability for <i>B. aurantiacum</i> 8(6)
D-galactonate ^b	<ul style="list-style-type: none"> • Possible production of D-galactonate by oxidation of lactose/ galactose and subsequent use as an energy source by <i>B. aurantiacum</i> 8(6) and <i>H. alvei</i>

^aInteraction deduced from growth in the mini-cheeses

^bInteraction deduced from transcriptomic data

^cInteraction deduced from biochemical assay

Supplemental material

Supplemental material 1. Calibration tables.

Supplemental material 1.1. Calibration solutions used in UHPLC-MS analysis.

Compound	Concentration (ng/μl)			
Aspartic acid	0.0665	0.665	3.325	6.65
Serine	0.0525	0.525	2.625	5.25
Glycine	0.0375	0.375	1.875	3.75
Cysteine	0.0614	0.614	3.07	6.75
Threonine	0.0595	0.595	2.975	5.95
Glutamic acid	0.0735	0.735	3.675	7.35
Alanine	0.0445	0.445	2.225	4.45
Proline	0.0575	0.575	2.875	5.75
Valine	0.0585	0.585	2.925	5.85
Histidine	0.0775	0.775	3.875	7.75
Methionine	0.0745	0.745	3.725	7.45
Lysine	0.073	0.73	3.65	7.3
Arginine	0.087	0.87	4.35	8.7
Tyrosine	0.0905	0.905	4.525	9.05
Isoleucine	0.0655	0.655	3.275	6.55
Leucine	0.0655	0.655	3.275	6.55
Phenylalanine	0.0825	0.825	4.125	8.25
Taurine	0.08019	0.8019	4.0095	8.019
Hypotaurine	0.06468	0.6468	3.234	6.468
Homocysteine	0.07695	0.7695	3.8475	7.695
<i>O</i> -acetylserine	0.05625	0.5625	2.8125	5.625
Cysteine sulfonic acid	0.0662	0.662	3.31	6.62
Glutathione	0.069	0.69	3.45	6.9
<i>S</i> -adenosylmethionine	0.0685	0.685	3.425	6.85
Cysteinylglycine	0.0799	0.799	3.995	7.99
Cystathionine	0.0693	0.693	3.465	6.93
Gamma-glutamylcysteine	0.0712	0.712	3.56	7.12
<i>S</i> -adenosylhomocysteine	0.083	0.83	4.15	8.3
Histamine	0.0517	0.517	2.585	5.17
Tyramine	0.049	0.49	2.45	4.9
Phenylethylamine	0.0511	0.511	2.555	5.11
Putrescine	0.0499	0.499	2.495	4.99
Cadaverine	0.0514	0.514	2.57	5.14
Spermine	0.0546	0.546	2.73	5.46
Spermidine	0.0514	0.514	2.57	5.14
Galactonate	0.0614	0.614	3.07	20
Ornithine	0.0614	0.614	3.07	6.14

Supplemental material 1.2. Calibration solutions used in HPLC analysis.

Compound	Concentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			
Lactose	0.126	1.261	6.303	12.606
Galactose	0.107	1.070	5.349	10.697
Citric acid	0.111	1.111	5.553	11.105
Lactic acid	0.101	1.007	5.033	10.066
Acetic acid	0.103	1.031	5.155	10.309
Glycerol	0.105	1.049	5.245	10.489
Ethanol	0.100	0.999	4.995	9.989

Supplemental material 2. Expression of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 2.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number / TC number	Locus tag ^a		Fold change ^b				
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175		
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175	
D-galactose catabolism (Leloir pathway)	aldose 1-epimerase	<i>galM</i>	EC 5.1.3.3	Ga0063698_01900 Ga0063698_04151	Ga0063690_01034 -	0.84 NE	0.60 NE	0.68 -	0.94 -	
	UDP-galactose 4-epimerase	<i>galE</i>	EC 5.1.3.2	Ga0063698_03787	Ga0063690_03242	1.34	1.38	0.89	0.82	
	galactokinase	<i>galK</i>	EC 2.7.1.6	Ga0063698_01902	Ga0063690_01036	0.77	0.79	0.47	0.87	
	UDPglucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>galT</i>	EC 2.7.7.12	Ga0063698_01901	Ga0063690_01035	0.57	1.12	0.38	0.67	
D-galactonate catabolism	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	<i>dgoK</i>	EC 4.1.2.21	Ga0063698_02076	-	0.13	0.08	-	-	
	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	<i>dgoA</i>	EC 2.7.1.58	Ga0063698_02075	-	0.14	0.08	-	-	
	galactonate dehydratase	<i>dgoD</i>	EC 4.2.1.6	Ga0063698_02077	-	0.15	0.09	-	-	
Lactate catabolism	Lactate permease			Ga0063698_00078 Ga0063698_01022 Ga0063698_02003	Ga0063690_00189 Ga0063690_00849 Ga0063690_01139	0.45 0.71 0.73	1.01 0.78 0.98	1.29 0.92 0.90	0.94 1.01 1.03	
		quinone-dependent D-iLDH			Ga0063698_02476	Ga0063690_02350	0.85	0.75	0.93	0.93
		quinone-dependent L-iLDH			Ga0063698_01021 Ga0063698_01577	Ga0063690_00848 Ga0063690_01855	0.87 0.61	1.36 0.76	1.29 0.82	1.86 1.14
	Dld II-type quinone/cytochrome -dependent D-iLDH			Ga0063698_03183	Ga0063690_02756	0.79	0.97	1.14	1.22	
	quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldE			Ga0063698_03054	Ga0063690_02876	2.69	3.12	0.93	0.63	
	quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldF			Ga0063698_03055	Ga0063690_02877	2.23	2.52	1.33	1.21	
	quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldG			Ga0063698_03056	Ga0063690_02878	2.79	2.83	1.54	1.82	
	Acetate catabolism	monocarboxylic acid transporter MctC			Ga0063698_02914	Ga0063690_02517	1.83	1.53	2.40	2.73
acetyl-CoA synthase				Ga0063698_03261	Ga0063690_03014	0.99	1.03	1.38	1.95	
Citrate catabolism	citrate-Mg2+:H+ or citrate-Ca2+:H+ symporter, CitMHS family		TC 2.A.11	Ga0063698_02009 Ga0063698_02372	Ga0063690_01145 -	0.86 0.41	0.39 0.22	1.34 -	0.18 -	
		Na+/citrate or Na+/malate symporter, 2-HCT family	TC 2.A.24	Ga0063698_03885	Ga0063690_03253	0.81	1.14	0.88	0.50	
Ethanol catabolism	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase ^c			Ga0063698_03417	Ga0063690_02674	0.84	1.78	1.66	2.09	
	Zn-dependent alcohol dehydrogenase ^d			Ga0063698_03416	Ga0063690_02673	0.69	2.09	1.78	1.87	

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

^cOnly orthologs of the *Corynebacterium glutamicum* gene *ald* are presented

^dOnly orthologs of the *Corynebacterium glutamicum* gene *adhA* are presented

Supplemental material 2.2. Expression level of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number / TC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				B. aurantiacum 8(6)	B. aurantiacum ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
D-galactose catabolism (Leloir pathway)	aldose 1-epimerase	<i>galM</i>	EC 5.1.3.3	Ga0063698_01900	Ga0063690_01034	13	17	11	10	49	40	32	36
				Ga0063698_04151	-	-	-	-	-	-	-	-	
	UDP-galactose 4-epimerase	<i>galE</i>	EC 5.1.3.2	Ga0063698_03787	Ga0063690_03242	406	387	541	534	444	480	382	376
	galactokinase	<i>galK</i>	EC 2.7.1.6	Ga0063698_01902	Ga0063690_01036	33	36	25	28	192	123	87	103
	UDPglucose--hexose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>galT</i>	EC 2.7.7.12	Ga0063698_01901	Ga0063690_01035	34	17	19	22	138	90	51	58
D-galactonate catabolism	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	<i>dgoK</i>	EC 4.1.2.21	Ga0063698_02076	-	69	68	9	5	-	-	-	-
	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	<i>dgoA</i>	EC 2.7.1.58	Ga0063698_02075	-	113	119	16	9	-	-	-	-
	galactonate dehydratase	<i>dgoD</i>	EC 4.2.1.6	Ga0063698_02077	-	130	115	17	9	-	-	-	-
Lactate catabolism	Lactate permease			Ga0063698_00078	Ga0063690_00189	10	4	4	5	4	6	5	5
				Ga0063698_01022	Ga0063690_00849	1832	1534	1283	1169	1188	774	1054	752
				Ga0063698_02003	Ga0063690_01139	32	28	24	26	36	27	31	27
	quinone-dependent D-iLDH			Ga0063698_02476	Ga0063690_02350	1250	1223	1050	890	580	583	518	519
	quinone-dependent L-iLDH			Ga0063698_01021	Ga0063690_00848	625	349	537	461	882	526	1102	939
				Ga0063698_01577	Ga0063690_01855	48	37	30	25	59	41	46	45
	Dld II-type quinone/cytochrome -dependent D-iLDH			Ga0063698_03183	Ga0063690_02756	9	6	7	5	29	26	32	30
	quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldE			Ga0063698_03054	Ga0063690_02876	242	250	644	780	233	183	208	112
	quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldF			Ga0063698_03055	Ga0063690_02877	125	112	276	286	126	101	162	117
quinone/cytochrome -dependent L-iLDH complex protein LldG			Ga0063698_03056	Ga0063690_02878	16	16	44	46	24	19	35	34	
Acetate catabolism	monocarboxylic acid transporter MctC			Ga0063698_02914	Ga0063690_02517	40	65	73	98	53	54	123	142
	acetyl-CoA synthase			Ga0063698_03261	Ga0063690_03014	296	332	292	337	251	230	336	429
Citrate catabolism	citrate-Mg2+:H+ or citrate-Ca2+:H+ symporter, CitMHS family		TC 2.A.11	Ga0063698_02009	Ga0063690_01145	62	111	53	40	96	82	124	14
				Ga0063698_02372	-	21	17	8	4	-	-	-	-
	Na+/citrate or Na+/malate symporter, 2-HCT family		TC 2.A.24	Ga0063698_03885	Ga0063690_03253	10	5	8	7	4	5	3	2
Ethanol catabolism	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase ^c			Ga0063698_03417	Ga0063690_02674	369	304	310	535	409	392	661	783
	Zn-dependent alcohol dehydrogenase ^d			Ga0063698_03416	Ga0063690_02673	211	122	145	247	272	252	472	450

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

^cOnly orthologs of the *Corynebacterium glutamicum* gene *ald* are presented

^dOnly orthologs of the *Corynebacterium glutamicum* gene *adhA* are presented

Supplemental material 3. Expression of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *H. alvei*.

Supplemental material 3.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *H. alvei*.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
D-galactonate catabolism	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	<i>dgoK</i>	4.1.2.21	Ga0116594_103555	0.70	0.58	1.46	3.11
	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	<i>dgoA</i>	2.7.1.58	Ga0116594_103554	0.59	0.54	2.64	3.34
	galactonate dehydratase	<i>dgoD</i>	4.2.1.6	Ga0116594_103556	0.95	0.56	2.28	2.70
Citrate catabolism	citrate:succinate antiporter	<i>citT</i>		Ga0116594_100437	0.61	0.06	0.45	0.15
	triphosphoribosyl-dephospho-CoA synthase	<i>citG</i>	2.4.2.52	Ga0116594_100438	0.39	0.06	0.32	0.17
	holo-ACP synthase	<i>citX</i>	2.7.7.61	Ga0116594_100439	0.29	0.06	0.20	0.06
	citrate lyase subunit alpha / citrate CoA-transferase	<i>citF</i>	2.8.3.10	Ga0116594_100440	0.28	0.06	0.24	0.09
	citrate lyase subunit beta / citryl-CoA lyase	<i>citE</i>	4.1.3.34	Ga0116594_100441	0.21	0.08	0.24	0.09
	citrate lyase subunit gamma (acyl carrier protein) [citrate (pro-3S)-lyase] ligase	<i>citD</i> <i>citC</i>	 6.2.1.22	 Ga0116594_100442 Ga0116594_100443	 0.18 0.20	 0.12 0.10	 0.29 0.50	 0.12 0.12

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 3.2. Expression level of selected genes involved in carbohydrate catabolism in *H. alvei*.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
D-galactonate catabolism	2-dehydro-3-deoxyphosphogalactonate aldolase	<i>dgoK</i>	4.1.2.21	Ga0116594_103555	9	9	6	5	12	25
	2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	<i>dgoA</i>	2.7.1.58	Ga0116594_103554	36	40	22	22	90	123
	galactonate dehydratase	<i>dgoD</i>	4.2.1.6	Ga0116594_103556	10	11	9	6	21	28
Citrate catabolism	citrate:succinate antiporter	<i>citT</i>		Ga0116594_100437	99	161	61	9	42	22
	triphosphoribosyl-dephospho-CoA synthase	<i>citG</i>	2.4.2.52	Ga0116594_100438	26	49	10	3	8	7
	holo-ACP synthase	<i>citX</i>	2.7.7.61	Ga0116594_100439	25	60	7	4	5	3
	citrate lyase subunit alpha / citrate CoA-transferase	<i>citF</i>	2.8.3.10	Ga0116594_100440	108	206	31	13	23	16
	citrate lyase subunit beta / citryl-CoA lyase	<i>citE</i>	4.1.3.34	Ga0116594_100441	195	320	42	24	44	26
	citrate lyase subunit gamma (acyl carrier protein)	<i>citD</i>		Ga0116594_100442	34	55	6	6	9	6
	[citrate (pro-3S)-lyase] ligase	<i>citC</i>	6.2.1.22	Ga0116594_100443	177	252	35	25	83	28

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 4. Expression of putative excreted proteases/peptidases in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 4.1. Impact of *H. alvei* on the expression of putative excreted proteases/peptidases^a in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (the genes with a LPXTG cell wall anchor domain are underlined).

MEROPs family	Description	Locus tag ^b		Fold change ^c			
		<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
				T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
C40	Peptidase family C40 contains bacterial cell-wall modifying enzymes	Ga0063698_01321 Ga0063698_00835	Ga0063690_00956 Ga0063690_00711	1.06 0.93	0.99 0.88	1.23 1.16	1.25 1.22
C82	Family C82 contains enzymes that hydrolase (and transfer) bacterial cell wall peptides	Ga0063698_03317	Ga0063690_01304	1.26	1.28	1.09	0.97
M23	Peptidase family M23 contains endopeptidases that lyse bacterial cell wall peptidoglycans	Ga0063698_02726	Ga0063690_01563	1.42	1.73	1.00	0.85
M28	Family M28 contains aminopeptidases and carboxypeptidases	Ga0063698_02584	Ga0063690_01755	0.88	1.01	0.89	1.15
S1	Peptidase family S1 contains serine endopeptidases	<u>Ga0063698_04110</u> <u>Ga0063698_01563</u> -	- - <u>Ga0063690_01840</u>	NE 1.00 -	NE 1.18 -	- - 1.36	- - 1.75
S8	Peptidase family S8 contains the serine endopeptidase subtilisin and its homologues	Ga0063698_01143	Ga0063690_01444	0.85	1.02	1.08	1.03
S11	Peptidase family S11 contains serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidases	Ga0063698_03796 -	- Ga0063690_03230	0.88 -	1.88 -	- 0.72	- 0.90
S60	Family S60 contains a endopeptidase	Ga0063698_03189	Ga0063690_02762	0.92	1.45	0.61	1.18

^aPutative signal sequences were computed by the Integrated Microbial Genomes (IMG) database using SignalP. Putative proteases/peptidases were detected by the MEROPS batch BLAST scan in the MEROPS database (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/batch_blast)

^bOrthologs are present in the same line

^cBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 4.2. Expression level of putative excreted proteases/peptidases^a in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (the genes with a LPXTG cell wall anchor domain are underlined).

MEROPs family	Description	Locus tag ^b		Normalized reads ^c							
		<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
				T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
C40	Peptidase family C40 contains bacterial cell-wall modifying enzymes	Ga0063698_01321	Ga0063690_00956	7160	7579	7531	7331	6576	6844	7852	8186
		Ga0063698_00835	Ga0063690_00711	562	632	520	534	763	928	856	1092
C82	Family C82 contains enzymes that hydrolase (and transfer) bacterial cell wall peptides	Ga0063698_03317	Ga0063690_01304	187	199	235	257	379	440	398	411
M23	Peptidase family M23 contains endopeptidases that lyse bacterial cell wall peptidoglycans	Ga0063698_02726	Ga0063690_01563	179	162	254	263	337	323	325	262
M28	Family M28 contains aminopeptidases and carboxypeptidases	Ga0063698_02584	Ga0063690_01755	218	247	190	241	523	393	450	432
S1	Peptidase family S1 contains serine endopeptidases	Ga0063698_04110	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ga0063698_01563	-	4434	3188	4422	3638	-	-	-	-
		-	Ga0063690_01840	-	-	-	-	3888	3276	5112	5499
S8	Peptidase family S8 contains the serine endopeptidase subtilisin and its homologues	Ga0063698_01143	Ga0063690_01444	207	155	174	153	155	120	161	119
S11	Peptidase family S11 contains serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidases	Ga0063698_03796	-	4	2	4	4	-	-	-	-
		-	Ga0063690_03230	-	-	-	-	19	15	13	13
S60	Family S60 contains a endopeptidase	Ga0063698_03189	Ga0063690_02762	5	3	4	3	2	2	1	2

^aPutative signal sequences were computed by the Integrated Microbial Genomes (IMG) database using SignalP. Putative proteases/peptidases were detected by the MEROPS batch BLAST scan in the MEROPS database (http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/batch_blast)

^bOrthologs are present in the same line

^cBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 5. Expression of selected genes involved in amino acid catabolism in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 5.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in amino acid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Proline degradation via PutA	bifunctional proline dehydrogenase / L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	<i>putA</i>	1.5.5.2 / 1.2.1.88	Ga0063698_02157	Ga0063690_01219	0.60	0.80	0.39	0.29
Glutamate degradation via glutamate dehydrogenase	NAD-specific glutamate dehydrogenase		1.4.1.2	Ga0063698_01361	Ga0063690_00997	0.74	1.04	0.86	0.81
Glutamate degradation via aspartate aminotransferase	aspartate aminotransferase aspartate ammonia-lyase	<i>aspC</i>	2.6.1.1	Ga0063698_01088	-	1.80	1.15	-	-
		<i>aspA</i>	4.3.1.1	Ga0063698_02317	-	0.42	0.62	-	-
Arginine degradation via arginine decarboxylase	arginine decarboxylase agmatinase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0063698_02202	Ga0063690_02475	0.81	0.82	0.99	1.04
		<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0063698_02720	Ga0063690_01569	0.58	0.51	1.27	1.05
Serine degradation via L-serine ammonia-lyase	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0063698_02441	Ga0063690_02317	0.76	1.11	0.81	0.85
Alanine degradation via alanine dehydrogenase	L-alanine dehydrogenase	<i>ald</i>	1.4.1.1	Ga0063698_00354	Ga0063690_02133	0.99	1.14	0.44	0.39
Phenylalanine degradation via phenylacetyl-CoA ligase	phenylacetyl-CoA ligase	<i>paaK</i>	6.2.1.30	Ga0063698_03118	Ga0063690_03692	0.42	0.52	0.66	0.87
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA	<i>paaA</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03120	Ga0063690_03694	0.71	0.81	0.58	0.46
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaB	<i>paaB</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03121	Ga0063690_03695	0.57	0.65	0.56	0.50
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaC	<i>paaC</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03122	Ga0063690_03696	0.72	0.65	0.52	0.48
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaD	<i>paaD</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03123	Ga0063690_03697	0.78	0.68	0.46	0.50
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaE	<i>paaE</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03124	Ga0063690_03698	0.68	0.57	0.47	0.50
	1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerase	<i>paaG</i>	5.3.3.18	Ga0063698_03128	Ga0063690_03702	0.77	0.68	0.81	0.82
	oxepin-CoA hydrolase / 3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA semialdehyde dehydrogenase	<i>paaZ</i>	3.3.2.12 / 1.2.1.91	Ga0063698_03109	Ga0063690_00321	0.55	0.63	0.46	0.37
	3-oxo-5,6-dehydrosuberil-CoA thiolase / 3-oxoadipyl-CoA thiolase PaaJ	<i>paaJ</i>	2.3.1.223 / 2.3.1.174	Ga0063698_03125	Ga0063690_03699	0.64	0.54	0.63	0.57
	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	<i>paaF</i>	4.2.1.17	Ga0063698_03126	Ga0063690_03700	0.71	0.57	0.67	0.67
3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>	1.1.1.35	Ga0063698_03127	Ga0063690_03701	0.67	0.65	0.76	0.69	
Phenylacetic acid degradation protein PaaI, thioesterase	<i>paaI</i>	3.1.2.-	Ga0063698_03119	Ga0063690_03693	0.35	0.43	0.66	0.55	

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE= gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 5.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in amino acid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Threonine degradation via threonine aldolase	L-threonine aldolase	<i>itaE</i>	4.1.2.5	Ga0063698_03209	Ga0063690_02781	0.80	1.16	1.12	0.88
Threonine degradation via threonine dehydratase	threonine dehydratase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0063698_01004	Ga0063690_00833	0.81	0.79	0.98	0.88
Methionine degradation via methionine gamma-lyase	L-methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0063698_00396	Ga0063690_03082	0.80	1.13	0.92	1.25
Tyrosine degradation via the homoprotocatechuate pathway	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	<i>hpaD</i>	1.13.11.15	Ga0063698_02146	Ga0063690_01230	0.46	0.65	0.92	0.63
	2-hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde dehydrogenase	<i>hpaE</i>	1.2.1.60	Ga0063698_02147	Ga0063690_01229	0.53	0.86	1.00	0.86
	putative homoprotocatechuate catabolism bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaFG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.10	Ga0063698_02149	Ga0063690_01227	0.96	0.82	0.86	0.79
	2-hydroxyhepta-2,4-dienedioate hydratase	<i>hpaH</i>	4.2.1.163	Ga0063698_02145	Ga0063690_01231	0.61	0.60	0.95	0.72
	4-hydroxy-2-ketopimelate aldolase	<i>hpaI</i>	4.1.2.52	Ga0063698_02144	Ga0063690_01232	0.62	0.57	0.94	0.74
	NAD(P)-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	Ga0063698_00727	Ga0063690_00603	1.49	1.39	0.91	0.96
Histidine degradation via histidine ammonia-lyase	Histidine ammonia-lyase	<i>hutH</i>	4.3.1.3	Ga0063698_02362	Ga0063690_02909	0.66	0.61	1.34	2.42
	Urocanate hydratase	<i>hutU</i>	4.2.1.49	Ga0063698_02355	Ga0063690_02913	1.15	0.52	0.87	1.51
	imidazolonepropionase	<i>hutI</i>	3.5.2.7	Ga0063698_02361	Ga0063690_02910	1.01	0.66	0.93	1.59
	formimidoylglutamate deiminase	<i>hutF</i>	3.5.3.13	Ga0063698_02364	Ga0063690_02907	0.63	0.45	1.15	1.25
	putative N-formylglutamate deformylase	<i>hutG</i>	3.5.1.68	Ga0063698_02363	Ga0063690_02908	0.37	0.72	1.75	1.66
Gamma-aminobutyrate (GABA) degradation	gamma-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	2.6.1.19	Ga0063698_00855	Ga0063690_00734	0.78	1.11	0.93	1.01
	NAD(P)-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	Ga0063698_00727	Ga0063690_00603	1.49	1.39	0.91	0.96

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 5.2. Expression level of selected genes involved in amino acid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Proline degradation via PutA	bifunctional proline dehydrogenase / L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	<i>putA</i>	1.5.5.2 / 1.2.1.88	Ga0063698_02157	Ga0063690_01219	1184	1089	703	851	614	775	229	217
Glutamate degradation via glutamate dehydrogenase	NAD-specific glutamate dehydrogenase		1.4.1.2	Ga0063698_01361	Ga0063690_00997	1036	824	767	848	742	772	617	601
Glutamate degradation via aspartate aminotransferase	aspartate aminotransferase	<i>aspC</i>	2.6.1.1	Ga0063698_01088	-	10	12	17	16	-	-	-	-
	aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i>	4.3.1.1	Ga0063698_02317	-	86	56	36	33	-	-	-	-
Arginine degradation via arginine decarboxylase	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0063698_02202	Ga0063690_02475	169	150	136	126	275	253	262	252
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0063698_02720	Ga0063690_01569	42	56	24	29	35	27	42	27
Serine degradation via L-serine ammonia-lyase	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0063698_02441	Ga0063690_02317	125	99	94	112	84	73	65	60
Alanine degradation via alanine dehydrogenase	L-alanine dehydrogenase	<i>ald</i>	1.4.1.1	Ga0063698_00354	Ga0063690_02133	2024	1950	1996	2177	1176	1215	498	452
Phenylalanine degradation via phenylacetyl-CoA ligase	phenylacetyl-CoA ligase	<i>paaK</i>	6.2.1.30	Ga0063698_03118	Ga0063690_03692	465	401	196	208	226	223	143	186
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA	<i>paaA</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03120	Ga0063690_03694	2140	2987	1514	2360	575	848	321	378
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaB	<i>paaB</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03121	Ga0063690_03695	259	304	148	196	44	62	24	30
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaC	<i>paaC</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03122	Ga0063690_03696	1368	1822	979	1161	331	432	164	200
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaD	<i>paaD</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03123	Ga0063690_03697	538	689	420	461	164	199	73	96
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaE	<i>paaE</i>	1.14.13.149	Ga0063698_03124	Ga0063690_03698	3029	3265	2065	1833	793	809	357	393
	1,2-epoxyphenylacetyl-CoA isomerase	<i>paaG</i>	5.3.3.18	Ga0063698_03128	Ga0063690_03702	447	473	341	313	96	88	75	69
	oxepin-CoA hydrolase / 3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA semialdehyde dehydrogenase	<i>paaZ</i>	3.3.2.12 / 1.2.1.91	Ga0063698_03109	Ga0063690_00321	1008	1025	546	633	239	329	105	116
	3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA thiolase / 3-oxoadipyl-CoA thiolase PaaJ	<i>paaJ</i>	2.3.1.223 / 2.3.1.174	Ga0063698_03125	Ga0063690_03699	1538	1547	987	815	390	358	237	194
	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase	<i>paaF</i>	4.2.1.17	Ga0063698_03126	Ga0063690_03700	1371	1490	974	822	258	225	167	145
3-hydroxyadipyl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>	1.1.1.35	Ga0063698_03127	Ga0063690_03701	674	580	449	373	211	183	153	121	
Phenylacetic acid degradation protein PaaI, thioesterase	<i>paaI</i>	3.1.2.-	Ga0063698_03119	Ga0063690_03693	260	274	90	117	90	115	58	61	

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 5.2. Expression level of selected genes involved in amino acid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Threonine degradation via threonine aldolase	L-threonine aldolase	<i>itaE</i>	4.1.2.5	Ga0063698_03209	Ga0063690_02781	21	18	16	17	28	29	30	24
Threonine degradation via threonine dehydratase	threonine dehydratase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0063698_01004	Ga0063690_00833	154	142	123	107	78	94	73	79
Methionine degradation via methionine gamma-lyase	L-methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0063698_00396	Ga0063690_03082	533	543	424	611	869	1042	772	1250
Tyrosine degradation via the homoprotocatechuate pathway	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	<i>hpaD</i>	1.13.11.15	Ga0063698_02146	Ga0063690_01230	155	137	70	87	187	112	166	68
	2-hydroxy-5-carboxymethylmuconate semialdehyde dehydrogenase	<i>hpaE</i>	1.2.1.60	Ga0063698_02147	Ga0063690_01229	119	86	62	73	138	93	133	76
	putative homoprotocatechuate catabolism bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaFG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.10	Ga0063698_02149	Ga0063690_01227	257	424	246	333	593	515	494	388
	2-hydroxyhepta-2,4-dienedioate hydratase	<i>hpaH</i>	4.2.1.163	Ga0063698_02145	Ga0063690_01231	49	48	30	29	98	56	89	39
	4-hydroxy-2-ketopimelate aldolase	<i>hpaI</i>	4.1.2.52	Ga0063698_02144	Ga0063690_01232	40	53	25	25	86	51	78	36
	NAD(P)-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	Ga0063698_00727	Ga0063690_00603	26	27	39	43	89	99	78	92
Histidine degradation via histidine ammonia-lyase	Histidine ammonia-lyase	<i>hutH</i>	4.3.1.3	Ga0063698_02362	Ga0063690_02909	31	24	21	16	32	23	41	53
	Urocanate hydratase	<i>hutU</i>	4.2.1.49	Ga0063698_02355	Ga0063690_02913	210	271	240	135	420	265	356	384
	imidazolonepropionase	<i>hutI</i>	3.5.2.7	Ga0063698_02361	Ga0063690_02910	45	50	45	31	97	79	87	121
	formimidoylglutamate deiminase	<i>hutF</i>	3.5.3.13	Ga0063698_02364	Ga0063690_02907	23	28	14	11	14	12	15	15
	putative N-formylglutamate deformylase	<i>hutG</i>	3.5.1.68	Ga0063698_02363	Ga0063690_02908	12	7	5	5	8	7	12	11
Gamma-aminobutyrate (GABA) degradation	gamma-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	2.6.1.19	Ga0063698_00855	Ga0063690_00734	318	241	247	264	336	325	303	317
	NAD(P)-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gadD</i>	1.2.1.16	Ga0063698_00727	Ga0063690_00603	26	27	39	43	89	99	78	92

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 6. Expression of selected genes involved in amino acid catabolism in *H. alvei*.

Supplemental material 6.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in amino acid catabolism in *H. alvei* (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Proline degradation via PutA	bifunctional proline dehydrogenase / L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	<i>putA</i>	1.5.5.2 / 1.2.1.88	Ga0116594_10501	0.56	0.60	0.82	0.96
Glutamate degradation via glutamate dehydrogenase	NADP-specific glutamate dehydrogenase	<i>gdhA</i>	1.4.1.4	Ga0116594_108021	1.02	0.65	0.78	0.61
Glutamate degradation via glutamate decarboxylase	glutamate decarboxylase	<i>gadAB</i>	4.1.1.15	Ga0116594_104512	0.96	0.82	0.85	0.67
Glutamate degradation via aspartate aminotransferase	aspartate aminotransferase	<i>aspC</i>	2.6.1.1	Ga0116594_109336	0.76	0.81	1.16	1.26
	aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i>	4.3.1.1	Ga0116594_1018162	2.25	4.72	1.07	1.57
Arginine degradation via arginine decarboxylase	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_106836	1.05	1.17	0.54	0.51
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0116594_106833	0.60	1.25	0.79	1.14
	arginine decarboxylase	<i>adiA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_100537	1.19	1.88	0.94	1.08
	arginine decarboxylase	<i>adiA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_10455	1.01	1.17	0.78	1.25
Serine degradation via L-serine ammonia-lyase	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0116594_1082136	2.35	4.16	0.75	1.25
	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0116594_1077147	1.14	3.03	0.32	0.84
Alanine degradation via alanine racemase	alanine racemase	<i>dadX</i>	5.1.1.1	Ga0116594_1007389	0.75	0.60	0.82	0.83
	alanine racemase	<i>dadX</i>	5.1.1.1	Ga0116594_100457	0.89	0.86	0.90	1.06
	D-amino-acid dehydrogenase	<i>dadA</i>	1.4.99.-	Ga0116594_1007388	0.85	0.51	0.65	0.69
Phenylalanine degradation via phenylacetyl-CoA ligase	phenylacetate-CoA ligase	<i>paaK</i>	6.2.1.30	Ga0116594_102715	0.71	0.24	0.70	0.46
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA	<i>paaA</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10275	0.86	0.60	0.56	0.50
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaB	<i>paaB</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10276	0.61	0.41	0.40	0.43
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaC	<i>paaC</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10277	0.57	0.34	0.45	0.42
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaD	<i>paaD</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10278	0.50	0.28	0.40	0.38
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaE	<i>paaE</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10279	0.40	0.22	0.34	0.32
	2-(1,2-epoxy-1,2-dihydrophenyl)acetyl-CoA isomerase	<i>paaG</i>	5.3.3.18	Ga0116594_102711	0.47	0.15	0.32	0.29
	oxepin-CoA hydrolase / 3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA semialdehyde dehydrogenase	<i>paaZ</i>	3.3.2.12 / 1.2.1.91	Ga0116594_10274	0.78	0.51	0.55	0.54
	3-oxo-5,6-didehydrosuberyl-CoA/3-oxoadipyl-CoA thiolase	<i>paaJ</i>	2.3.1.223 / 2.3.1.174	Ga0116594_102714	0.54	0.22	0.55	0.30
	enoyl-CoA hydratase	<i>paaF</i>	4.2.1.17	Ga0116594_102710	0.39	0.21	0.40	0.32
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>	1.1.1.157	Ga0116594_102712	0.51	0.15	0.41	0.27
	acyl-CoA thioesterase	<i>paaI</i>	3.1.2.-	Ga0116594_102713	0.55	0.20	0.40	0.31
	transcriptional regulator, PaaX family	<i>paaX</i>		Ga0116594_102716	1.11	0.53	0.71	0.43
	phenylacetic acid degradation protein	<i>paaY</i>		Ga0116594_102717	1.28	0.65	1.00	0.49

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE= gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 6.1. Impact of Brevibacterium strains on the expression of selected genes involved in amino acid catabolism in H. alvei (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Threonine degradation via threonine aldolase	L-threonine aldolase	<i>haE</i>	4.1.2.5	Ga0116594_107619	0.99	1.19	1.21	1.52
Threonine degradation via threonine ammonia-lyase	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_100530	3.67	10.94	1.59	1.83
	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_103552	0.86	0.99	1.01	1.14
	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_103812	0.45	0.36	0.93	1.05
Threonine degradation via threonine dehydrogenase	L-threonine 3-dehydrogenase	<i>tdh</i>	1.1.1.103	Ga0116594_1035121	1.00	1.92	0.44	1.02
	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	<i>kbl</i>	2.3.1.29	Ga0116594_1035120	1.09	2.13	0.41	1.00
Methionine degradation via methionine gamma-lyase	methionine γ -lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_105962	112.66	43.91	6.80	3.95
	methionine γ -lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_100764	2.34	7.02	1.19	2.20
Tyrosine degradation via the homoprotocatechuate pathway	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component	<i>hpaB</i>	1.14.14.9	Ga0116594_103724	0.61	1.41	0.55	1.05
	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase reductase component	<i>hpaC</i>	1.5.1.36	Ga0116594_103723	0.56	0.94	0.75	0.75
	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	<i>hpaD</i>	1.13.11.15	Ga0116594_103731	1.33	1.11	1.12	0.92
	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	<i>hpaE</i>	1.2.1.60	Ga0116594_103732	1.41	1.93	1.66	2.30
	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase	<i>hpaF</i>	5.3.3.10	Ga0116594_103730	0.77	1.10	0.45	0.59
	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.-	Ga0116594_103733	1.89	2.50	2.16	3.44
	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.-	Ga0116594_103734	2.03	3.21	2.50	5.04
	2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate hydratase	<i>hpaH</i>	4.2.1.163	Ga0116594_103728	0.94	0.92	0.35	0.36
	4-hydroxy-2-oxoheptanedioate aldolase	<i>hpaI</i>	4.1.2.52	Ga0116594_103727	0.95	0.79	0.20	0.33
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_103729	0.85	0.73	0.40	0.40
Histidine degradation via histidine ammonia-lyase	histidine ammonia-lyase	<i>hutH</i>	4.3.1.3	Ga0116594_10598	0.55	0.93	0.62	1.40
	urocanate hydratase	<i>hutU</i>	4.2.1.49	Ga0116594_10599	0.90	1.17	0.71	1.40
	imidazolonepropionase	<i>hutI</i>	3.5.2.7	Ga0116594_104687	0.68	0.73	0.66	1.03
	formimidoylglutamase	<i>hutG</i>	3.5.3.8	Ga0116594_104686	0.54	0.50	0.53	0.92
Gamma-aminobutyrate (GABA) degradation	gamma-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	2.6.1.19	Ga0116594_108419	0.43	0.28	0.52	0.50
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_108418	0.37	0.25	0.47	0.40
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_104515	0.43	0.33	0.34	0.34
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_105929	0.40	0.72	0.41	0.77
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_103729	0.85	0.73	0.40	0.40
	gamma-aminobutyrate aminotransferase	<i>puuE</i>	2.6.1.19	Ga0116594_107757	0.37	0.11	0.25	0.18
	NAD-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>puuC</i>	1.2.1.24	Ga0116594_107753	0.36	0.14	0.23	0.17

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change \leq 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change \geq 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 6.2. Expression level of selected genes involved in amino acid catabolism in *H. alvei* (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Proline degradation via PutA	bifunctional proline dehydrogenase / L-glutamate gamma-semialdehyde dehydrogenase	<i>putA</i>	1.5.5.2 / 1.2.1.88	Ga0116594_10501	747	524	419	314	573	457
Glutamate degradation via glutamate dehydrogenase	NADP-specific glutamate dehydrogenase	<i>gdhA</i>	1.4.1.4	Ga0116594_108021	157	182	161	118	114	101
Glutamate degradation via glutamate decarboxylase	glutamate decarboxylase	<i>gadAB</i>	4.1.1.15	Ga0116594_104512	5	4	5	4	4	3
Glutamate degradation via aspartate aminotransferase	aspartate aminotransferase	<i>aspC</i>	2.6.1.1	Ga0116594_109336	339	345	261	281	369	395
	aspartate ammonia-lyase	<i>aspA</i>	4.3.1.1	Ga0116594_1018162	854	754	1946	3571	855	1074
Arginine degradation via arginine decarboxylase	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_106836	286	360	303	422	145	165
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0116594_106833	155	111	94	138	115	115
	arginine decarboxylase	<i>adiA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_100537	38	38	46	73	34	38
	arginine decarboxylase	<i>adiA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_10455	18	12	18	14	13	14
Serine degradation via L-serine ammonia-lyase	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0116594_1082136	110	104	262	436	77	119
	L-serine ammonia-lyase	<i>sdaA</i>	4.3.1.17	Ga0116594_1077147	213	94	245	284	64	72
Alanine degradation via alanine racemase	alanine racemase	<i>dadX</i>	5.1.1.1	Ga0116594_1007389	66	65	51	39	50	49
	alanine racemase	<i>dadX</i>	5.1.1.1	Ga0116594_100457	39	41	36	35	33	40
	D-amino-acid dehydrogenase	<i>dadA</i>	1.4.99.-	Ga0116594_1007388	196	259	168	132	119	161
Phenylalanine degradation via phenylacetyl-CoA ligase	phenylacetate-CoA ligase	<i>paaK</i>	6.2.1.30	Ga0116594_102715	123	212	88	51	80	89
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaA	<i>paaA</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10275	376	356	328	214	197	162
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaB	<i>paaB</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10276	139	129	85	53	52	50
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaC	<i>paaC</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10277	155	154	90	52	66	59
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaD	<i>paaD</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10278	126	124	64	35	48	43
	ring-1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase subunit PaaE	<i>paaE</i>	1.14.13.149	Ga0116594_10279	202	227	82	50	64	65
	2-(1,2-epoxy-1,2-dihydrophenyl)acetyl-CoA isomerase	<i>paaG</i>	5.3.3.18	Ga0116594_102711	67	98	32	14	20	26
	oxepin-CoA hydrolase / 3-oxo-5,6-dehydrosuberyl-CoA semialdehyde dehydrogenase	<i>paaZ</i>	3.3.2.12 / 1.2.1.91	Ga0116594_10274	153	156	120	80	79	77
	3-oxo-5,6-didehydrosuberyl-CoA/3-oxoadipyl-CoA thiolase	<i>paaJ</i>	2.3.1.223 / 2.3.1.174	Ga0116594_102714	82	155	45	34	42	42
	enoyl-CoA hydratase	<i>paaF</i>	4.2.1.17	Ga0116594_102710	51	55	20	12	19	16
	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	<i>paaH</i>	1.1.1.157	Ga0116594_102712	103	170	53	26	40	41
	acyl-CoA thioesterase	<i>paaI</i>	3.1.2.-	Ga0116594_102713	38	66	21	13	14	18
	transcriptional regulator, PaaX family	<i>paaX</i>		Ga0116594_102716	65	116	73	62	44	45
	phenylacetic acid degradation protein	<i>paaY</i>		Ga0116594_102717	21	32	27	21	19	14

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 6.2. Expression level of selected genes involved in amino acid catabolism in *H. alvei* (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Threonine degradation via threonine aldolase	L-threonine aldolase	<i>ltaE</i>	4.1.2.5	Ga0116594_107619	58	58	58	68	66	79
Threonine degradation via threonine ammonia-lyase	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_100530	481	423	1788	4643	715	703
	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_103552	23	24	20	24	21	25
	threonine ammonia-lyase	<i>tdcB</i>	4.3.1.19	Ga0116594_103812	53	68	24	24	47	64
Threonine degradation via threonine dehydrogenase	L-threonine 3-dehydrogenase	<i>tdh</i>	1.1.1.103	Ga0116594_1035121	328	205	333	394	135	190
	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	<i>kbl</i>	2.3.1.29	Ga0116594_1035120	403	235	445	500	155	213
Methionine degradation via methionine gamma-lyase	methionine γ -lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_105962	13	43	1522	1891	85	154
	methionine γ -lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_100764	26	21	60	146	28	41
Tyrosine degradation via the homoprotocatechuate pathway	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component	<i>hpaB</i>	1.14.14.9	Ga0116594_103724	227	98	141	138	117	93
	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase reductase component	<i>hpaC</i>	1.5.1.36	Ga0116594_103723	39	23	22	22	27	16
	3,4-dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase	<i>hpaD</i>	1.13.11.15	Ga0116594_103731	20	15	26	17	20	13
	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate semialdehyde dehydrogenase	<i>hpaE</i>	1.2.1.60	Ga0116594_103732	25	15	36	28	39	30
	5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase	<i>hpaF</i>	5.3.3.10	Ga0116594_103730	10	7	8	7	4	4
	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.-	Ga0116594_103733	20	13	37	32	40	40
	4-hydroxyphenylacetate degradation bifunctional isomerase/decarboxylase	<i>hpaG</i>	4.1.1.68 / 5.3.3.-	Ga0116594_103734	26	14	52	43	59	61
	2-oxo-hept-3-ene-1,7-dioate hydratase	<i>hpaH</i>	4.2.1.163	Ga0116594_103728	23	14	21	13	7	4
	4-hydroxy-2-oxoheptanedioate aldolase	<i>hpaI</i>	4.1.2.52	Ga0116594_103727	24	17	23	13	4	5
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_103729	35	26	30	19	13	9
Histidine degradation via histidine ammonia-lyase	histidine ammonia-lyase	<i>hutH</i>	4.3.1.3	Ga0116594_10598	480	236	266	220	280	301
	urocanate hydratase	<i>hutU</i>	4.2.1.49	Ga0116594_10599	887	531	809	622	590	674
	imidazolonepropionase	<i>hutI</i>	3.5.2.7	Ga0116594_104687	370	256	254	188	230	238
	formimidoylglutamase	<i>hutG</i>	3.5.3.8	Ga0116594_104686	67	49	37	24	33	41
Gamma-aminobutyrate (GABA) degradation	gamma-aminobutyrate transaminase	<i>gabT</i>	2.6.1.19	Ga0116594_108419	205	344	90	97	101	156
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_108418	168	238	63	59	75	87
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_104515	971	923	417	308	309	285
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_105929	4421	2962	1805	2139	1682	2071
	NADP-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>gabD</i>	1.2.1.79	Ga0116594_103729	35	26	30	19	13	9
	gamma-aminobutyrate aminotransferase	<i>puuE</i>	2.6.1.19	Ga0116594_107757	869	1111	321	117	200	180
	NAD-dependent succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>puuC</i>	1.2.1.24	Ga0116594_107753	312	401	113	57	67	61

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 7. Expression of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii*.

Supplemental material 7.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (1/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Urea catabolism and transport	Urea catabolism to ammonium	highly similar to uniprot P32528 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR208C DUR1,2 Urea amidolyase	<i>DUR1,2</i>	DEHA2D07040g	2.68	5.87	0.29	0.47	0.20	0.17	0.40	0.51	1.76	2.94
	Urea transport	similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2D07018g	3.43	26.06	0.08	0.38	0.03	0.13	0.09	0.32	1.09	7.32
		similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E23320g	0.95	1.10	0.96	1.06	1.02	1.06	1.02	1.30	0.90	1.22
		similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E24112g	0.92	1.36	0.92	1.20	1.30	2.97	0.99	1.82	0.77	1.34
Allantoin catabolism and transport	Allantoin catabolism to urea	some similarities with uniprot P32375 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR027C DAL1 Allantoinase	<i>DAL1-like</i>	DEHA2C05786g	1.08	1.25	0.99	1.46	1.65	3.82	0.97	1.80	0.95	1.46
		similar to uniprot P25335 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR029W DAL2 Allantoicase	<i>DAL2</i>	DEHA2B07612g	1.05	1.90	1.05	1.37	1.45	2.43	1.06	1.61	1.39	1.26
		similar to uniprot P32459 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR032c DAL3 ureidoglycolate hydrolase	<i>DAL3</i>	DEHA2G16764g	0.96	1.05	0.83	0.99	0.87	1.56	0.86	1.36	0.83	1.04
	Allantoin transport	similar to uniprot Q04895 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR028W DAL4 Allantoin permease or uniprot P05316 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR021W FUR4 Uracil permease	<i>DAL4</i>	DEHA2G08426g	1.26	1.26	0.37	0.69	0.25	0.98	0.40	0.78	0.76	1.27
		weakly similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5-like</i>	DEHA2A02662g	0.81	0.69	0.68	0.60	0.39	0.65	0.59	0.57	0.65	0.80
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2A07744g	0.89	1.10	0.91	1.11	2.25	2.20	1.74	2.77	1.20	2.08
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2C12276g	1.66	6.39	0.07	0.63	0.07	0.11	0.20	0.52	1.54	4.96
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2E00594g	0.77	1.05	1.02	1.04	0.96	1.16	0.93	1.27	0.98	1.13
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2F00748g	1.15	1.94	0.35	0.62	0.33	1.22	0.36	0.65	1.25	1.35
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2G24926g	0.85	0.66	0.92	0.65	0.65	1.11	0.86	0.82	0.83	0.85
Gamma-aminobutyrate (GABA) catabolism and transport	GABA catabolism to succinate	highly similar to uniprot P17649 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR019W UGA1 Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase	<i>UGA1</i>	DEHA2C16324g	0.97	0.80	1.11	0.97	0.92	1.99	1.15	1.04	1.31	0.91
		similar to uniprot P17649 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR019W UGA1 Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase	<i>UGA1</i>	DEHA2F09306g	0.86	1.47	0.88	1.18	1.09	1.82	0.87	1.22	1.03	0.96
		similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006W UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2</i>	DEHA2B06556g	0.79	1.14	0.99	1.31	1.33	2.42	0.94	1.47	0.78	0.94
		similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006W UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2</i>	DEHA2B10384g	0.95	0.87	0.90	0.96	0.96	1.22	1.19	1.16	1.53	1.17
		weakly similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006w UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2-like</i>	DEHA2E14696g	0.85	0.84	1.04	0.93	1.17	1.77	1.07	1.24	0.95	1.02
	GABA transport	similar to CA3801 CaUGA4 <i>Candida albicans</i> CaUGA4 GABA-specific transport protein	<i>CaUGA4</i>	DEHA2D18964g	1.21	2.32	0.23	0.65	0.13	0.56	0.21	0.61	0.51	1.10
		similar to uniprot P32837 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDL210W UGA4 Permease that serves as a gamma-aminobutyrate (GABA) transport protein	<i>UGA4</i>	DEHA2G22330g	1.29	3.56	0.08	0.37	0.03	0.23	0.15	0.45	0.43	2.04
Proline catabolism and transport	Proline catabolism to glutamate	similar to CA1552 <i>Candida albicans</i> PUT1 Proline oxidase	<i>PUT1</i>	DEHA2E17952g	1.51	0.77	1.09	1.18	2.84	1.40	2.81	1.49	3.96	2.01
		similar to uniprot P07275 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHR037W PUT2 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	<i>PUT2</i>	DEHA2G20482g	1.40	0.73	0.88	0.96	1.90	0.96	1.84	0.97	2.93	1.46
	Proline transport	similar to uniprot P15380 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR348c PUT4 proline specific permease	<i>PUT4</i>	DEHA2B01078g	0.84	0.74	0.31	0.54	0.17	0.21	0.25	0.30	0.68	0.58

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 7.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (2/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Arginine catabolism and transport	Arginine catabolism to proline	similar to uniprot P00812 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPL111W CAR1 arginase	<i>CAR1</i>	DEHA2G24706g	0.74	0.33	1.60	0.73	0.62	0.18	1.03	0.32	0.88	0.39
		weakly similar to uniprot P07991 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR438W CAR2 L-ornithine transaminase (OTase)	<i>CAR2-like</i>	DEHA2F00682g	1.22	1.13	0.93	1.01	2.64	2.21	2.32	2.54	3.14	3.71
		similar to uniprot P07991 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR438W CAR2 L-ornithine transaminase (OTase)	<i>CAR2</i>	DEHA2F06006g	0.74	0.36	1.73	0.75	0.68	0.27	1.06	0.32	0.80	0.35
		similar to uniprot P32263 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER023W PRO3 Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase	<i>PRO3</i>	DEHA2F06182g	0.94	0.92	0.90	0.98	0.80	0.73	0.68	0.81	0.83	0.74
	Arginine transport	similar to uniprot P04817 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEL063C CAN1 Plasma membrane arginine permease	<i>CAN1</i>	DEHA2F20944g	1.10	1.11	0.93	0.99	1.16	0.77	0.98	1.03	1.14	1.16
Glutamate metabolism	glutamate biosynthesis from glutamine	highly similar to uniprot P32288 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR035W GLN1 Glutamine synthetase (GS)	<i>GLN1</i>	DEHA2G19140g	1.20	1.27	1.14	1.18	1.52	1.12	1.28	1.35	1.28	1.26
		uniprot Q5EN26 <i>Debaryomyces hansenii</i> GLT1 Glutamate synthase	<i>GLT1</i>	DEHA2G15642g	1.63	3.68	0.40	0.77	0.37	0.82	0.76	1.51	1.31	2.06
	glutamate biosynthesis from ammonia	uniprot Q9HGS2 <i>Debaryomyces hansenii</i> GDH1 NADP- dependent glutamate dehydrogenase	<i>GDH1</i>	DEHA2C17204g	1.19	1.14	0.91	0.88	0.91	0.50	1.05	0.93	1.37	1.11
	glutamate degradation to 2-oxoglutarate	similar to uniprot P33327 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDL215c GDH2 NAD-specific glutamate dehydrogenase	<i>GDH2</i>	DEHA2C10054g	0.93	0.45	1.54	0.93	2.26	5.28	1.66	1.08	1.32	0.71
	glutamate degradation to GABA	similar to uniprot Q04792 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR250W GAD1 Glutamate decarboxylase	<i>GAD1</i>	DEHA2F10450g	0.75	1.30	0.96	1.54	1.66	3.33	1.21	1.88	0.95	1.16
Glutamine catabolism and transport	Glutamine catabolism to glutamate	similar to uniprot Q03144 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR095c SNO1 Protein of unconfirmed function; involved in pyridoxine metabolism	<i>SNO1</i>	DEHA2F01342g	1.14	1.34	1.14	1.15	2.29	1.95	2.45	2.16	1.89	2.04
		highly similar to uniprot Q03148 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR096W SNZ1 Protein involved in vitamin B6 biosynthesis	<i>SNZ1</i>	DEHA2F01364g	0.95	1.04	1.24	1.35	2.06	1.96	1.67	1.87	1.45	1.47
		similar to uniprot P38625 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR217W GUA1 GMP synthase	<i>GUA1</i>	DEHA2F11110g	1.21	1.31	0.93	1.31	1.45	0.64	1.12	1.01	1.25	1.12
		highly similar to uniprot P07259 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJL130C URA2 Multifunctional carbamoylphosphate synthetase-aspartate transcarbamylase	<i>URA2</i>	DEHA2A10384g	0.92	0.87	0.85	1.17	1.11	0.60	0.97	0.93	1.00	1.09
		highly similar to CA0874 CaCPA1 <i>Candida albicans</i> CaCPA1 Arginine-specific carbamoylphosphate synthase small chain	<i>CaCPA1</i>	DEHA2G02618g	1.22	1.28	0.76	1.07	0.93	0.53	0.84	0.99	1.07	1.32
		similar to uniprot P03965 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR109C CPA2 Large subunit of carbamoyl phosphate synthetase	<i>CPA2</i>	DEHA2C05412g	1.27	1.26	0.85	1.15	1.20	0.65	0.99	1.07	1.15	1.37
		highly similar to uniprot P49089 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR145W ASN1 Asparagine synthetase isozyme of Asn2p	<i>ASN1</i>	DEHA2B09680g	1.31	1.08	0.96	1.17	1.30	0.60	1.08	0.95	1.17	1.09
		highly similar to uniprot P28274 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBL039c URA7 CTP synthase 1 or uniprot P38627 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR103w URA8	<i>URA7</i> or <i>URA8</i>	DEHA2G24574g	1.05	1.16	0.96	1.32	1.30	0.64	1.01	1.02	1.02	1.09
	similar to uniprot P33734 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR248C HIS7 Imidazole glycerol phosphate synthase	<i>HIS7</i>	DEHA2A04488g	1.11	1.03	1.09	1.12	1.36	0.95	1.21	1.06	1.23	1.12	
	Glutamine transport	similar to uniprot P48813 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR508C GNP1 High-affinity glutamine permease	<i>GNP1</i>	DEHA2A00748g	0.96	0.62	1.35	0.80	1.41	1.86	1.53	0.83	1.25	0.69
		similar to uniprot P48813 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR508C GNP1 High-affinity glutamine permease	<i>GNP1</i>	DEHA2G07216g	1.14	0.82	0.67	0.86	0.64	0.51	0.89	0.58	1.34	0.98
Asparagine catabolism	Asparagine catabolism to aspartate	similar to uniprot P38986 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR321W ASP1 Cytosolic L-asparaginase	<i>ASP1</i>	DEHA2G05918g	1.15	1.16	0.99	1.16	1.28	0.81	1.12	1.02	1.34	1.20
		similar to uniprot Q6Q5K9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR160c ASP3-4 cell wall L-asparaginase II	<i>ASP3-4</i>	DEHA2B00308g	1.16	1.44	1.03	1.31	4.34	5.23	3.49	6.94	2.43	5.91

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 7.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (3/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Glycine catabolism	Glycine catabolism to ammonium	similar to uniprot P48015 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR019c GCV1 T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV1</i>	DEHA2C04708g	1.14	1.35	1.28	1.41	3.33	2.11	3.58	2.37	3.68	2.38
		similar to uniprot P49095 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR189W GCV2 P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV2</i>	DEHA2F03806g	1.34	1.49	1.12	1.43	2.60	0.79	3.10	1.70	3.40	2.17
		similar to uniprot P39726 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YAL044C GCV3 H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV3</i>	DEHA2D05368g	1.05	1.19	1.07	1.15	1.33	1.31	1.39	1.19	1.51	1.14
Serine and threonine catabolism	Serine and threonine catabolism to pyruvate	similar to uniprot P25379 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YCL064c CHA1 L-serine/L-threonine deaminase	<i>CHA1</i>	DEHA2A02090g	1.10	1.25	2.00	2.44	5.79	2.31	5.78	3.50	4.56	2.90
Ammonium transport	Ammonium import	similar to uniprot P40260 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR121C MEP1 Ammonium permease	<i>MEP1</i>	DEHA2G02156g	1.30	1.71	0.73	0.78	0.48	0.08	0.76	0.83	1.42	1.62
		similar to uniprot P41948 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL142W MEP2 high affinity low capacity ammonia permease	<i>MEP2</i>	DEHA2D03234g	1.40	2.94	0.21	0.39	0.07	0.12	0.27	0.43	0.85	2.77
		some similarities with uniprot P53390 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR138C MEP3 Ammonium permease of high capacity and low affinity	<i>MEP3</i>	DEHA2F24442g	1.10	1.06	1.06	1.03	1.10	1.14	0.96	1.05	1.12	1.16
	Ammonium export	similar to uniprot P32907 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNR002C Putative transmembrane protein involved in export of ammonia	<i>ATO2</i>	DEHA2F17996g	0.84	0.99	0.96	0.93	2.06	0.89	0.98	1.47	1.16	1.09
similar to uniprot P32907 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNR002C Putative transmembrane protein involved in export of ammonia		<i>ATO2</i>	DEHA2C15158g	0.83	0.30	1.36	0.39	0.73	0.55	0.46	0.28	0.42	0.13	
Transaminase		similar to uniprot P52893 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR089C ALT1 putative alanine transaminase (glutamyl pyruvic transaminase)	<i>ALT1</i>	DEHA2B08382g	1.06	0.80	0.94	0.76	1.36	1.18	1.48	1.06	2.05	1.56
		similar to uniprot P53090 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL202W ARO8 Aromatic aminotransferase	<i>ARO8</i>	DEHA2A06886g	1.08	0.88	1.05	1.02	0.88	0.87	0.91	0.87	0.93	0.92
		similar to uniprot P23542 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR027C AAT2 cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2B02288g	0.85	0.93	0.81	0.94	0.76	1.52	0.70	0.99	0.66	0.80
		similar to uniprot P23542 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR027C AAT2 cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2B03014g	0.87	0.73	1.37	0.89	1.37	1.64	1.20	1.14	0.74	0.75
		similar to uniprot P23542 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR027C AAT2 Cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2C05236g	0.95	0.70	1.33	0.83	0.95	0.40	1.06	0.58	0.84	0.47
		similar to uniprot P23542 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR027C AAT2 Cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2E03630g	1.04	0.73	1.28	0.71	1.00	1.60	0.99	0.77	0.89	0.56
		highly similar to uniprot P47176 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR148W BAT2 Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	<i>BAT2</i>	DEHA2D06952g	0.95	0.90	1.13	1.04	1.29	1.01	0.75	0.79	0.77	0.62
		weakly similar to uniprot P43567 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YFL030W AGX1 Alanine:glyoxylate aminotransferase	<i>AGX1-like</i>	DEHA2G07854g	1.16	1.30	0.89	1.15	0.97	0.38	0.76	0.79	1.07	1.35
similar to uniprot P43567 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YFL030W AGX1 Alanine:glyoxylate aminotransferase	<i>AGX</i>	DEHA2E01694g	1.29	0.86	1.19	0.82	1.17	1.28	1.15	0.91	1.06	0.77		

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 7.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (4/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Amino acid transport		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C07194g	1.20	1.06	1.00	1.10	1.07	0.69	0.95	0.87	1.04	1.02
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C12056g	1.10	0.88	0.28	0.24	0.04	0.27	0.17	0.15	0.31	0.42
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2D10164g	1.03	1.03	1.13	0.81	0.49	0.40	0.87	0.95	0.61	1.11
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E10076g	1.01	1.35	1.38	1.78	2.58	1.84	1.64	2.13	1.55	1.78
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E11308g	1.28	0.96	1.07	1.04	1.34	1.04	0.95	0.87	1.28	1.04
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E14630g	1.19	0.99	0.86	1.13	0.73	0.37	0.70	0.58	0.77	0.81
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G06930g	1.05	0.68	1.37	1.41	1.67	0.78	1.21	0.84	1.28	0.87
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G21934g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
		similar to uniprot P43548 Saccharomyces cerevisiae YFL055W AGP3 Low-affinity amino acid permease	<i>AGP3</i>	DEHA2G11572g	1.01	1.11	0.85	1.13	1.12	0.64	0.96	0.99	1.36	1.28
		similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1</i>	DEHA2C03102g	0.99	1.57	1.26	1.86	2.07	2.27	1.31	2.24	1.28	1.85
		weakly similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1-like</i>	DEHA2F05566g	1.01	0.90	0.89	0.78	0.72	0.75	0.83	0.83	0.83	0.90
		similar to uniprot P38734 Saccharomyces cerevisiae YHL036W MUP3 Low affinity methionine permease	<i>MUP3</i>	DEHA2D12078g	1.10	1.23	0.96	1.07	0.93	1.39	0.90	1.27	0.91	1.15
		similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2C00220g	0.96	0.76	0.83	0.77	1.92	1.08	2.40	1.96	1.86	2.09
		similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2E00517g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
		similar to uniprot P32487 Saccharomyces cerevisiae YNL268W LYP1 Lysine permease	<i>LYP1</i>	DEHA2A00638g	0.95	0.87	0.84	1.01	1.30	1.00	1.18	1.07	1.14	1.02
		similar to uniprot P32487 Saccharomyces cerevisiae YNL268W LYP1 Lysine permease	<i>LYP1</i>	DEHA2G14608g	1.10	1.49	0.88	1.21	0.68	0.48	0.79	1.25	1.27	1.71
		similar to uniprot P41815 Saccharomyces cerevisiae YDR046C BAP3 Amino acid permease or uniprot P38084 Saccharomyces cerevisiae YBR068C BAP2 High-affinity leucine permease	<i>BAP2 or BAP3</i>	DEHA2G04994g	1.06	0.97	1.15	1.25	1.17	0.75	0.96	0.92	1.05	0.97
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2B02332g	1.10	0.77	1.10	0.81	1.25	1.67	1.35	1.59	1.01	1.05
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2C07832g	1.12	0.70	0.72	0.67	0.32	0.37	0.55	0.38	0.67	0.57
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2C07898g	1.42	2.00	0.21	0.61	0.25	0.55	1.04	0.92	2.65	3.32
	similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2E01276g	0.70	2.86	0.88	1.15	1.75	2.69	1.81	5.72	2.01	11.91	
	weakly similar to uniprot Q12375 Saccharomyces cerevisiae YOR130C ORT1 ornithine transporter of the mitochondrial inner membrane	<i>ORT1-like</i>	DEHA2E09108g	1.14	0.99	1.06	0.90	0.86	0.58	0.86	0.70	0.95	0.86	
	similar to uniprot Q12375 Saccharomyces cerevisiae YOR130c ORT1 ornithine transporter of the mitochondrial inner membrane	<i>ORT1</i>	DEHA2G13530g	1.02	1.09	1.08	1.12	1.03	0.77	0.82	0.80	1.01	0.88	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 7.2. Expression level of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (1/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a												
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175	
Urea catabolism and transport	Urea catabolism to ammonium	highly similar to uniprot P32528 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR208C DUR1,2 Urea amidolyase	<i>DUR1,2</i>	DEHA2D07040g	17649	5875	43833	32940	5111	2518	2743	840	7764	3028	28683	15466	
	Urea transport	similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2D07018g	7284	479	23231	11895	564	168	158	55	652	152	7275	3089	
		similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E23320g	353	254	309	271	340	247	295	230	299	274	295	281	
		similar to uniprot P33413 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E24112g	142	89	121	117	130	98	151	226	96	118	100	109	
Allantoin catabolism and transport	Allantoin catabolism to urea	some similarities with uniprot P32375 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR027C DAL1 Allantoinase	<i>DAL1-like</i>	DEHA2C05786g	7221	5793	7265	7003	7333	7661	9717	18877	6242	8227	6404	7683	
		similar to uniprot P25335 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR029W DAL2 Allantoicase	<i>DAL2</i>	DEHA2B07612g	69	71	66	130	72	89	82	148	52	71	87	81	
		similar to uniprot P32459 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR032c DAL3 ureidoglycolate hydrolase	<i>DAL3</i>	DEHA2G16764g	340	256	300	259	283	233	244	343	230	278	261	245	
	Allantoin transport	similar to uniprot Q04895 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIR028W DAL4 Allantoin permease or uniprot P05316 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR021W FUR4 Uracil permease	<i>DAL4</i>	DEHA2G08426g	5569	2083	6494	2532	2065	1319	1144	1756	2111	1295	3916	2403	
		weakly similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5-like</i>	DEHA2A02662g	214	178	157	119	144	101	68	100	116	87	128	130	
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2A07744g	100	78	82	83	91	79	184	147	114	181	110	148	
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2C12276g	514	37	794	227	36	21	29	4	115	18	730	165	
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2E00594g	134	128	95	131	138	124	105	129	104	133	122	133	
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2F00748g	508	238	533	442	176	137	138	250	144	115	577	290	
		similar to uniprot P15365 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR152W DAL5 Allantoin permease	<i>DAL5</i>	DEHA2G24926g	491	453	378	290	445	274	258	433	336	282	371	353	
Gamma-aminobutyrate (GABA) catabolism and transport	GABA catabolism to succinate	highly similar to uniprot P17649 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR019W UGA1 Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase	<i>UGA1</i>	DEHA2C16324g	1270	1487	1139	1144	1422	1336	968	2550	1289	1075	1538	1231	
		similar to uniprot P17649 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR019W UGA1 Gamma-aminobutyrate (GABA) transaminase	<i>UGA1</i>	DEHA2F09306g	208	207	165	290	183	224	186	323	146	193	196	180	
		similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006W UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2</i>	DEHA2B06556g	1369	1238	994	1357	1359	1486	1497	2569	1039	1367	983	1062	
		similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006W UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2</i>	DEHA2B10384g	1117	1138	979	949	1004	1003	868	1192	1269	1056	1568	1201	
			weakly similar to uniprot P38067 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR006W UGA2 Succinate semialdehyde dehydrogenase	<i>UGA2-like</i>	DEHA2E14696g	165	169	128	138	171	146	157	258	141	157	143	158
	GABA transport	similar to CA3801 CaUGA4 <i>Candida albicans</i> CaUGA4 GABA-specific transport protein	<i>CaUGA4</i>	DEHA2D18964g	512	115	574	255	117	69	55	55	102	59	241	113	
		similar to uniprot P32837 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDL210W UGA4 Permease that serves as a gamma-aminobutyrate (GABA) transport protein	<i>UGA4</i>	DEHA2G22330g	1501	96	1801	329	118	33	38	19	241	40	592	175	
Proline catabolism and transport	Proline catabolism to glutamate	similar to CA1552 <i>Candida albicans</i> PUT1 Proline oxidase	<i>PUT1</i>	DEHA2E17952g	1153	1650	1597	1214	1271	1770	2684	1973	2461	2059	4249	3007	
		similar to uniprot P07275 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHR037W PUT2 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	<i>PUT2</i>	DEHA2G20482g	1518	1870	1949	1299	1351	1633	2333	1536	2387	1516	4134	2464	
	Proline transport	similar to uniprot P15380 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR348c PUT4 proline specific permease	<i>PUT4</i>	DEHA2B01078g	747	373	568	267	227	189	104	68	183	93	466	195	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 7.2. Expression level of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (2/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Arginine catabolism and transport	Arginine catabolism to proline	similar to uniprot P00812 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPL111W CAR1 arginase	<i>CAR1</i>	DEHA2G24706g	3181	8720	2129	2798	5050	5908	1571	1362	2897	2580	2568	3104
		weakly similar to uniprot P07991 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR438W CAR2 L-ornithine transaminase (OTase)	<i>CAR2-like</i>	DEHA2F00682g	155	121	173	132	144	112	329	231	313	267	447	408
		similar to uniprot P07991 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR438W CAR2 L-ornithine transaminase (OTase)	<i>CAR2</i>	DEHA2F06006g	2670	8024	1797	2798	4579	5610	1476	1856	2530	2233	1966	2542
		similar to uniprot P32263 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER023W PRO3 Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase	<i>PRO3</i>	DEHA2F06182g	302	333	262	294	271	298	197	208	201	233	230	226
	Arginine transport	similar to uniprot P04817 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEL063C CAN1 Plasma membrane arginine permease	<i>CAN1</i>	DEHA2F20944g	4190	4532	4271	4848	3950	4084	3952	2971	3915	4191	4445	4775
Glutamate metabolism	glutamate biosynthesis from glutamine	highly similar to uniprot P32288 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR035W GLN1 Glutamine synthetase (GS)	<i>GLN1</i>	DEHA2G19140g	25883	28417	28652	34764	29875	30476	32180	27161	29244	34350	30782	32506
		uniprot Q5EN26 <i>Debaryomyces hansenii</i> GLT1 Glutamate synthase	<i>GLT1</i>	DEHA2G15642g	7775	3210	11675	11293	3130	2248	2361	2256	5870	4031	9321	5975
	glutamate biosynthesis from ammonia	uniprot Q9HGS2 <i>Debaryomyces hansenii</i> GDH1 NADP- dependent glutamate dehydrogenase	<i>GDH1</i>	DEHA2C17204g	55111	56424	60039	61548	50371	45537	40451	24073	56667	48150	69761	56964
	glutamate degradation to 2-oxoglutarate	similar to uniprot P33327 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDL215c GDH2 NAD-specific glutamate dehydrogenase	<i>GDH2</i>	DEHA2C10054g	3655	6699	3128	2880	5642	5744	6766	30514	4353	5002	4447	4303
	glutamate degradation to GABA	similar to uniprot Q04792 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR250W GAD1 Glutamate decarboxylase	<i>GAD1</i>	DEHA2F10450g	3252	3193	2242	4004	3143	4462	4461	9146	3045	4574	2816	3372
Glutamine catabolism and transport	Glutamine catabolism to glutamate	similar to uniprot Q03144 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR095c SNO1 Protein of unconfirmed function; involved in pyridoxine metabolism	<i>SNO1</i>	DEHA2F01342g	133	141	140	182	153	148	253	236	197	246	233	262
		highly similar to uniprot Q03148 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR096W SNZ1 Protein involved in vitamin B6 biosynthesis	<i>SNZ1</i>	DEHA2F01364g	1010	1038	880	1044	1252	1275	1697	1745	1504	1612	1346	1390
		similar to uniprot P38625 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR217W GUA1 GMP synthase	<i>GUA1</i>	DEHA2F11110g	4085	4292	4579	5388	3846	5056	4810	2323	4726	4048	4769	4350
		highly similar to uniprot P07259 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJL130C URA2 Multifunctional carbamoylphosphate synthetase-aspartate transcarbamylase	<i>URA2</i>	DEHA2A10384g	24404	24151	20647	20138	21066	25561	21984	12299	24964	21435	22764	23891
		highly similar to CA0874 CaCPA1 <i>Candida albicans</i> CaCPA1 Arginine-specific carbamoylphosphate synthase small chain	<i>CaCPA1</i>	DEHA2G02618g	4979	3361	5629	4131	3834	3272	3749	1504	4277	3129	5020	4043
		similar to uniprot P03965 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR109C CPA2 Large subunit of carbamoyl phosphate synthetase	<i>CPA2</i>	DEHA2G05412g	6475	4800	7601	5800	5587	5014	6278	2640	6464	4770	6917	5951
		highly similar to uniprot P49089 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR145W ASN1 Asparagine synthetase isozyme of Asn2p	<i>ASN1</i>	DEHA2B09680g	13042	14335	15844	14848	12746	15107	13733	7305	14014	12602	14227	14121
		highly similar to uniprot P28274 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBL039c URA7 CTP synthase 1 or uniprot P38627 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR103w URA8	<i>URA7</i> or <i>URA8</i>	DEHA2G24574g	8866	8280	8611	9241	8643	9871	9318	4495	8733	8065	8435	8211
		similar to uniprot P33734 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR248C HIS7 Imidazole glycerol phosphate synthase	<i>HIS7</i>	DEHA2A04488g	1016	1088	1035	1070	1114	1105	1121	887	1119	1005	1155	1104
		Glutamine transport	similar to uniprot P48813 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR508C GNP1 High-affinity glutamine permease	<i>GNP1</i>	DEHA2A00748g	485	754	426	449	648	556	551	1208	610	468	554
		similar to uniprot P48813 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR508C GNP1 High-affinity glutamine permease	<i>GNP1</i>	DEHA2G07216g	563	414	596	327	382	324	293	179	510	214	702	368
Asparagine catabolism	Asparagine catabolism to aspartate	similar to uniprot P38986 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR321W ASP1 Cytosolic L-asparaginase	<i>ASP1</i>	DEHA2G05918g	688	678	737	759	694	715	717	468	696	596	856	740
		similar to uniprot Q6Q5K9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR160c ASP3-4 cell wall L-asparaginase II	<i>ASP3-4</i>	DEHA2B00308g	8	8	8	12	8	10	27	38	19	45	17	46

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 7.2. Expression level of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (3/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Glycine catabolism	Glycine catabolism to ammonium	similar to uniprot P48015 Saccharomyces cerevisiae YDR019c GCV1 T subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV1</i>	DEHA2C04708g	454	458	474	593	582	582	1210	817	1467	890	1534	993
		similar to uniprot P49095 Saccharomyces cerevisiae YMR189W GCV2 P subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV2</i>	DEHA2F03806g	2775	2851	3410	4058	3134	3687	5741	1906	8422	4426	8707	5618
		similar to uniprot P39726 Saccharomyces cerevisiae YAL044C GCV3 H subunit of the mitochondrial glycine decarboxylase complex	<i>GCV3</i>	DEHA2D05368g	522	498	505	567	561	524	562	557	670	485	724	518
Serine and threonine catabolism	Serine and threonine catabolism to pyruvate	similar to uniprot P25379 Saccharomyces cerevisiae YCL064c CHA1 L-serine/L-threonine deaminase	<i>CHA1</i>	DEHA2A02090g	246	300	246	358	489	660	1122	585	1216	890	1027	789
Ammonium transport	Ammonium import	similar to uniprot P40260 Saccharomyces cerevisiae YGR121C MEP1 Ammonium permease	<i>MEP1</i>	DEHA2G02156g	7137	5564	8536	9185	5239	3940	2733	371	5844	4770	9347	8185
		similar to uniprot P41948 Saccharomyces cerevisiae YNL142w MEP2 high affinity low capacity ammonia permease	<i>MEP2</i>	DEHA2D03234g	6644	965	8555	2725	1397	344	346	96	2052	422	5188	2406
		some similarities with uniprot P53390 Saccharomyces cerevisiae YPR138C MEP3 Ammonium permease of high capacity and low affinity	<i>MEP3</i>	DEHA2F24442g	1372	1263	1391	1289	1468	1189	1221	1229	1169	1120	1424	1332
	Ammonium export	similar to uniprot P32907 Saccharomyces cerevisiae YNR002C Putative transmembrane protein involved in export of ammonia	<i>ATO2</i>	DEHA2F17996g	60	89	46	84	57	76	100	67	40	110	65	88
		similar to uniprot P32907 Saccharomyces cerevisiae YNR002C Putative transmembrane protein involved in export of ammonia	<i>ATO2</i>	DEHA2C15158g	148	309	108	89	195	114	87	146	60	64	56	37
Transaminase		similar to uniprot P52893 Saccharomyces cerevisiae YLR089C ALT1 putative alanine transaminase (glutamyl pyruvic transaminase)	<i>ALT1</i>	DEHA2B08382g	472	450	454	346	440	314	514	456	654	395	886	636
		similar to uniprot P53090 Saccharomyces cerevisiae YGL202W ARO8 Aromatic aminotransferase	<i>ARO8</i>	DEHA2A06886g	1089	1168	1077	984	1151	1098	780	877	906	874	931	973
		similar to uniprot P23542 Saccharomyces cerevisiae YLR027C AAT2 cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2B02288g	174	130	135	117	141	113	109	170	104	104	105	95
		similar to uniprot P23542 Saccharomyces cerevisiae YLR027C AAT2 cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2B03014g	1481	1546	1169	1070	2031	1258	1645	2175	1491	1402	1006	1057
		similar to uniprot P23542 Saccharomyces cerevisiae YLR027C AAT2 Cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2C05236g	3739	5858	3209	3927	4930	4455	2861	1971	3665	2995	2865	2519
		similar to uniprot P23542 Saccharomyces cerevisiae YLR027C AAT2 Cytosolic aspartate aminotransferase	<i>AAT2</i>	DEHA2E03630g	1356	2324	1276	1637	1715	1527	1110	3214	1130	1226	1107	1198
		highly similar to uniprot P47176 Saccharomyces cerevisiae YJR148W BAT2 Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	<i>BAT2</i>	DEHA2D06952g	2659	2709	2328	2332	3018	2569	2794	2336	1869	1724	1897	1524
		weakly similar to uniprot P43567 Saccharomyces cerevisiae YFL030W AGX1 Alanine:glyoxylate aminotransferase	<i>AGX1-like</i>	DEHA2G07854g	305	257	329	325	275	268	236	82	236	203	302	315
		similar to uniprot P43567 Saccharomyces cerevisiae YFL030W AGX1 Alanine:glyoxylate aminotransferase	<i>AGX</i>	DEHA2E01694g	1729	2397	2024	1969	2048	1782	1656	2639	1795	1691	1688	1669

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 7.2. Expression level of selected genes involved in nitrogen catabolism in *D. hansenii* (4/4).

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Amino acid transport		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C07194g	2067	2008	2301	2045	2104	2005	1801	1185	1876	1601	2000	1867
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C12056g	25653	8238	25911	6972	7294	1907	747	1951	4765	867	7390	3122
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2D10164g	627	274	594	274	710	204	252	93	454	240	354	277
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E10076g	6334	7116	5963	9318	8911	11441	13442	11134	9011	13698	9172	11489
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E11308g	795	917	940	846	856	861	864	814	742	666	943	871
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E14630g	309	239	344	228	272	244	183	75	227	132	223	175
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G06930g	898	1529	867	1007	1242	1960	1217	1017	986	1188	1071	1210
		similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G21934g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		similar to uniprot P43548 Saccharomyces cerevisiae YFL055W AGP3 Low-affinity amino acid permease	<i>AGP3</i>	DEHA2G11572g	1698	1676	1582	1784	1465	1718	1542	914	1640	1584	2147	1953
		similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1</i>	DEHA2C03102g	7623	6924	7045	10533	9856	11624	13020	13377	8941	13739	9193	11610
		weakly similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1-like</i>	DEHA2F05566g	425	356	394	309	377	256	247	229	324	250	326	294
		similar to uniprot P38734 Saccharomyces cerevisiae YHL036W MUP3 Low affinity methionine permease	<i>MUP3</i>	DEHA2D12078g	233	180	237	214	225	176	178	215	175	191	197	189
		similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2C00220g	10	10	8	7	8	7	15	9	17	17	17	19
		similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2E00517g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		similar to uniprot P32487 Saccharomyces cerevisiae YNL268W LYP1 Lysine permease	<i>LYP1</i>	DEHA2A00638g	56	57	49	47	47	52	59	49	54	51	59	53
		similar to uniprot P32487 Saccharomyces cerevisiae YNL268W LYP1 Lysine permease	<i>LYP1</i>	DEHA2G14608g	287	158	292	227	256	172	160	65	242	176	337	245
		similar to uniprot P41815 Saccharomyces cerevisiae YDR046C BAP3 Amino acid permease or uniprot P38084 Saccharomyces cerevisiae YBR068C BAP2 High-affinity leucine permease	<i>BAP2 or BAP3</i>	DEHA2G04994g	18996	22242	18630	20692	22207	25224	17903	14088	17913	18933	18628	19579
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2B02332g	324	317	327	234	353	238	328	456	329	357	302	305
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2C07832g	24576	20778	25157	13916	17695	12970	6297	6507	13208	7053	15256	10746
		similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2C07898g	168	39	218	73	35	22	33	18	190	33	405	115
	similar to uniprot P53388 Saccharomyces cerevisiae YPL265W DIP5 Dicarboxylic amino acid permease	<i>DIP5</i>	DEHA2E01276g	34	21	22	58	30	23	49	49	56	121	64	231	
	weakly similar to uniprot Q12375 Saccharomyces cerevisiae YOR130C ORT1 ornithine transporter of the mitochondrial inner membrane	<i>ORT1-like</i>	DEHA2E09108g	285	308	298	292	305	252	197	152	223	191	251	241	
	similar to uniprot Q12375 Saccharomyces cerevisiae YOR130c ORT1 ornithine transporter of the mitochondrial inner membrane	<i>ORT1</i>	DEHA2G13530g	322	319	305	335	353	324	271	209	249	223	305	257	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 8. Expression of selected genes involved in lipid catabolism in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 8.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in lipid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Triacylglycerol degradation	triacylglycerol lipase		3.1.1.3	Ga0063698_02351	Ga0063690_02917	1.04	0.95	1.91	2.12
beta-oxidation	acyl-CoA synthetase		K01897	Ga0063698_00092	Ga0063690_00175	1.03	1.41	1.13	1.26
				Ga0063698_03874	-	NE	NE	-	-
				Ga0063698_01191	Ga0063690_01400	1.53	1.32	1.39	1.92
				Ga0063698_03660	-	0.81	0.63	-	-
				-	Ga0063690_02615	-	-	0.76	0.58
	acyl-CoA dehydrogenase		K00232 / K00249 / K00255	Ga0063698_00252	Ga0063690_00006	1.33	1.75	0.82	0.70
				Ga0063698_01319	Ga0063690_00954	1.14	0.82	0.93	1.09
				Ga0063698_01192	Ga0063690_01399	0.56	0.81	1.03	1.54
				Ga0063698_03587	Ga0063690_03325	1.02	2.71	0.88	0.99
	enoyl-CoA hydratase		K01692	Ga0063698_00716	Ga0063690_00592	1.00	1.14	1.01	0.89
				Ga0063698_03346	Ga0063690_02599	0.58	0.89	0.65	0.89
				Ga0063698_03347	Ga0063690_02600	0.46	0.86	0.67	0.80
	enoyl-CoA hydratase /3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase		K01782	Ga0063698_02838	Ga0063690_02592	0.67	0.75	1.28	1.59
3-ketoacyl-CoA thiolase		K00632	Ga0063698_03125	Ga0063690_03699	0.64	0.54	0.63	0.57	
Glycerol degradation via glycerol kinase	glycerol kinase	<i>glpK</i>	2.7.1.30	Ga0063698_02908	Ga0063690_02523	0.54	0.90	0.97	1.24
	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>glpD</i>	1.1.5.3	Ga0063698_02906	Ga0063690_02525	0.85	1.03	0.96	1.03
				Ga0063698_03113	-	0.86	0.62	-	-

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 8.2. Expression level of selected genes involved in lipid catabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Triacylglycerol degradation	triacylglycerol lipase		3.1.1.3	Ga0063698_02351	Ga0063690_02917	29	46	29	40	47	107	88	219
beta-oxidation	acyl-CoA synthetase		K01897	Ga0063698_00092	Ga0063690_00175	240	218	246	299	239	304	259	368
				Ga0063698_03874	-	-	-	-	-	-	-		
				Ga0063698_01191	Ga0063690_01400	11	12	16	18	32	48	43	87
				Ga0063698_03660	-	21	22	17	13	-	-	-	-
				-	Ga0063690_02615	-	-	-	-	52	41	38	23
	acyl-CoA dehydrogenase		K00232 / K00249 / K00255	Ga0063698_00252	Ga0063690_00006	288	261	381	455	450	738	353	494
				Ga0063698_01319	Ga0063690_00954	1636	2444	1850	1948	1938	2181	1737	2269
				Ga0063698_01192	Ga0063690_01399	55	43	31	39	111	156	110	230
				Ga0063698_03587	Ga0063690_03325	89	59	91	162	37	29	31	28
	enoyl-CoA hydratase		K01692	Ga0063698_00716	Ga0063690_00592	330	428	327	477	234	400	226	344
				Ga0063698_03346	Ga0063690_02599	321	243	186	204	261	226	163	193
				Ga0063698_03347	Ga0063690_02600	160	114	74	91	156	113	100	87
enoyl-CoA hydratase /3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase		K01782	Ga0063698_02838	Ga0063690_02592	315	334	211	245	249	265	306	404	
			Ga0063698_03125	Ga0063690_03699	1538	1547	987	815	390	358	237	194	
Glycerol degradation via glycerol kinase	glycerol kinase	<i>glpK</i>	2.7.1.30	Ga0063698_02908	Ga0063690_02523	289	143	155	131	619	436	577	516
	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>glpD</i>	1.1.5.3	Ga0063698_02906	Ga0063690_02525	422	376	356	367	811	753	753	744
				Ga0063698_03113	-	15	18	13	13	-	-	-	-

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 9. Expression of selected genes involved in lipid catabolism in *H. alvei*.

Supplemental material 9.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in lipid catabolism in *H. alvei*.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag	Fold change ^a					
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA		
beta-oxidation	acyl-CoA synthetase		K01897	Ga0116594_1007370	0.81	0.68	0.90	1.16		
				Ga0116594_109665	1.21	1.28	1.40	2.07		
	acyl-CoA dehydrogenase		K06445	Ga0116594_1086120	0.62	0.83	1.05	2.35		
				3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase	K01825	Ga0116594_105444	0.63	1.05	0.65	1.68
						3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase	K01782	Ga0116594_113328	0.64	0.52
acetyl-CoA acyltransferase		K00632	Ga0116594_105443	0.57	0.86	1.15	2.18			
			Ga0116594_113327	0.60	0.62	0.41	0.75			
Glycerol degradation via glycerol kinase	glycerol kinase	<i>glpK</i>	2.7.1.30	Ga0116594_1035146	0.88	1.46	1.39	2.38		
	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>glpD</i>	1.1.5.3	Ga0116594_108088	1.40	0.70	0.88	0.57		
	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A	<i>glpA</i>	1.1.5.3	Ga0116594_110025	4.54	1.98	3.00	2.17		
				Ga0116594_110024	5.92	2.51	3.97	2.36		
				Ga0116594_110023	6.96	3.18	4.95	2.89		
Glycerol degradation via glycerol dehydrogenase	glycerol dehydrogenase	<i>gldA</i>	1.1.1.6	Ga0116594_1018154	21.72	10.59	28.16	13.27		
	dihydroxyacetone kinase subunit K	<i>dhaK</i>	2.7.1.121	Ga0116594_1018155	13.55	5.58	17.34	6.71		
	dihydroxyacetone kinase subunit L	<i>dhaL</i>		Ga0116594_1018156	8.37	3.75	13.15	4.58		
	dihydroxyacetone kinase subunit M	<i>dhaM</i>		Ga0116594_1018157	5.60	2.98	8.50	2.98		

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 9.2. Expression level of selected genes involved in lipid catabolism in *H. alvei*.

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
beta-oxidation	acyl-CoA synthetase		K01897	Ga0116594_1007370	157	161	129	110	132	169
				Ga0116594_109665	219	246	268	316	287	461
	acyl-CoA dehydrogenase		K06445	Ga0116594_1086120	791	684	500	565	781	1457
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase / enoyl-CoA isomerase		K01825	Ga0116594_105444	323	240	205	254	198	366
	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / enoyl-CoA hydratase / 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase		K01782	Ga0116594_113328	45	53	29	28	28	51
	acetyl-CoA acyltransferase		K00632	Ga0116594_105443	75	63	43	54	81	124
				Ga0116594_113327	54	50	33	31	21	34
Glycerol degradation via glycerol kinase	glycerol kinase	<i>glpK</i>	2.7.1.30	Ga0116594_1035146	1467	814	1297	1194	1899	1760
	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase	<i>glpD</i>	1.1.5.3	Ga0116594_108088	1178	2488	1656	1744	968	1282
	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit A	<i>glpA</i>	1.1.5.3	Ga0116594_110025	97	287	444	573	271	570
	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B	<i>glpB</i>		Ga0116594_110024	54	176	322	444	199	380
	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C	<i>glpC</i>		Ga0116594_110023	53	181	370	579	243	477
Glycerol degradation via glycerol dehydrogenase	glycerol dehydrogenase	<i>gldA</i>	1.1.1.6	Ga0116594_1018154	65	109	1411	1158	1692	1313
	dihydroxyacetone kinase subunit K	<i>dhaK</i>	2.7.1.121	Ga0116594_1018155	28	54	384	305	454	331
	dihydroxyacetone kinase subunit L	<i>dhaL</i>		Ga0116594_1018156	14	26	122	100	177	111
	dihydroxyacetone kinase subunit M	<i>dhaM</i>		Ga0116594_1018157	29	50	162	151	228	136

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 10. Expression of selected genes involved in lipid catabolism in *D. hansenii*.

Supplemental material 10.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in lipid catabolism in *D. hansenii* (1/3).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Triacylglycerol degradation	similar to uniprot P40308 Saccharomyces cerevisiae YMR313C TGL3 Bifunctional triacylglycerol lipase and lysophosphatidylethanolamine acyltransferase	<i>TGL3</i>	3.1.1.3	DEHA2G22132g	0.93	1.00	0.93	0.99	1.09	1.55	1.11	1.22	1.05	1.11
	weakly similar to uniprot P36165 Saccharomyces cerevisiae YKR089C STC1 Multifunctional lipase/hydrolase/phospholipase	<i>TGLA/STC1-like</i>	3.1.1.3	DEHA2E05390g	0.96	0.86	0.84	0.80	0.65	1.35	0.82	0.94	0.71	0.92
	weakly similar to uniprot P25641 Saccharomyces cerevisiae YCR068W ATG15 Phospholipase	<i>ATG15-like</i>	3.1.1.3	DEHA2F12364g	1.17	1.01	1.00	0.85	0.93	1.18	1.08	1.20	1.14	1.25
	similar to uniprot P34163 Saccharomyces cerevisiae YKL140W TGL1 Steryl ester hydrolase	<i>TGL1</i>	3.1.1.3	DEHA2D05236g	1.03	0.99	0.99	0.95	0.76	0.76	0.90	0.82	0.94	1.01
	similar to uniprot P34163 Saccharomyces cerevisiae YKL140W TGL1 Steryl ester hydrolase	<i>TGL1</i>	3.1.1.3	DEHA2E14982g	0.92	0.86	1.13	1.00	1.35	1.39	1.21	1.24	1.07	1.14
	similar to uniprot P54857 Saccharomyces cerevisiae YDR058c TGL2 Triacylglycerol lipase	<i>TGL2</i>	3.1.1.3	DEHA2E14718g	1.03	0.85	1.05	0.86	0.73	0.55	0.83	0.74	0.80	0.81
	similar to uniprot Q03649 Saccharomyces cerevisiae YMR210w MGL2 Monoacylglycerol and triacylglycerol lipase	<i>MGL2</i>	3.1.1.23	DEHA2C08096g	1.34	1.08	0.96	0.91	1.08	0.61	1.12	1.26	1.45	1.57
	highly similar to CA4723 IPF18177 Candida albicans IPF18177 Putative monoacylglycerol lipase		3.1.1.23	DEHA2C02794g	0.92	0.86	1.02	1.00	1.00	1.06	1.00	1.06	0.86	1.00
	similar to uniprot O94091 Candida albicans LIP1 Lipase 1 precursor	<i>LIP1</i>		DEHA2A00264g	1.03	1.29	0.98	1.08	2.37	2.95	1.92	2.43	1.42	1.88
	similar to uniprot O94091 Candida albicans LIP1 Lipase 1 precursor or uniprot Q9P8W2 Candida albicans LIP3 Lipase 3 precursor	<i>LIP1</i> or <i>LIP3</i>		DEHA2D12122g	1.02	1.39	1.10	1.34	2.37	1.90	1.89	2.11	1.56	1.91
	similar to CA1079 CaLIP1 Candida albicans CaLIP1 Secretory lipase	<i>LIP1</i>		DEHA2A00704g	1.01	0.86	1.14	0.83	0.70	0.77	0.93	0.75	0.68	0.77
	similar to gi 66846736 gb EAL87068.1 Aspergillus fumigatus Af293 putative lipase			DEHA2C01056g	0.92	1.10	0.84	1.03	0.96	1.39	0.95	1.06	0.70	0.88
	weakly similar to uniprot P32948 Candida rugosa LIP4 Lipase 4 precursor	<i>LIP4-like</i>		DEHA2E05940g	0.98	1.33	0.80	0.99	0.81	1.53	0.71	1.36	0.92	1.88
weakly similar to uniprot Q9P8F7 Yarrowia lipolytica YALI0A20350g LIP2 Triacylglycerol lipase precursor	<i>LIP2-like</i>		DEHA2E21164g	0.96	0.99	1.01	0.93	0.99	1.24	1.10	1.25	0.87	1.14	
Glycerol degradation via glycerol kinase	highly similar to uniprot Q6TNG4 Pichia farinosa GUT1 Glycerol kinase	<i>GUT1</i>	2.7.1.30	DEHA2G24310g	1.08	1.05	1.01	1.05	1.36	1.39	1.10	1.04	1.03	0.89
	highly similar to uniprot O14400 Schizosaccharomyces pombe GUT2 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase mitochondrial precursor	<i>GUT2</i>	1.1.5.3	DEHA2E08624g	1.28	1.06	1.09	1.07	1.36	0.80	1.18	0.99	1.27	1.05

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 10.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in lipid catabolism in *D. hansenii* (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number or KO term	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
beta-oxidation	similar to uniprot P39518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2B10120g	1.01	0.76	1.10	0.71	0.77	0.46	1.08	0.72	1.10	0.92
	similar to uniprot P39518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2B11682g	0.86	0.68	0.85	0.64	0.51	0.61	0.52	0.46	0.60	0.53
	similar to uniprot P39518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2D10076g	0.95	0.81	1.03	0.58	0.64	0.47	0.84	0.51	0.90	0.61
	similar to uniprot P39518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2D10098g	0.89	0.83	1.29	0.79	1.12	1.20	1.41	1.13	0.67	0.85
	similar to uniprot P39518 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2G00462g	0.76	0.55	1.28	0.64	1.01	2.49	0.85	0.96	0.44	0.52
	similar to uniprot P30624 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR317W FAA1 Long chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA1	K01897	DEHA2G05940g	0.93	1.26	1.10	1.09	1.22	3.09	1.25	1.99	1.04	1.44
	similar to uniprot P38225 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR041W FAT1 Fatty acid transporter and very long-chain fatty acyl-CoA synthetase	FAT1		DEHA2F15224g	0.90	0.99	1.03	0.90	1.07	0.96	1.13	1.00	0.96	0.84
	similar to uniprot P13711 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL205W POX1 Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	K00232	DEHA2D17204g	0.78	1.43	1.18	1.47	1.50	4.78	1.00	1.76	0.61	0.92
	similar to uniprot P13711 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL205W POX1 Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	K00232	DEHA2D17248g	1.09	1.04	1.12	0.85	1.00	0.59	1.36	0.95	1.16	0.88
	similar to uniprot Q05871 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR284C ECI1 Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase	ECI1		DEHA2E02024g	0.82	0.79	1.12	0.74	0.82	0.72	1.00	0.77	1.02	0.80
	similar to uniprot Q05871 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR284C ECI1 Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase	ECI1		DEHA2A00462g	0.74	0.63	1.19	0.65	0.72	0.57	0.83	0.55	0.73	0.59
	similar to uniprot Q02207 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR009C FOX2 Multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid beta-oxidation pathway	FOX2		DEHA2A08646g	0.89	0.96	1.19	0.84	0.84	0.79	0.97	0.81	0.91	0.70
	similar to uniprot P27796 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2B16368g	0.65	1.08	1.14	1.21	0.78	1.81	0.62	1.07	0.48	0.73
	similar to uniprot P27796 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2D18480g	1.08	0.89	1.00	0.87	1.34	1.46	1.06	1.07	0.90	0.69
	similar to uniprot P27796 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2E18282g	1.09	0.94	1.13	0.79	0.99	0.59	1.16	0.89	1.30	0.99
	weakly similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2B10956g	0.90	1.02	1.00	0.94	0.87	1.44	0.97	1.28	1.02	1.24
	similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2C02178g	0.96	0.88	1.15	0.79	0.86	0.59	1.04	0.83	1.20	0.90
	weakly similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2E08866g	1.04	1.31	1.08	1.60	1.47	1.24	1.00	1.54	1.10	1.39
	similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2E08910g	1.02	0.99	1.12	1.24	2.02	1.65	1.46	1.62	1.20	1.11
	weakly similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2E24244g	0.87	1.03	1.19	1.22	0.95	1.08	0.84	1.03	0.87	0.93
	weakly similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2F00990g	0.86	0.85	1.13	1.30	1.69	2.36	1.35	1.09	1.20	1.24
	similar to uniprot P32573 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2G22198g	0.87	1.01	1.01	0.86	0.81	0.70	0.92	0.80	0.98	0.84
	similar to uniprot P05335 <i>Candida maltosa</i> POX4 Acyl-CoA oxidase oxidase	POX4	K00232	DEHA2C01078g	0.93	1.04	1.28	1.02	1.31	1.36	1.30	1.57	1.36	1.31
	similar to wj NCU01181.1 <i>Neurospora crassa</i> NCU01181.1 hypothetical protein		K00249	DEHA2B06424g	0.85	0.86	0.98	0.79	0.72	1.01	0.73	0.64	0.73	0.65
	similar to uniprot Q06497 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR128C ANT1 Peroxisomal adenine nucleotide transporter involved in beta-oxidation of medium-chain fatty acid	ANT1		DEHA2E08316g	1.06	0.83	0.98	0.59	0.56	0.29	0.81	0.55	0.92	0.68
	weakly similar to uniprot Q06497 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR128C ANT1 Peroxisomal adenine nucleotide transporter involved in beta-oxidation of medium-chain fatty acid	ANT1-like		DEHA2G13596g	1.17	0.96	1.15	0.73	0.91	0.82	1.23	0.95	1.21	1.01
	weakly similar to uniprot P41903 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR019C TES1 Thioesterase	TES1-like		DEHA2A00440g	0.85	0.65	1.16	0.71	0.83	0.68	0.92	0.69	0.95	0.71
	similar to ca CA1609 <i>Candida albicans</i> CaTES11 Thioesterase	CaTES11		DEHA2E10516g	0.90	0.56	0.95	0.50	0.55	0.39	0.70	0.36	0.78	0.54
	similar to ca CA1608 <i>Candida albicans</i> CaTES12 Thioesterase	CaTES12		DEHA2E10538g	1.43	1.34	0.98	1.00	1.33	0.62	1.32	1.45	1.73	1.57
	weakly similar to ca CA1608 <i>Candida albicans</i> CaTES12 Thioesterase	CaTES12-like		DEHA2E10560g	1.11	1.00	1.34	0.88	1.54	0.97	1.39	1.23	1.24	1.07
	similar to ca CA1608 <i>Candida albicans</i> CaTES12 Thioesterase	CaTES12		DEHA2E10582g	1.14	1.17	1.05	1.08	1.20	0.97	1.07	1.29	1.15	1.33

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 10.2. Expression level of selected genes involved in lipid catabolism in *D. hansenii* (1/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Triacylglycerol degradation	similar to uniprot P40308 Saccharomyces cerevisiae YMR313C TGL3 Bifunctional triacylglycerol lipase and lysophosphatidylethanolamine acyltransferase	<i>TGL3</i>	3.1.1.3	DEHA2G22132g	1202	1024	1024	987	1119	929	1071	1364	1094	973	1158	1044
	weakly similar to uniprot P36165 Saccharomyces cerevisiae YKR089C STC1 Multifunctional lipase/hydrolase/phospholipase	<i>TGL4/STC1-like</i>	3.1.1.3	DEHA2E05390g	977	788	862	653	817	583	515	913	666	571	638	664
	weakly similar to uniprot P25641 Saccharomyces cerevisiae YCR068W ATG15 Phospholipase	<i>ATG15-like</i>	3.1.1.3	DEHA2F12364g	534	460	573	448	534	365	405	469	450	445	559	523
	similar to uniprot P34163 Saccharomyces cerevisiae YKL140W TGL1 Steryl ester hydrolase	<i>TGL1</i>	3.1.1.3	DEHA2D05236g	326	295	309	283	327	259	202	193	258	209	285	274
	similar to uniprot P34163 Saccharomyces cerevisiae YKL140W TGL1 Steryl ester hydrolase	<i>TGL1</i>	3.1.1.3	DEHA2E14982g	879	946	746	786	991	869	971	1127	865	956	865	981
	similar to uniprot P54857 Saccharomyces cerevisiae YDR058c TGL2 Triacylglycerol lipase	<i>TGL2</i>	3.1.1.3	DEHA2E14718g	371	350	351	289	391	279	218	165	271	232	275	258
	similar to uniprot Q03649 Saccharomyces cerevisiae YMR210w MGL2 Monoacylglycerol and triacylglycerol lipase	<i>MGL2</i>	3.1.1.23	DEHA2C08096g	650	613	799	635	622	510	562	319	713	734	867	875
	highly similar to CA4723 IPF18177 Candida albicans IPF18177 Putative monoacylglycerol lipase		3.1.1.23	DEHA2C02794g	861	808	729	667	877	734	703	733	742	724	682	737
	similar to uniprot O94091 Candida albicans LIP1 Lipase 1 precursor	<i>LIP1</i>		DEHA2A00264g	118	110	111	137	115	109	228	279	134	200	154	188
	similar to uniprot O94091 Candida albicans LIP1 Lipase 1 precursor or uniprot Q9P8W2 Candida albicans LIP3 Lipase 3 precursor	<i>LIP1</i> or <i>LIP3</i>		DEHA2D12122g	52	48	49	65	58	59	101	79	66	83	75	83
	similar to CA1079 CaLIP1 Candida albicans CaLIP1 Secretory lipase	<i>LIP1</i>		DEHA2A00704g	13	14	12	12	14	11	7	9	9	9	8	10
	similar to gi 66846736 gb EAL87068.1 Aspergillus fumigatus Af293 putative lipase			DEHA2C01056g	236	170	199	179	199	159	186	201	177	140	153	136
	weakly similar to uniprot P32948 Candida rugosa LIP4 Lipase 4 precursor	<i>LIP4-like</i>		DEHA2E05940g	62	42	56	54	49	39	41	56	36	47	52	73
weakly similar to uniprot Q9P8F7 Yarrowia lipolytica YALI0A20350g LIP2 Triacylglycerol lipase precursor	<i>LIP2-like</i>		DEHA2E21164g	130	106	115	101	132	92	105	114	100	104	105	111	
Glycerol degradation via glycerol kinase	highly similar to uniprot Q6TNG4 Pichia farinosa GUT1 Glycerol kinase	<i>GUT1</i>	2.7.1.30	DEHA2G24310g	2530	2706	2521	2730	2544	2600	2802	3218	2338	2213	2384	2182
	highly similar to uniprot O14400 Schizosaccharomyces pombe GUT2 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase mitochondrial precursor	<i>GUT2</i>	1.1.5.3	DEHA2E08624g	8901	10438	10538	10581	9845	10169	9776	7096	10433	9259	10552	9917

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 10.2. Expression level of selected genes involved in lipid catabolism in *D. hansenii* (2/2).

Pathway	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
beta-oxidation	similar to uniprot P39518 Saccharomyces cerevisiae YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2B10120g	4278	5528	3886	4008	4632	3610	2619	2159	4630	3645	4282	4640
	similar to uniprot P39518 Saccharomyces cerevisiae YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2B11682g	405	427	318	279	338	253	168	225	211	159	221	206
	similar to uniprot P39518 Saccharomyces cerevisiae YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2D10076g	4366	6249	3732	4834	4382	3301	2234	2499	3508	2722	3556	3460
	similar to uniprot P39518 Saccharomyces cerevisiae YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2D10098g	1359	1070	1098	862	1738	781	1235	1102	1393	941	836	828
	similar to uniprot P39518 Saccharomyces cerevisiae YER015W FAA2 Medium chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA2	K01897	DEHA2G00462g	649	696	450	366	821	413	536	1497	372	432	259	334
	similar to uniprot P30624 Saccharomyces cerevisiae YOR317W FAA1 Long chain fatty acyl-CoA synthetase	FAA1	K01897	DEHA2G05940g	3231	2430	2774	2948	3574	2440	3262	6489	3066	3449	3101	3198
	similar to uniprot P38225 Saccharomyces cerevisiae YBR041W FAT1 Fatty acid transporter and very long-chain fatty acyl-CoA synthetase	FAT1		DEHA2F15224g	1701	2089	1390	1975	1725	1707	1464	1720	1664	1710	1482	1587
	similar to uniprot P13711 Saccharomyces cerevisiae YGL205W POX1 Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	K00232	DEHA2D17204g	786	706	559	965	924	945	979	2919	527	770	437	590
	similar to uniprot P13711 Saccharomyces cerevisiae YGL205W POX1 Fatty-acyl coenzyme A oxidase	POX1	K00232	DEHA2D17248g	20720	28736	20378	28522	22817	22282	16539	14497	26331	24371	21821	22985
	similar to uniprot Q05871 Saccharomyces cerevisiae YLR284C ECI1 Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase	ECI1		DEHA2E02024g	827	1201	610	904	905	818	546	739	810	783	767	880
	similar to uniprot Q05871 Saccharomyces cerevisiae YLR284C ECI1 Peroxisomal delta3,delta2-enoyl-CoA isomerase	ECI1		DEHA2A00462g	968	1527	643	914	1127	915	557	739	772	734	641	818
	similar to uniprot Q02207 Saccharomyces cerevisiae YKR009C FOX2 Multifunctional enzyme of the peroxisomal fatty acid beta-oxidation pathway	FOX2		DEHA2A08646g	17138	26341	13765	24277	19935	20236	11582	17928	15785	17627	14152	16886
	similar to uniprot P27796 Saccharomyces cerevisiae YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2B16368g	223	186	133	194	255	209	145	291	96	149	99	125
	similar to uniprot P27796 Saccharomyces cerevisiae YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2D18480g	245	295	240	252	244	233	267	368	202	221	203	185
	similar to uniprot P27796 Saccharomyces cerevisiae YIL160C POT1 3-ketoacyl-CoA thiolase with broad chain length specificity	POT1	K07513	DEHA2E18282g	12251	16836	12067	15077	13519	12234	9629	8454	13934	13812	14415	15233
	weakly similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2B10956g	555	503	457	495	553	433	399	623	457	519	520	571
	similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2C02178g	1541	2233	1339	1876	1740	1597	1067	1124	1576	1672	1683	1841
	weakly similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2E08866g	31942	28170	31136	35529	35332	40805	38367	29556	30091	40562	33088	35652
	similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2E08910g	1946	2442	1825	2316	2177	2751	3191	3445	2245	3268	2143	2467
	weakly similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2E24244g	43	38	35	38	52	43	34	35	32	34	35	33
	weakly similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19-like		DEHA2F00990g	7	8	6	6	8	9	10	15	7	6	8	9
	similar to uniprot P32573 Saccharomyces cerevisiae YNL202W SPS19 Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase	SPS19		DEHA2G22198g	578	786	458	758	575	618	381	472	522	539	520	603
	similar to uniprot P05335 Candida maltosa POX4 Acyl-CoA oxidase oxidase	POX4	K00232	DEHA2C01078g	3349	4427	2818	4421	4225	4119	3509	5155	4037	6265	4132	5291
similar to w NCU01181.1 Neurospora crassa NCU01181.1 hypothetical protein		K00249	DEHA2B06424g	461	573	356	476	446	416	272	502	308	287	306	340	
similar to uniprot Q06497 Saccharomyces cerevisiae YPR128C ANT1 Peroxisomal adenine nucleotide transporter involved in beta-oxidation of medium-chain fatty acid	ANT1		DEHA2E08316g	5264	6670	5032	5333	5019	3635	2347	1665	4379	3450	4393	4157	
weakly similar to uniprot Q06497 Saccharomyces cerevisiae YPR128C ANT1 Peroxisomal adenine nucleotide transporter involved in beta-oxidation of medium-chain fatty acid	ANT1-like		DEHA2G13596g	428	610	454	562	481	406	314	430	483	471	471	558	
weakly similar to uniprot P41903 Saccharomyces cerevisiae YJR019C TES1 Thioesterase	TES1-like		DEHA2A00440g	1890	2560	1444	1602	2144	1683	1250	1479	1677	1567	1627	1656	
similar to ca CA1609 CaTES11 Candida albicans CaTES11 Thioesterase	CaTES11		DEHA2E10516g	99	126	80	68	91	59	43	42	61	37	70	62	
similar to ca CA1608 CaTES12 Candida albicans CaTES12 Thioesterase	CaTES12		DEHA2E10538g	1716	1884	2239	2417	1668	1704	1821	977	2282	2620	2720	2697	
weakly similar to ca CA1608 CaTES12 Candida albicans CaTES12 Thioesterase	CaTES12-like		DEHA2E10560g	3334	4776	3355	4593	4421	3862	4099	3926	4048	5398	3775	4638	
similar to ca CA1608 CaTES12 Candida albicans CaTES12 Thioesterase	CaTES12		DEHA2E10582g	899	964	936	1083	946	949	878	797	887	1142	949	1166	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 11. Expression of selected genes involved in iron acquisition in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 11.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in iron acquisition in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6) ^c	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^d	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Hydroxamate-type siderophore biosynthesis	lysine N6-hydroxylase		1.14.13.59	Ga0063698_03840	Ga0063690_03173	0.28	0.42	0.86	0.78
	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase		4.1.1.86	Ga0063698_03839	Ga0063690_03172	0.20	0.23	0.81	0.81
	Siderophore synthetase component			Ga0063698_03841	Ga0063690_03174	0.27	0.40	0.83	0.77
Iron release from siderophores	siderophore interacting protein			Ga0063698_01673	Ga0063690_00375	0.63	0.58	0.92	0.99
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03064	Ga0063690_02886	0.45	0.65	0.65	0.52
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03229	-	NE	NE	-	-
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03452	Ga0063690_02229	0.43	0.50	1.15	0.88
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03935	-	0.16	0.13	-	-
	siderophore interacting protein			-	Ga0063690_03579	-	-	1.08	0.85
Iron storage	Ferritin		1.16.3.2	Ga0063698_00312	Ga0063690_02093	5.42	5.98	0.64	0.62

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

^cGenes belong to the cluster Iron-Brev2 are highlighted in yellow

^dGenes belong to the cluster ActinoRUSTI are highlighted in blue

Supplemental material 11.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in iron acquisition in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6) ^c	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^d	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Fe ³⁺ /siderophore transporter	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_01188	Ga0063690_01403	0.30	0.32	0.83	0.67
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_01567	Ga0063690_01845	0.54	0.38	0.99	1.01
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_02427	Ga0063690_02303	0.74	0.41	1.08	1.10
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_02796	-	0.95	0.75	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_03089	-	0.96	0.73	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_03307	Ga0063690_01314	0.38	0.21	1.51	1.55
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component			Ga0063698_03939	Ga0063690_03585	NE	NE	0.81	0.79
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_01186	Ga0063690_01405	0.51	0.28	1.10	1.16
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_01568	Ga0063690_01846	0.46	0.40	0.89	0.99
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_01569	Ga0063690_01847	0.40	0.31	0.89	0.92
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_02425	Ga0063690_02301	0.36	0.23	0.83	1.02
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_02426	Ga0063690_02302	0.47	0.29	1.03	1.14
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_02795	-	0.51	0.49	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_03090	-	1.07	0.91	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_03305	Ga0063690_01316	0.20	0.12	1.60	1.38
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_03306	Ga0063690_01315	0.35	0.35	1.50	1.58
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_03937	-	NE	NE	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			Ga0063698_03938	-	NE	NE	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			-	Ga0063690_03583	-	-	0.93	0.92
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component			-	Ga0063690_03584	-	-	1.01	0.87
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_01187	Ga0063690_01404	0.41	0.40	0.97	0.88
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_01487	Ga0063690_01762	0.37	0.43	0.82	0.66
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_01575	Ga0063690_01853	0.32	0.30	0.96	0.72
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_01672	Ga0063690_00374	0.37	0.37	1.39	1.80
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_02424	Ga0063690_02300	0.30	0.22	0.77	0.84
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_02794	-	0.29	0.54	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03091	-	1.31	1.25	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03230	-	0.23	0.15	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03304	Ga0063690_01317	0.21	0.16	0.96	1.00
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03318	Ga0063690_01303	0.27	0.28	1.03	0.87
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03453	-	0.37	0.43	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0063698_03936	-	0.65	0.63	-	-
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			-	Ga0063690_01844	-	-	1.35	1.32
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			-	Ga0063690_03581	-	-	0.98	0.84
	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			-	Ga0063690_03582	-	-	0.86	0.83

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change > 2; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change > 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

^cGenes belong to the cluster Iron-Brev2 are highlighted in yellow

^dGenes belong to the cluster ActinoRUSTI are highlighted in blue

Supplemental material 11.2. Expression level of selected genes involved in iron acquisition in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6) ^c	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175 ^d	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Hydroxamate-type siderophore biosynthesis	lysine N6-hydroxylase		1.14.13.59	Ga0063698_03840	Ga0063690_03173	66	41	19	18	336	413	278	309
	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase		4.1.1.86	Ga0063698_03839	Ga0063690_03172	79	61	16	14	248	294	193	229
	Siderophore synthetase component			Ga0063698_03841	Ga0063690_03174	52	38	14	15	213	243	170	181
Iron release from siderophores	siderophore interacting protein			Ga0063698_01673	Ga0063690_00375	3307	3324	2082	1895	1241	1282	1099	1222
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03064	Ga0063690_02886	1629	1592	721	1001	324	412	202	205
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03229	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03452	Ga0063690_02229	278	328	118	160	66	84	73	71
	siderophore interacting protein			Ga0063698_03935	-	69	39	11	5	-	-	-	-
	siderophore interacting protein			-	Ga0063690_03579	-	-	-	-	506	679	527	552
Iron storage	Ferritin		1.16.3.2	Ga0063698_00312	Ga0063690_02093	896	902	4825	5257	2431	1954	1478	1157

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

^cGenes belong to the cluster Iron-Brev2 are highlighted in yellow

^dGenes belong to the cluster ActinoRUSTI are highlighted in blue

Supplemental material 12. Expression of selected genes involved in iron acquisition in *H. alvei*.

Supplemental material 12.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in iron acquisition in *H. alvei*.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Hydroxamate-type siderophore biosynthesis	lysine N6-hydroxylase Protein N-acetyltransferase, RimJ/RimL family Siderophore synthetase component		1.14.13.59	Ga0116594_11038	0.55	0.77	0.24	0.48
				Ga0116594_11039	0.65	1.00	0.19	0.64
				Ga0116594_110310	0.65	1.07	0.27	0.55
Fe3+/siderophore transporter	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0116594_112241	NE	NE	NE	NE
				Ga0116594_109811	0.81	0.44	0.74	0.55
				Ga0116594_108625	0.38	0.43	0.38	0.51
				Ga0116594_112242	0.98	0.64	0.75	0.56
				Ga0116594_109810	0.89	0.39	0.74	0.58
				Ga0116594_108627	0.52	0.64	0.83	0.66
				Ga0116594_112243	1.95	1.68	1.30	0.75
				Ga0116594_10989	0.81	0.53	0.61	0.52
				Ga0116594_108626	0.42	0.39	0.51	0.44
				Ga0116594_10021	1.06	1.03	1.18	1.19
				Ga0116594_106015	1.14	0.92	0.75	0.55
				Ga0116594_100616	0.64	0.36	0.66	0.69
TonB-ExbB-ExbD complex	Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes biopolymer transport protein ExbD biopolymer transport protein ExbB			Ga0116594_112230	0.54	0.34	0.39	0.32
				Ga0116594_103718	0.52	0.57	0.39	0.62
				Ga0116594_103720	0.81	0.36	0.32	0.16
				Ga0116594_103721	1.07	0.58	0.65	0.59
Siderophore receptor	TonB-dependent outer membrane siderophore receptor			Ga0116594_11037	0.48	0.51	0.32	0.52
Iron release from siderophores	ferric iron reductase protein FhuF			Ga0116594_11035	0.70	0.53	0.81	0.70
Iron storage	bacterioferritin		1.16.3.1	Ga0116594_1080180	1.20	0.88	1.48	1.60

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 12.2. Expression level of selected genes involved in iron acquisition in *H. alvei*.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Hydroxamate-type siderophore biosynthesis	lysine N6-hydroxylase Protein N-acetyltransferase, RimJ/RimL family Siderophore synthetase component		1.14.13.59	Ga0116594_11038	344	249	190	193	77	109
				Ga0116594_11039	71	45	46	45	13	26
				Ga0116594_110310	328	219	214	236	82	110
Fe3+/siderophore transporter	ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, ATPase component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, permease component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component ABC-type Fe3+/siderophore transport system, substrate binding component			Ga0116594_112241	-	-	-	-	-	-
				Ga0116594_109811	12	20	10	9	9	10
				Ga0116594_108625	24	27	9	12	8	13
				Ga0116594_112242	7	10	7	6	5	5
				Ga0116594_109810	30	42	27	16	21	22
				Ga0116594_108627	9	12	5	8	7	7
				Ga0116594_112243	18	35	34	59	21	24
				Ga0116594_10989	210	264	171	140	120	124
				Ga0116594_108626	22	26	9	10	11	10
				Ga0116594_10021	283	237	304	246	313	257
				Ga0116594_106015	30	52	35	48	21	26
				Ga0116594_100616	128	148	83	53	80	92
TonB-ExbB-ExbD complex	Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes Periplasmic protein TonB, links inner and outer membranes biopolymer transport protein ExbD biopolymer transport protein ExbB			Ga0116594_112230	174	222	96	75	64	64
				Ga0116594_103718	7	5	3	3	2	3
				Ga0116594_103720	19	25	16	9	6	4
				Ga0116594_103721	18	20	19	11	11	10
Siderophore receptor	TonB-dependent outer membrane siderophore receptor			Ga0116594_11037	938	709	459	360	282	330
Iron release from siderophores	ferric iron reductase protein FhuF			Ga0116594_11035	568	631	401	337	432	401
Iron storage	bacterioferritin		1.16.3.1	Ga0116594_1080180	2009	2451	2429	2166	2778	3557

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 13. Expression of selected genes involved in iron acquisition in *D. hansenii*.

Supplemental material 13.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in iron acquisition in *D. hansenii*.

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
					T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Reductive system	Ferric reductase	similar to uniprot P32791 Saccharomyces cerevisiae YLR214w FRE1 ferric reductase and cupric reductase	<i>FRE1</i>	DEHA2B00396g	0.96	1.16	0.99	1.11	1.51	2.34	1.27	1.68	1.60	1.88
		similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> or <i>FRE2</i>	DEHA2C06314g	1.10	0.20	0.76	1.62	2.13	0.26	2.28	1.29	2.28	1.78
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> - or <i>FRE2</i> -like	DEHA2C06292g	0.81	0.86	1.00	1.20	1.39	1.19	1.09	1.27	0.97	1.02
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> - or <i>FRE2</i> -like	DEHA2C06248g	1.00	0.56	1.09	1.30	1.40	1.19	0.80	1.05	0.82	1.04
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase	<i>FRE4</i> -like	DEHA2B02772g	1.29	0.72	0.69	1.00	0.47	0.22	0.48	0.55	0.59	0.70
		weakly similar to uniprot Q08908 Saccharomyces cerevisiae YOR384W FRE5 Putative ferric reductase	<i>FRE5</i> -like	DEHA2B15994g	0.78	0.35	1.20	1.35	1.41	1.55	0.58	0.76	0.57	0.53
		similar to uniprot Q12333 Saccharomyces cerevisiae YOL152W FRE7 Putative ferric reductase	<i>FRE7</i>	DEHA2D01452g	1.07	3.76	1.01	1.80	4.59	15.69	4.42	12.65	6.63	13.54
	High-affinity ferroxidase/permease complex	similar to uniprot P38993 Saccharomyces cerevisiae YMR058W FET3 Ferro-O ₂ -oxidoreductase	<i>FET3</i>	DEHA2G05082g	0.90	0.50	0.81	1.03	0.52	0.39	0.36	0.42	0.42	0.40
		similar to uniprot P38993 Saccharomyces cerevisiae YMR058W FET3 Ferro-O ₂ -oxidoreductase	<i>FET3</i>	DEHA2E12738g	1.09	1.00	1.02	1.02	1.22	1.01	1.17	1.06	1.16	1.02
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2D04554g	0.94	0.59	0.81	1.33	0.83	0.32	0.43	0.65	0.70	0.61
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2E12628g	0.93	0.82	1.33	0.69	0.86	0.51	1.15	1.00	0.99	0.93
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2C05500g	1.13	1.16	1.14	1.14	1.51	2.01	1.23	1.50	1.29	1.35
	Low-affinity ferrous iron transport	similar to uniprot P38925 Saccharomyces cerevisiae YOL122C SMF1 Divalent metal ion transporter	<i>SMF1</i>	DEHA2F23804g	1.18	1.11	0.93	1.09	0.99	0.56	0.93	0.81	0.97	0.96
Non-reductive system	Fe ³⁺ /siderophore transporter	similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i>	DEHA2C05390g	0.91	0.82	1.04	1.39	1.32	1.21	0.94	1.38	0.88	1.02
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2E02596g	0.81	0.35	0.95	1.16	0.86	0.92	0.47	0.80	0.41	0.61
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2A03806g	1.13	0.66	0.64	0.80	0.43	0.35	0.36	0.30	0.56	0.47
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2B16478g	0.67	0.22	0.86	1.33	0.88	0.94	0.57	1.15	0.54	0.90
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2A14696g	0.76	0.30	0.87	1.05	0.70	0.81	0.42	0.55	0.40	0.39
		similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i>	DEHA2G00319g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 13.2. Expression level of selected genes involved in iron acquisition in *D. hansenii*.

Class	Subclass	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
					T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Reductive system	Ferric reductase	similar to uniprot P32791 Saccharomyces cerevisiae YLR214w FRE1 ferric reductase and cupric reductase	<i>FRE1</i>	DEHA2B00396g	567	542	502	601	563	547	695	1089	676	724	838	932
		similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> or <i>FRE2</i>	DEHA2C06314g	414	933	427	178	321	1336	735	209	1091	1172	895	1496
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> - or <i>FRE2</i> -like	DEHA2C06292g	50	44	37	37	50	47	56	44	50	47	44	41
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase or uniprot P36033 Saccharomyces cerevisiae YKL220C FRE2 Ferric reductase	<i>FRE4</i> - or <i>FRE2</i> -like	DEHA2C06248g	2347	2551	2179	1384	2577	2987	2678	2574	1754	2263	1777	2424
		weakly similar to uniprot P53746 Saccharomyces cerevisiae YNR060W FRE4 Ferric reductase	<i>FRE4</i> -like	DEHA2B02772g	7056	5992	8470	4135	4955	5404	2751	1141	3694	3103	3932	3774
		weakly similar to uniprot Q08908 Saccharomyces cerevisiae YOR384W FRE5 Putative ferric reductase	<i>FRE5</i> -like	DEHA2B15994g	10249	10511	7386	3522	12449	12863	11868	13925	5426	6490	5414	5070
		similar to uniprot Q12333 Saccharomyces cerevisiae YOL152W FRE7 Putative ferric reductase	<i>FRE7</i>	DEHA2D01452g	1049	807	1038	2892	1059	1310	3980	10961	4384	7356	6416	9956
	High-affinity ferroxidase/permease complex	similar to uniprot P38993 Saccharomyces cerevisiae YMR058W FET3 Ferro-O2-oxidoreductase	<i>FET3</i>	DEHA2G05082g	31605	27481	26364	13117	26039	25699	13553	9165	11986	10423	12527	9994
		similar to uniprot P38993 Saccharomyces cerevisiae YMR058W FET3 Ferro-O2-oxidoreductase	<i>FET3</i>	DEHA2E12738g	1452	1437	1460	1388	1489	1332	1431	1244	1550	1295	1564	1334
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2D04554g	4774	6592	4177	3736	3900	7910	3246	1790	2184	3818	3123	3629
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2E12628g	43	35	37	28	58	23	30	15	42	32	40	30
		similar to uniprot P40088 Saccharomyces cerevisiae YER145C FTR1 High affinity iron permease	<i>FTR1</i>	DEHA2C05500g	330	319	343	356	379	330	407	551	352	368	395	391
	Low-affinity ferrous iron transport	similar to uniprot P38925 Saccharomyces cerevisiae YOL122C SMF1 Divalent metal ion transporter	<i>SMF1</i>	DEHA2F23804g	19470	16128	21290	17115	18303	15907	15633	7631	18248	12157	17683	14085
Non-reductive system	Fe3+/siderophore transporter	similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i>	DEHA2C05390g	3629	3131	3045	2484	3816	3967	3924	3231	3131	3803	2985	2919
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2E02596g	11486	7903	8677	2707	11062	8326	8073	6183	5095	5355	4422	4401
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2A03806g	10019	5862	10575	3751	6525	4318	3541	1726	4059	1675	5316	2533
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2B16478g	4650	3378	2925	722	4025	4069	3372	2701	2674	3510	2340	2776
		weakly similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i> -like	DEHA2A14696g	6378	5198	4483	1489	5639	4987	3646	3591	2820	2371	2405	1876
		similar to uniprot P39980 Saccharomyces cerevisiae YEL065W SIT1 Ferrioxamine B transporter	<i>SIT1</i>	DEHA2G00319g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 14. Expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 14.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Sulfate assimilation	sulfate adenylyltransferase subunit 1	<i>cysN</i>	2.7.7.4	Ga0063698_03435	Ga0063690_02692	0.53	0.20	1.06	1.03
	sulfate adenylyltransferase subunit 2	<i>cysD</i>	2.7.7.4	Ga0063698_03436	Ga0063690_02693	0.42	0.16	0.94	0.79
	adenylyl sulfate reductase	<i>cysH</i>	1.8.99.2	Ga0063698_03437	Ga0063690_02694	0.47	0.21	0.85	0.70
	sulfite reductase, hemoprotein beta-component	<i>cysI</i>	1.8.1.2	Ga0063698_03438	Ga0063690_02695	1.88	0.89	0.59	0.31
	sulfite reductase, flavoprotein alpha-component	<i>cysJ</i>	1.8.1.2	Ga0063698_03432	Ga0063690_02689	0.59	0.21	1.42	1.18
	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	<i>cysG</i>	2.1.1.107	Ga0063698_03434	Ga0063690_02691	0.49	0.17	1.27	1.66
Sulfonate assimilation	alkanesulfonate monooxygenase	<i>ssuD1</i>		Ga0063698_02685	Ga0063690_01600	0.76	0.82	1.04	1.01
	FMNH2-dependent alkanesulfonate monooxygenase	<i>seuA</i>		Ga0063698_01292	Ga0063690_00931	0.24	0.07	NE	NE
	electron transfer flavoprotein	<i>fixA</i>		Ga0063698_01670	Ga0063690_00372	1.31	1.61	0.94	1.05
Cysteine biosynthesis	serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	2.3.1.30	Ga0063698_03031	Ga0063690_02853	0.71	0.65	0.65	0.58
	O-acetylserine-thiol-lyase	<i>cysK</i>	2.5.1.47	Ga0063698_03032	Ga0063690_02854	1.07	0.81	0.66	0.45
	Probable cystathionine beta-synthase			Ga0063698_03162	Ga0063690_02732	0.86	0.68	0.84	1.08
	Probable cystathionine gamma-lyase			Ga0063698_00718	Ga0063690_00594	0.84	0.95	0.87	0.92
Methionine biosynthesis	homoserine O-acetyltransferase	<i>metX</i>	2.3.1.31	Ga0063698_00251	Ga0063690_00007	0.41	0.11	1.52	1.25
	O-acetylhomoserine-thiol-lyase	<i>metY</i>	2.5.1.49	Ga0063698_00250	Ga0063690_00008	0.27	0.13	1.65	1.45
	cystathionine gamma-synthase	<i>metB</i>	2.5.1.48	Ga0063698_01084	Ga0063690_01631	0.30	0.09	NE	NE
	cystathionine beta-lyase	<i>aecD</i>	4.4.1.8	Ga0063698_03367	Ga0063690_02625	0.47	0.58	0.79	1.01
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE1</i>	2.1.1.14	Ga0063698_01625	Ga0063690_01904	0.64	0.91	1.19	1.01
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE2</i>	2.1.1.14	Ga0063698_03649	Ga0063690_03408	0.41	0.43	0.86	1.17
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE3</i>	2.1.1.14	Ga0063698_02951	Ga0063690_03520	0.55	0.38	0.96	1.56
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	S-adenosylmethionine synthase	<i>metK</i>	2.5.1.6	Ga0063698_00165	Ga0063690_00099	1.27	0.96	1.19	1.30
	S-adenosylhomocysteine hydrolase	<i>sahH</i>	3.3.1.1	Ga0063698_01333	Ga0063690_00969	1.26	1.03	1.04	1.07
Methionine degradation	methionine gamma-lyase	<i>mgI</i>	4.4.1.11	Ga0063698_00396	Ga0063690_03082	0.80	1.13	0.92	1.25

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 14.1. Impact of H. alvei on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in B. aurantiacum 8(6) and B. aurantiacum ATCC 9175 (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Sulfate transporter	Probable sulfate permease			Ga0063698_03486	Ga0063690_02207	1.56	0.84	0.57	0.35
Methionine transporter	high-affinity methionine ABC transporter, ATPase component	<i>metN</i>		Ga0063698_03801	Ga0063690_03219	0.61	0.46	1.40	1.19
	high-affinity methionine ABC transporter, permease component	<i>metI</i>		Ga0063698_03800	Ga0063690_03220	0.75	0.50	1.37	1.17
	high-affinity methionine ABC transporter, substrate-binding component	<i>metQ</i>		Ga0063698_03799	Ga0063690_03221	0.80	0.45	1.37	1.44
	low-affinity methionine transporter	<i>metP</i>		Ga0063698_00808	Ga0063690_00684	0.63	1.20	0.78	0.92
Cyst(e)ine transporter	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_00430	Ga0063690_03058	3.53	0.87	1.28	1.68
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_00431	Ga0063690_03057	1.26	1.16	1.30	1.52
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_00432	Ga0063690_03056	1.84	1.31	1.36	1.24
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_01920	Ga0063690_01054	0.81	0.74	1.06	1.01
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_01921	Ga0063690_01055	0.65	0.63	1.01	1.22
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_01922	Ga0063690_01056	0.85	0.81	0.94	1.07
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_01923	Ga0063690_01057	1.08	1.22	0.87	0.88
Related oligopeptide transporter ^c	Oligopeptide ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_03331	Ga0063690_01290	0.96	0.46	0.63	0.40
	Oligopeptide ABC transporter, permease component			Ga0063698_03332	Ga0063690_01289	0.66	0.23	0.45	0.37
	Oligopeptide ABC transporter, permease component			Ga0063698_03333	Ga0063690_01288	0.47	0.22	0.81	0.81
	Oligopeptide ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_03334	Ga0063690_01287	0.58	0.30	0.97	1.12

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

^cCorresponding to the oligopeptide ABC transporter "BL1734 to BL1737" reported by Marie-Pierre Forquin et al. (2011)

Forquin M-P, Hébert A, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier J-F, et al. Global Regulation of the Response to Sulfur Availability in the Cheese-Related Bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1449–59.

Supplemental material 14.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Sulfate assimilation	sulfate adenylyltransferase subunit 1	<i>cysN</i>	2.7.7.4	Ga0063698_03435	Ga0063690_02692	190	206	100	40	39	30	39	30
	sulfate adenylyltransferase subunit 2	<i>cysD</i>	2.7.7.4	Ga0063698_03436	Ga0063690_02693	365	351	151	51	42	39	38	30
	adenylyl sulfate reductase	<i>cysH</i>	1.8.99.2	Ga0063698_03437	Ga0063690_02694	187	160	87	32	24	24	20	16
	sulfite reductase, hemoprotein beta-component	<i>cysI</i>	1.8.1.2	Ga0063698_03438	Ga0063690_02695	216	220	404	188	178	278	101	84
	sulfite reductase, flavoprotein alpha-component	<i>cysJ</i>	1.8.1.2	Ga0063698_03432	Ga0063690_02689	279	282	163	59	44	30	60	34
	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	<i>cysG</i>	2.1.1.107	Ga0063698_03434	Ga0063690_02691	59	54	29	9	8	5	9	8
Sulfonate assimilation	alkanesulfonate monooxygenase	<i>ssuD1</i>		Ga0063698_02685	Ga0063690_01600	351	290	265	221	271	217	273	211
	FMNH2-dependent alkanesulfonate monooxygenase	<i>seuA</i>		Ga0063698_01292	Ga0063690_00931	41	43	10	3	-	-	-	-
	electron transfer flavoprotein	<i>fixA</i>		Ga0063698_01670	Ga0063690_00372	391	404	507	644	186	219	168	222
Cysteine biosynthesis	serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	2.3.1.30	Ga0063698_03031	Ga0063690_02853	373	344	265	212	159	132	100	74
	O-acetylserine-thiol-lyase	<i>cysK</i>	2.5.1.47	Ga0063698_03032	Ga0063690_02854	2735	2974	2899	2351	972	1235	612	532
	Probable cystathionine beta-synthase			Ga0063698_03162	Ga0063690_02732	85	121	72	72	73	63	59	65
	Probable cystathionine gamma-lyase			Ga0063698_00718	Ga0063690_00594	49	34	41	34	41	36	34	32
Methionine biosynthesis	homoserine O-acetyltransferase	<i>metX</i>	2.3.1.31	Ga0063698_00251	Ga0063690_00007	36	61	15	6	3	6	4	7
	O-acetylhomoserine-thiol-lyase	<i>metY</i>	2.5.1.49	Ga0063698_00250	Ga0063690_00008	169	227	46	28	16	24	25	33
	cystathionine gamma-synthase	<i>metB</i>	2.5.1.48	Ga0063698_01084	Ga0063690_01631	34	79	10	7	-	-	-	-
	cystathionine beta-lyase	<i>aecD</i>	4.4.1.8	Ga0063698_03367	Ga0063690_02625	88	65	41	38	26	25	20	25
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE1</i>	2.1.1.14	Ga0063698_01625	Ga0063690_01904	6	4	4	4	4	4	5	4
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE2</i>	2.1.1.14	Ga0063698_03649	Ga0063690_03408	114	104	47	43	33	30	28	33
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE3</i>	2.1.1.14	Ga0063698_02951	Ga0063690_03520	18	22	10	8	16	13	16	19
	Probable cobalamin-dependent methionine synthase			Ga0063698_02758	Ga0063690_01531	54	84	38	34	24	26	32	37
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	S-adenosylmethionine synthase	<i>metK</i>	2.5.1.6	Ga0063698_00165	Ga0063690_00099	56	70	71	62	90	82	103	102
	S-adenosylhomocysteine hydrolase	<i>sahH</i>	3.3.1.1	Ga0063698_01333	Ga0063690_00969	452	509	566	499	275	255	275	263
Methionine degradation	methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0063698_00396	Ga0063690_03082	533	543	424	611	869	1042	772	1250

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 14.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175 (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Sulfate transporter	Probable sulfate permease			Ga0063698_03486	Ga0063690_02207	40	58	62	48	43	63	24	21
Methionine transporter	high-affinity methionine ABC transporter, ATPase component	<i>metN</i>		Ga0063698_03801	Ga0063690_03219	93	100	57	40	17	12	23	14
	high-affinity methionine ABC transporter, permease component	<i>metI</i>		Ga0063698_03800	Ga0063690_03220	38	34	28	16	23	13	31	15
	high-affinity methionine ABC transporter, substrate-binding component	<i>metQ</i>		Ga0063698_03799	Ga0063690_03221	123	144	98	59	16	8	20	11
	low-affinity methionine transporter	<i>metP</i>		Ga0063698_00808	Ga0063690_00684	90	69	56	85	385	353	290	314
Cyst(e)ine transporter	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_00430	Ga0063690_03058	3	8	10	7	15	14	18	22
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_00431	Ga0063690_03057	191	224	239	252	415	372	521	544
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_00432	Ga0063690_03056	106	186	195	245	182	230	239	274
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_01920	Ga0063690_01054	239	193	193	149	170	147	174	142
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_01921	Ga0063690_01055	130	105	83	60	72	57	70	67
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, permease component			Ga0063698_01922	Ga0063690_01056	445	378	375	302	274	257	249	263
	Probable cyst(e)ine ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_01923	Ga0063690_01057	2165	1905	2318	2271	1811	1756	1523	1490
Related oligopeptide transporter ^c	Oligopeptide ABC transporter, substrate-binding component			Ga0063698_03331	Ga0063690_01290	403	399	383	175	126	201	76	77
	Oligopeptide ABC transporter, permease component			Ga0063698_03332	Ga0063690_01289	149	159	98	37	24	24	11	9
	Oligopeptide ABC transporter, permease component			Ga0063698_03333	Ga0063690_01288	116	101	54	22	9	8	7	6
	Oligopeptide ABC transporter, ATPase component			Ga0063698_03334	Ga0063690_01287	761	654	439	192	54	44	51	48

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

^cCorresponding to the oligopeptide ABC transporter "BL1734 to BL1737" reported by Marie-Pierre Forquin et al. (2011)

Forquin M-P, Hébert A, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier J-F, et al. Global Regulation of the Response to Sulfur Availability in the Cheese-Related Bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. Appl Environ Microbiol. 2011;77:1449–59.

Supplemental material 15. Expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *H. alvei*.

Supplemental material 15.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *H. alvei* (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Sulfate assimilation	sulfate adenylyltransferase subunit 1	<i>cysN</i>	2.7.7.4	Ga0116594_108631	0.37	0.70	0.54	0.32
	sulfate adenylyltransferase subunit 2	<i>cysD</i>	2.7.7.4	Ga0116594_108630	0.36	0.96	0.63	0.58
	adenylylsulfate kinase	<i>cysC</i>	2.7.1.25	Ga0116594_108632	0.64	0.60	0.55	0.25
	phosphoadenylyl-sulfate reductase	<i>cysH</i>	1.8.4.8	Ga0116594_10476	0.35	0.22	0.26	0.14
	sulfite reductase, hemoprotein beta-component	<i>cysI</i>	1.8.1.2	Ga0116594_10475	0.43	0.26	0.42	0.15
	sulfite reductase, flavoprotein alpha-component	<i>cysJ</i>	1.8.1.2	Ga0116594_10474	0.53	0.64	0.58	0.37
	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	<i>cysG</i>	2.1.1.107	Ga0116594_1080135	0.73	0.82	0.79	0.94
Sulfonate assimilation	taurine dioxygenase	<i>tauD</i>	1.14.11.17	Ga0116594_1080163	1.10	0.97	1.21	1.28
	alkanesulfonate monooxygenase	<i>ssuD</i>	1.14.14.5	Ga0116594_112167	0.67	0.56	0.69	0.84
	FMN reductase	<i>ssuE</i>	1.5.1.38	Ga0116594_109342	0.54	0.71	0.71	0.59
Cysteine biosynthesis	serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	2.3.1.30	Ga0116594_1035130	1.46	1.78	1.33	1.38
	cysteine synthase A	<i>cysK</i>	2.5.1.47	Ga0116594_103489	0.42	0.66	0.60	0.47
	cysteine synthase B	<i>cysM</i>	2.5.1.47	Ga0116594_103484	0.53	0.30	0.58	0.39
Methionine biosynthesis	homoserine O-succinyltransferase	<i>metA</i>	2.3.1.46	Ga0116594_11026	0.72	0.96	1.17	1.51
	cystathionine gamma-synthase	<i>metB</i>	2.5.1.48	Ga0116594_108886	0.64	0.86	0.89	1.16
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE</i>	2.1.1.14	Ga0116594_105412	0.80	0.97	1.15	0.95
	cobalamin-dependent methionine synthase	<i>metH</i>	2.1.1.13	Ga0116594_100419	1.06	0.97	0.82	0.60
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	S-adenosylmethionine synthase	<i>metK</i>	2.5.1.6	Ga0116594_106838	0.73	0.82	0.70	0.64
	adenosylhomocysteine nucleosidase	<i>mtnN</i>	3.2.2.9	Ga0116594_106014	1.12	0.88	0.84	0.65
	S-ribosylhomocysteine lyase /quorum-sensing autoinducer 2 (AI-2) synthesis protein LuxS	<i>luxS</i>	4.4.1.21	Ga0116594_101122	0.72	0.80	1.01	1.07
Methionine degradation	methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_105962	112.66	43.91	6.80	3.95
	methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_100764	2.34	7.02	1.19	2.20

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 15.1. Impact of Brevibacterium strains on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in H. alvei (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Sulfate transporter	sulfate ABC transporter, substrate-binding component	<i>cysP</i>		Ga0116594_103480	0.57	0.87	1.05	0.82
	sulfate ABC transporter, permease component	<i>cysT</i>		Ga0116594_103481	0.48	0.82	0.78	0.50
	sulfate ABC transporter, permease component	<i>cysW</i>		Ga0116594_103482	0.53	0.54	0.49	0.21
	sulfate ABC transporter, ATPase component	<i>cysA</i>		Ga0116594_103483	0.42	0.34	0.45	0.28
	sulfate transport system substrate-binding protein	<i>sbp</i>		Ga0116594_1035137	0.75	1.96	0.85	0.82
	sulfate permease, Sulp family	<i>YchM</i>		Ga0116594_1007308	0.86	0.68	0.58	0.58
	pH dependent sulfate transporter, CysZ homolog	<i>cysZ</i>		Ga0116594_103490	1.11	1.08	1.28	1.08
Sulfonate transporter	taurine ABC transporter, substrate-binding component	<i>tauA</i>		Ga0116594_1080160	0.48	0.73	0.39	0.69
	taurine ABC transporter, ATPase component	<i>tauB</i>		Ga0116594_1080161	NE	NE	NE	NE
	taurine ABC transporter, permease component	<i>tauC</i>		Ga0116594_1080162	NE	NE	NE	NE
Cyst(e)ine transporter	cystine ABC transporter, substrate-binding component	<i>fliY</i>		Ga0116594_11227	0.81	2.08	1.78	2.17
	cystine ABC transporter, permease component	<i>yecS</i>		Ga0116594_11228	0.81	1.41	1.34	1.56
	cystine ABC transporter, ATPase component	<i>yecC</i>		Ga0116594_101614	0.58	0.72	1.09	1.17
	cystine transporter, YdjN homolog	<i>ydjN</i>		Ga0116594_10068	0.67	1.13	0.94	1.13
Methionine transporter	high-affinity methionine ABC transporter, ATPase component	<i>metN</i>		Ga0116594_107332	1.27	1.13	1.24	1.03
	high-affinity methionine ABC transporter, permease component	<i>metI</i>		Ga0116594_107331	1.60	0.98	1.72	1.19
	high-affinity methionine ABC transporter, substrate-binding component	<i>metQ</i>		Ga0116594_107330	1.38	1.05	1.74	1.11

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hanseni*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 15.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *H. alvei* (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Sulfate assimilation	sulfate adenylyltransferase subunit 1	<i>cysN</i>	2.7.7.4	Ga0116594_108631	107	65	40	45	54	19
	sulfate adenylyltransferase subunit 2	<i>cysD</i>	2.7.7.4	Ga0116594_108630	240	109	86	105	140	58
	adenylylsulfate kinase	<i>cysC</i>	2.7.1.25	Ga0116594_108632	12	12	8	7	6	3
	phosphoadenylyl-sulfate reductase	<i>cysH</i>	1.8.4.8	Ga0116594_10476	54	89	19	20	13	11
	sulfite reductase, hemoprotein beta-component	<i>cysI</i>	1.8.1.2	Ga0116594_10475	97	166	42	43	38	23
	sulfite reductase, flavoprotein alpha-component	<i>cysJ</i>	1.8.1.2	Ga0116594_10474	462	367	246	237	251	122
	uroporphyrinogen-III C-methyltransferase	<i>cysG</i>	2.1.1.107	Ga0116594_1080135	144	141	107	115	106	120
Sulfonate assimilation	taurine dioxygenase	<i>tauD</i>	1.14.11.17	Ga0116594_1080163	16	20	17	19	18	23
	alkanesulfonate monooxygenase	<i>ssuD</i>	1.14.14.5	Ga0116594_112167	5	4	4	2	3	3
	FMN reductase	<i>ssuE</i>	1.5.1.38	Ga0116594_109342	32	21	17	15	21	11
Cysteine biosynthesis	serine O-acetyltransferase	<i>cysE</i>	2.3.1.30	Ga0116594_1035130	436	390	645	695	543	487
	cysteine synthase A	<i>cysK</i>	2.5.1.47	Ga0116594_103489	526	334	224	220	294	143
	cysteine synthase B	<i>cysM</i>	2.5.1.47	Ga0116594_103484	23	44	12	13	13	15
Methionine biosynthesis	homoserine O-succinyltransferase	<i>metA</i>	2.3.1.46	Ga0116594_11026	106	77	78	74	117	106
	cystathionine gamma-synthase	<i>metB</i>	2.5.1.48	Ga0116594_108886	264	204	171	176	220	214
	cobalamin-independent methionine synthase	<i>metE</i>	2.1.1.14	Ga0116594_105412	26	23	21	22	28	20
	cobalamin-dependent methionine synthase	<i>metH</i>	2.1.1.13	Ga0116594_100419	206	247	222	241	159	134
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	S-adenosylmethionine synthase	<i>metK</i>	2.5.1.6	Ga0116594_106838	632	578	466	477	417	338
	adenosylhomocysteine nucleosidase	<i>mtnN</i>	3.2.2.9	Ga0116594_106014	72	107	82	94	57	63
	S-ribosylhomocysteine lyase /quorum-sensing autoinducer 2 (AI-2) synthesis protein LuxS	<i>luxS</i>	4.4.1.21	Ga0116594_101122	525	399	380	319	499	387
Methionine degradation	methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_105962	13	43	1522	1891	85	154
	methionine gamma-lyase	<i>mgl</i>	4.4.1.11	Ga0116594_100764	26	21	60	146	28	41

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 15.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *H. alvei* (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Sulfate transporter	sulfate ABC transporter, substrate-binding component	<i>cysP</i>		Ga0116594_103480	100	78	57	67	98	58
	sulfate ABC transporter, permease component	<i>cysT</i>		Ga0116594_103481	58	38	28	31	42	17
	sulfate ABC transporter, permease component	<i>cysW</i>		Ga0116594_103482	35	30	19	16	16	6
	sulfate ABC transporter, ATPase component	<i>cysA</i>		Ga0116594_103483	65	73	27	25	28	18
	sulfate transport system substrate-binding protein	<i>sbp</i>		Ga0116594_1035137	105	45	79	88	84	33
	sulfate permease, SulP family	<i>YchM</i>		Ga0116594_1007308	23	24	20	16	12	13
	pH dependent sulfate transporter, CysZ homolog	<i>cysZ</i>		Ga0116594_103490	164	160	183	173	197	157
Sulfonate transporter	taurine ABC transporter, substrate-binding component	<i>tauA</i>		Ga0116594_1080160	7	4	4	3	3	2
	taurine ABC transporter, ATPase component	<i>tauB</i>		Ga0116594_1080161	-	-	-	-	-	-
	taurine ABC transporter, permease component	<i>tauC</i>		Ga0116594_1080162	-	-	-	-	-	-
Cyst(e)ine transporter	cystine ABC transporter, substrate-binding component	<i>fliY</i>		Ga0116594_11227	449	193	368	402	745	381
	cystine ABC transporter, permease component	<i>yecS</i>		Ga0116594_11228	32	23	26	32	40	33
	cystine ABC transporter, ATPase component	<i>yecC</i>		Ga0116594_101614	106	94	62	67	108	99
	cystine transporter, YdjN homolog	<i>ydjN</i>		Ga0116594_10068	139	83	93	94	122	86
Methionine transporter	high-affinity methionine ABC transporter, ATPase component	<i>metN</i>		Ga0116594_107332	237	269	303	305	276	253
	high-affinity methionine ABC transporter, permease component	<i>metI</i>		Ga0116594_107331	164	235	266	230	265	256
	high-affinity methionine ABC transporter, substrate-binding component	<i>metQ</i>		Ga0116594_107330	1105	1265	1538	1335	1799	1283

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 16. Expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *D. hansenii*.

Supplemental material 16.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in *D. hansenii* (1/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
				T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Sulfate assimilation	similar to uniprot P08536 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR010W MET3 ATP sulfurylase	<i>MET3</i>	DEHA2D06138g	1.21	1.22	0.84	0.95	0.84	0.72	0.88	1.06	1.12	1.26
	highly similar to uniprot Q02196 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKL001C MET14 Adenylylsulfate kinase	<i>MET14</i>	DEHA2E12804g	1.05	1.32	0.86	0.95	0.68	0.60	0.76	1.26	1.06	1.54
	uniprot Q69FG3 <i>Debaryomyces hansenii</i> 3'5' bisphosphate nucleosidase	<i>MET22</i>	DEHA2E21274g	0.93	1.29	1.11	1.19	1.35	2.04	1.20	1.62	1.02	1.28
	similar to uniprot P18408 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR167C MET16 3'-phosphoadenylylsulfate reductase	<i>MET16</i>	DEHA2B15774g	1.16	1.34	0.98	0.92	1.31	0.92	1.42	1.14	1.62	1.56
	similar to uniprot P39692 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YFR030w MET10 sulfite reductase alpha subunit	<i>MET10</i>	DEHA2B15070g	1.20	1.10	0.97	1.13	1.45	1.08	1.03	1.02	1.03	1.02
	similar to uniprot P47169 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR137C MET5 Sulfite reductase beta subunit	<i>MET5</i>	DEHA2F04972g	1.30	1.59	0.82	0.94	0.96	0.74	1.27	1.27	1.31	1.43
	similar to uniprot P36150 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR069W MET1 S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase	<i>MET1</i>	DEHA2E07128g	1.17	1.31	1.05	1.06	1.15	0.47	1.09	0.82	1.47	1.04
	similar to uniprot P36150 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR069W MET1 S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase	<i>MET1</i>	DEHA2G21912g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	weakly similar to uniprot P15807 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR213W MET8 Bifunctional dehydrogenase and ferrochelataase	<i>MET8-like</i>	DEHA2F02706g	1.04	1.08	1.09	0.99	1.19	1.45	1.35	1.24	1.33	1.24
Sulfonate assimilation	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2B09768g	0.85	2.49	0.98	3.72	20.09	17.48	13.57	13.89	4.65	5.79
	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2C03036g	0.97	0.77	1.00	0.88	0.82	0.50	0.86	0.88	0.97	1.43
	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha-ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2D17446g	0.74	0.88	0.90	0.90	0.75	0.49	0.72	1.25	0.68	0.96
	similar to uniprot O74885 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> SPCC576 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2A01518g	0.99	1.25	0.37	0.78	0.62	2.18	0.70	2.28	0.81	2.04
	similar to CA5280 IPF1899 <i>Candida albicans</i> Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2C03322g	1.05	0.97	1.05	1.01	1.13	0.73	1.04	0.89	1.11	1.08
	similar to uniprot Q7S5S1 <i>Neurospora crassa</i> NCU09800 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2D18986g	0.77	0.89	0.90	0.97	0.62	0.83	0.66	0.70	0.61	0.66
	similar to uniprot Q5KKQ7 <i>Cryptococcus neoformans</i> var CNC02180 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2E01188g	0.69	0.76	0.85	1.03	0.83	1.70	0.76	1.76	0.81	1.41
	similar to CA1591 IPF14663 <i>Candida albicans</i> IPF14663 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2F13046g	0.96	1.07	1.10	1.13	1.45	1.18	1.52	1.66	1.30	1.35
Cysteine biosynthesis	highly similar to uniprot P32582 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR155W CYS4 Cystathionine beta-synthase	<i>CYS4</i>	DEHA2C14586g	1.11	1.17	1.02	1.26	1.28	0.80	1.04	1.06	1.13	1.17
	highly similar to uniprot P31373 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YAL012W CYS3 Cystathionine gamma-lyase	<i>CYS3</i>	DEHA2C15686g	1.14	1.33	1.34	1.80	3.70	2.63	2.29	2.56	1.55	1.65
	similar to uniprot P53206 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR012W Putative cysteine synthase	<i>MCY1</i>	DEHA2B04004g	0.99	1.06	1.04	1.08	1.71	1.46	1.38	1.32	1.12	0.98
	weakly similar to uniprot P53206 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR012W Putative cysteine synthase	<i>MCY1-like</i>	DEHA2F16236g	0.98	0.90	0.94	1.00	0.90	1.22	0.75	0.85	0.76	0.70

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 16.1. Impact of Brevibacterium strains and/or H. alvei on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in D. hansenii (2/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
				T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Methionine biosynthesis	similar to uniprot P08465 Saccharomyces cerevisiae YNL277W MET2 L-homoserine-O-acetyltransferase	<i>MET2</i>	DEHA2E23716g	1.02	1.05	1.00	1.08	1.15	0.87	1.08	1.01	1.14	1.08
	weakly similar to uniprot P08465 Saccharomyces cerevisiae YNL277W MET2 L-homoserine-O-acetyltransferase	<i>MET2-like</i>	DEHA2C02882g	0.94	0.84	1.00	0.97	0.88	0.89	0.79	0.89	0.83	0.90
	highly similar to uniprot P06106 Saccharomyces cerevisiae YLR303W MET17 O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase	<i>MET17</i>	DEHA2F06094g	0.80	1.33	0.86	1.19	1.62	2.50	1.26	1.86	0.89	1.26
	similar to uniprot P47164 Saccharomyces cerevisiae YJR130C STR2 Cystathionine gamma-synthase	<i>STR2</i>	DEHA2D09350g	1.04	0.87	1.04	0.87	0.78	0.94	0.88	0.78	0.83	0.77
	similar to uniprot P53101 Saccharomyces cerevisiae YGL184C STR3 Cystathionine beta-lyase	<i>STR3</i>	DEHA2A06798g	1.06	0.93	0.92	0.86	0.91	1.09	1.00	0.98	1.19	1.08
	highly similar to uniprot P05694 Saccharomyces cerevisiae YER091c MET6 5-methyltetrahydropteroylglutamate--homocysteine methyltransferase	<i>MET6</i>	DEHA2A07414g	1.00	1.17	0.94	1.30	1.29	1.60	1.09	1.14	0.89	0.91
	similar to uniprot Q12676 Saccharomyces cerevisiae YMR113W FOL3 Dihydrofolate synthetase	<i>FOL3</i>	DEHA2F21846g	0.92	0.95	0.96	0.88	0.69	0.85	0.74	0.73	0.79	0.76
	similar to uniprot Q08645 Saccharomyces cerevisiae YOR241W MET7 Folylpolylglutamate synthetase	<i>MET7</i>	DEHA2F08558g	0.87	0.89	1.03	0.94	0.82	0.87	0.80	0.81	0.77	0.71
	weakly similar to uniprot P46151 Saccharomyces cerevisiae YPL023C MET12 Isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MET12</i>	DEHA2F08976g	0.96	0.92	1.04	0.91	1.03	1.01	1.15	0.96	1.20	1.00
similar to uniprot P53128 Saccharomyces cerevisiae YGL125W MET13 Isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MET13</i>	DEHA2G01254g	1.12	0.84	0.98	0.83	0.77	0.76	0.86	0.67	1.01	0.85	
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	highly similar to uniprot P19358 Saccharomyces cerevisiae YDR502C SAM2 S-adenosylmethionine synthetase	<i>SAM2</i>	DEHA2E14212g	1.11	1.48	1.16	1.61	2.04	1.60	1.37	1.63	1.39	1.35
	highly similar to uniprot P39954 Saccharomyces cerevisiae YER043C SAH1 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	<i>SAH1</i>	DEHA2G19910g	1.15	1.16	0.95	1.27	1.27	0.81	0.99	0.97	1.04	0.98
	similar to uniprot Q12525 Saccharomyces cerevisiae YLL062C MHT1 S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase or uniprot Q08985 Saccharomyces cerevisiae YPL273W SAM4 S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	<i>SAM4</i> or <i>MHT1</i>	DEHA2A00616g	0.92	1.68	1.26	1.80	1.60	2.76	1.78	3.18	1.37	2.81
Methionine salvage	similar to uniprot Q07938 Saccharomyces cerevisiae YLR017W MEU1 Methylthioadenosine phosphorylase	<i>MEU1</i>	DEHA2C12166g	1.03	0.97	0.99	0.97	0.86	0.48	0.69	0.63	0.99	0.76
	similar to uniprot Q06489 Saccharomyces cerevisiae YPR118W MRI1 5'-methylthioribose-1-phosphate isomerase	<i>MRI1</i>	DEHA2A01276g	0.92	0.91	1.01	0.96	0.73	0.73	0.80	0.73	0.78	0.72
	similar to uniprot P47095 Saccharomyces cerevisiae YJR024C MDE1 5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	<i>MDE1</i>	DEHA2G06864g	0.99	0.90	1.01	0.88	0.70	0.50	0.63	0.57	0.73	0.56
	similar to uniprot P32626 Saccharomyces cerevisiae YEL038W UTR4 Protein with sequence similarity to acireductone synthases	<i>UTR4</i>	DEHA2B04158g	0.97	0.88	1.04	0.84	0.82	0.68	0.86	0.82	0.90	0.78
	highly similar to uniprot P47176 Saccharomyces cerevisiae YJR148W BAT2 Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	<i>BAT2</i>	DEHA2D06952g	0.95	0.90	1.13	1.04	1.29	1.01	0.75	0.79	0.77	0.62
	similar to uniprot Q03677 Saccharomyces cerevisiae YMR009W ADI1 Acireductone dioxigenase	<i>ADI1</i>	DEHA2B15532g	1.14	0.98	1.12	0.85	0.84	0.70	1.03	0.82	1.14	1.02
	similar to uniprot P53090 Saccharomyces cerevisiae YGL202W ARO8 Aromatic aminotransferase	<i>ARO8</i>	DEHA2A06886g	1.08	0.88	1.05	1.02	0.88	0.87	0.91	0.87	0.93	0.92
similar to gb ABN64230.1 Pichia stipitis aromatic amino acid aminotransferase	<i>ARO8-like</i>	DEHA2A00190g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 16.1. Impact of Brevibacterium strains and/or H. alvei on the expression of selected genes involved in sulfur metabolism in D. hansenii (3/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
				T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Glutathione biosynthesis	similar to uniprot Q9HF78 Candida albicans GCS1 Glutamate--cysteine ligase	<i>GSH1</i>	DEHA2F26444g	1.02	0.86	1.06	1.01	1.30	0.98	1.13	1.04	1.04	1.05
	similar to CA5124 CaGSH2 Candida albicans and uniprot Q08220 Saccharomyces cerevisiae YOL049W GSH2 Glutathione synthetase	<i>GSH2</i>	DEHA2C15620g	1.06	0.99	1.04	0.97	0.97	0.93	0.96	0.85	0.94	0.85
Glutathione catabolism	similar to uniprot Q05902 Saccharomyces cerevisiae YLR299W ECM38 Gamma-glutamyltranspeptidase	<i>ECM38</i>	DEHA2D09130g	1.15	0.91	0.91	0.90	0.79	0.77	0.81	0.83	0.98	0.97
	similar to uniprot P43616 Saccharomyces cerevisiae YFR044C DUG1 Cys-Gly metallo-di-peptidase	<i>DUG1</i>	DEHA2G19844g	0.89	1.34	0.81	1.10	0.71	1.15	0.66	0.93	0.77	0.76
	similar to uniprot P38149 Saccharomyces cerevisiae YBR281C DUG2 Component of glutamine amidotransferase (GATase II)	<i>DUG2</i>	DEHA2E06864g	0.94	1.05	0.96	1.04	1.34	1.10	1.28	1.47	1.23	1.35
	highly similar to CA4436 IPF13868 Candida albicans Putative glutamine amidotransferase (GATase II)	<i>DUG3</i>	DEHA2C17380g	1.10	1.08	1.09	1.06	1.42	1.27	1.34	1.42	1.41	1.32
Sulfate transporter	similar to uniprot P38359 Saccharomyces cerevisiae YBR294W SUL1 High affinity sulfate permease	<i>SUL1</i>	DEHA2E16082g	1.05	1.18	0.76	0.75	0.42	0.27	0.52	0.49	0.85	0.90
Cysteine transporter	similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2C00220g	0.96	0.76	0.83	0.77	1.92	1.08	2.40	1.96	1.86	2.09
	similar to uniprot Q12235 Saccharomyces cerevisiae YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2E00517g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Methionine transporter	similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1</i>	DEHA2C03102g	0.99	1.57	1.26	1.86	2.07	2.27	1.31	2.24	1.28	1.85
	weakly similar to uniprot P50276 Saccharomyces cerevisiae YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1-like</i>	DEHA2F05566g	1.01	0.90	0.89	0.78	0.72	0.75	0.83	0.83	0.83	0.90
	similar to uniprot P38734 Saccharomyces cerevisiae YHL036W MUP3 Low affinity methionine permease	<i>MUP3</i>	DEHA2D12078g	1.10	1.23	0.96	1.07	0.93	1.39	0.90	1.27	0.91	1.15
Glutathione transporter	highly similar to uniprot Q5YBA3 Candida albicans OPT1 Oligopeptide/glutathione transporter	<i>OPT1</i>	DEHA2C16808g	0.98	3.46	0.26	0.79	0.13	0.54	0.21	0.73	0.64	1.52
Other	similar to uniprot Q06408 Saccharomyces cerevisiae YDR380W ARO10 Phenylpyruvate decarboxylase	<i>ARO10</i>	DEHA2D10120g	0.77	0.51	1.36	0.67	1.61	1.42	0.98	0.98	0.55	0.47

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 16.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *D. hansenii* (1/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
				T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Sulfate assimilation	similar to uniprot P08536 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR010W MET3 ATP sulfurylase	<i>MET3</i>	DEHA2D06138g	627	464	700	546	531	399	433	287	567	442	646	531
	highly similar to uniprot Q02196 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKL001C MET14 Adenylylsulfate kinase	<i>MET14</i>	DEHA2E12804g	416	239	401	306	361	207	234	122	336	281	408	337
	uniprot Q69FG3 <i>Debaryomyces hansenii</i> 3'5' bisphosphate nucleosidase	<i>MET22</i>	DEHA2E21274g	248	238	212	297	277	258	277	418	240	304	231	279
	similar to uniprot P18408 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR167C MET16 3'-phosphoadenylylsulfate reductase	<i>MET16</i>	DEHA2B15774g	712	650	759	839	701	544	746	509	933	676	1057	925
	similar to uniprot P39692 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YFR030w MET10 sulfite reductase alpha subunit	<i>MET10</i>	DEHA2B15070g	11563	11819	12835	12499	11347	12161	13533	10856	11718	10625	11110	10893
	similar to uniprot P47169 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR137C MET5 Sulfite reductase beta subunit	<i>MET5</i>	DEHA2F04972g	4637	3522	5568	5389	3842	3022	3601	2237	5707	3927	5609	4581
	similar to uniprot P36150 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR069W MET1 S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase	<i>MET1</i>	DEHA2E07128g	196	232	211	297	208	224	183	93	203	166	265	219
	similar to uniprot P36150 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YKR069W MET1 S-adenosyl-L-methionine uroporphyrinogen III transmethylase	<i>MET1</i>	DEHA2G21912g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	weakly similar to uniprot P15807 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR213W MET8 Bifunctional dehydrogenase and ferrochelatase	<i>MET8-like</i>	DEHA2F02706g	114	112	109	116	125	100	111	140	134	117	140	126
Sulfonate assimilation	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha- ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2B09768g	242	247	189	585	236	817	4040	3667	1310	2542	1038	1299
	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha- ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2C03036g	62	34	55	25	63	27	42	14	51	26	55	44
	similar to uniprot Q12358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL057C JLP1 Fe(II)-dependent sulfonate/alpha- ketoglutarate dioxygenase	<i>JLP1</i>	DEHA2D17446g	22	16	15	14	20	13	14	7	14	17	14	14
	similar to uniprot O74885 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> SPCC576 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2A01518g	1029	364	936	437	375	263	521	685	540	638	768	675
	similar to CA5280 IPF1899 <i>Candida albicans</i> Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2C03322g	2095	2286	2032	2136	2235	2117	1912	1421	2049	1898	2165	2258
	similar to uniprot Q755S1 <i>Neurospora crassa</i> NCU09800 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2D18986g	228	160	161	138	206	142	115	114	133	96	128	96
	similar to uniprot Q5KKQ7 <i>Cryptococcus neoformans</i> var CNC02180 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2E01188g	258	151	165	112	218	142	176	220	154	234	193	195
	similar to CA1591 IPF14663 <i>Candida albicans</i> IPF14663 Putative sulfonate dioxygenase	<i>JLP1-like</i>	DEHA2F13046g	271	283	239	291	298	292	320	288	319	397	323	349
	Cysteine biosynthesis	highly similar to uniprot P32582 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR155W CYS4 Cystathionine beta-synthase	<i>CYS4</i>	DEHA2C14586g	6363	6352	6579	7135	6614	7273	6606	4292	6453	6239	6718
highly similar to uniprot P31373 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YAL012W CYS3 Cystathionine gamma-lyase		<i>CYS3</i>	DEHA2C15686g	5556	7536	5861	9594	7562	12197	16689	16807	9640	16323	8050	11288
similar to uniprot P53206 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR012W Putative cysteine synthase		<i>MCY1</i>	DEHA2B04004g	846	915	772	932	881	907	1173	1141	884	986	872	817
weakly similar to uniprot P53206 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR012W Putative cysteine synthase		<i>MCY1-like</i>	DEHA2F16236g	643	693	578	604	606	633	477	729	443	476	451	440

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 16.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *D. hansenii* (2/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
				T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Methionine biosynthesis	similar to uniprot P08465 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL277W MET2 L-homoserine-O-acetyltransferase	<i>MET2</i>	DEHA2E23716g	799	780	749	785	803	765	747	584	777	688	843	769
	weakly similar to uniprot P08465 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNL277W MET2 L-homoserine-O-acetyltransferase	<i>MET2-like</i>	DEHA2C02882g	816	774	705	624	811	684	588	588	602	573	624	634
	highly similar to uniprot P06106 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR303W MET17 O-acetyl homoserine-O-acetyl serine sulfhydrylase	<i>MET17</i>	DEHA2F06094g	221	171	163	219	190	185	296	366	221	250	182	197
	similar to uniprot P47164 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR130C STR2 Cystathionine gamma-synthase	<i>STR2</i>	DEHA2D09350g	960	926	918	777	1002	743	611	749	759	588	736	652
	similar to uniprot P53101 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL184C STR3 Cystathionine beta-lyase	<i>STR3</i>	DEHA2A06798g	1369	1324	1328	1184	1262	1052	1020	1244	1264	1066	1502	1299
	highly similar to uniprot P05694 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER091c MET6 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	<i>MET6</i>	DEHA2A07414g	3430	3693	3148	4147	3265	4357	3661	5092	3219	3355	2809	3037
	similar to uniprot Q12676 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR113W FOL3 Dihydrofolate synthetase	<i>FOL3</i>	DEHA2F21846g	262	232	221	214	251	189	146	171	164	140	189	162
	similar to uniprot Q08645 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR241W MET7 Folylpolylglutamate synthetase	<i>MET7</i>	DEHA2F08558g	664	663	529	572	687	569	447	495	477	444	474	428
	weakly similar to uniprot P46151 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPL023C MET12 Isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MET12</i>	DEHA2F08976g	968	1056	847	941	1005	884	810	916	1000	847	1063	966
	similar to uniprot P53128 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL125W MET13 Isozyme of methylenetetrahydrofolate reductase	<i>MET13</i>	DEHA2G01254g	898	926	921	752	885	711	560	608	730	510	837	716
S-adenosylmethionine (SAM) cycle	highly similar to uniprot P19358 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR502C SAM2 S-adenosylmethionine synthetase	<i>SAM2</i>	DEHA2E14212g	5429	5726	5616	8209	6457	8360	9079	7785	6497	8049	7069	7030
	highly similar to uniprot P39954 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YER043C SAH1 S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	<i>SAH1</i>	DEHA2G19910g	3964	4016	4244	4464	3832	4606	4098	2772	3954	3534	3843	3562
	similar to uniprot Q12525 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL062C MHT1 S-methylmethionine-homocysteine methyltransferase or uniprot Q08985 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPL273W SAM4 S-adenosylmethionine-homocysteine methyltransferase	<i>SAM4</i> or <i>MHT1</i>	DEHA2A00616g	10	5	8	8	12	8	13	11	10	13	12	12
Methionine salvage	similar to uniprot Q07938 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR017W MEU1 Methylthioadenosine phosphorylase	<i>MEU1</i>	DEHA2C12166g	395	491	375	459	394	435	278	204	278	277	361	337
	similar to uniprot Q06489 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR118W MRI1 5'-methylthioribose-1-phosphate isomerase	<i>MRI1</i>	DEHA2A01276g	251	259	213	229	255	230	150	162	180	162	181	169
	similar to uniprot P47095 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR024C MDE1 5'-methylthioribulose-1-phosphate dehydratase	<i>MDE1</i>	DEHA2G06864g	545	580	495	503	552	469	308	248	327	301	366	298
	similar to uniprot P32626 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEL038W UTR4 Protein with sequence similarity to acireductone synthases	<i>UTR4</i>	DEHA2B04158g	190	207	169	176	198	160	127	121	144	139	158	149
	highly similar to uniprot P47176 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YJR148W BAT2 Cytosolic branched-chain amino acid aminotransferase	<i>BAT2</i>	DEHA2D06952g	2659	2709	2328	2332	3018	2569	2794	2336	1869	1724	1897	1524
	similar to uniprot Q03677 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YMR009W ADI1 Acireductone dioxigenase	<i>ADI1</i>	DEHA2B15532g	283	318	298	303	317	250	193	193	262	219	299	297
	similar to uniprot P53090 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGL202W ARO8 Aromatic aminotransferase	<i>ARO8</i>	DEHA2A06886g	1089	1168	1077	984	1151	1098	780	877	906	874	931	973
	similar to gb ABN64230.1 <i>Pichia stipitis</i> aromatic amino acid aminotransferase	<i>ARO8-like</i>	DEHA2A00190g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 16.2. Expression level of selected genes involved in sulfur metabolism in *D. hansenii* (3/3).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
				T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Glutathione biosynthesis	similar to uniprot Q9HF78 <i>Candida albicans</i> GCS1 Glutamate--cysteine ligase	<i>GSH1</i>	DEHA2F26444g	2212	2430	2078	1999	2341	2237	2323	2033	2245	2184	2115	2321
	similar to CA5124 CaGSH2 <i>Candida albicans</i> and uniprot Q08220 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOL049W GSH2 Glutathione synthetase	<i>GSH2</i>	DEHA2C15620g	276	316	269	303	287	282	219	253	229	217	238	243
Glutathione catabolism	similar to uniprot Q05902 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLR299W ECM38 Gamma-glutamyltranspeptidase	<i>ECM38</i>	DEHA2D09130g	1114	964	1178	841	1013	794	721	636	858	673	1006	849
	similar to uniprot P43616 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YFR044C DUG1 Cys-Gly metallo-di-peptidase	<i>DUG1</i>	DEHA2G19844g	906	788	743	1012	740	791	527	780	533	582	638	541
	similar to uniprot P38149 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR281C DUG2 Component of glutamine amidotransferase (GATase II)	<i>DUG2</i>	DEHA2E06864g	500	484	429	487	481	457	547	455	528	593	566	594
	highly similar to CA4436 IPF13868 <i>Candida albicans</i> Putative glutamine amidotransferase (GATase II)	<i>DUG3</i>	DEHA2C17380g	272	284	275	294	297	274	313	309	305	338	353	342
Sulfate transporter	similar to uniprot P38359 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YBR294W SUL1 High affinity sulfate permease	<i>SUL1</i>	DEHA2E16082g	1324	684	1280	785	1020	473	447	157	768	329	1045	558
Cysteine transporter	similar to uniprot Q12235 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2C00220g	10	10	8	7	8	7	15	9	17	17	17	19
	similar to uniprot Q12235 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL055W YCT1 High-affinity cysteine-specific transporter	<i>YCT1</i>	DEHA2E00517g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methionine transporter	similar to uniprot P50276 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1</i>	DEHA2C03102g	7623	6924	7045	10533	9856	11624	13020	13377	8941	13739	9193	11610
	weakly similar to uniprot P50276 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR055W MUP1 High affinity methionine permease	<i>MUP1-like</i>	DEHA2F05566g	425	356	394	309	377	256	247	229	324	250	326	294
	similar to uniprot P38734 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YHL036W MUP3 Low affinity methionine permease	<i>MUP3</i>	DEHA2D12078g	233	180	237	214	225	176	178	215	175	191	197	189
Glutathione transporter	highly similar to uniprot Q5YBA3 <i>Candida albicans</i> OPT1 Oligopeptide/glutathione transporter	<i>OPT1</i>	DEHA2C16808g	2282	669	2042	2225	599	483	238	308	423	416	1328	916
Other	similar to uniprot Q06408 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YDR380W ARO10 Phenylpyruvate decarboxylase	<i>ARO10</i>	DEHA2D10120g	8161	8606	5693	4204	11047	5280	10548	10490	5895	6201	4142	3683

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 17. Expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *Brevibacterium* strains.

Supplemental material 17.1. Impact of *H. alvei* on the expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Fold change ^b			
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)		ATCC 9175	
						T21_DH_HA_86 vs T21_DH_86	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_86	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_9175	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_9175
Amine biosynthesis	Putative amino acid decarboxylase			Ga0063698_00463	Ga0063690_02024	0.80	0.83	0.86	0.77
Polyamine biosynthesis	Arginine/lysine/ornithine decarboxylase			Ga0063698_03483	Ga0063690_02210	0.98	1.29	0.47	0.80
	Arginine/lysine/ornithine decarboxylase			Ga0063698_01660	Ga0063690_00362	NE	NE	0.92	0.99
	Arginine decarboxylase		4.1.1.19	Ga0063698_02202	Ga0063690_02475	0.81	0.82	0.99	1.04
	Agmatinase		3.5.3.11	Ga0063698_02720	Ga0063690_01569	0.58	0.51	1.27	1.05
	Spermidine synthase		2.5.1.16	Ga0063698_03295	Ga0063690_01326	0.83	0.48	1.36	1.24
Polyamine transporter	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_02284	Ga0063690_02385	NE	NE	1.28	2.13
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_02285	Ga0063690_02384	0.60	3.46	1.09	1.21
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02286	Ga0063690_02383	NE	NE	1.47	1.32
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02287	Ga0063690_02382	NE	NE	1.07	1.15
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_02162	Ga0063690_01214	0.99	1.39	2.21	3.36
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02161	Ga0063690_01215	1.05	1.39	1.76	3.31
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02160	Ga0063690_01216	0.97	1.23	1.45	2.31
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_02159	Ga0063690_01217	1.34	1.54	1.21	1.28
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_03772	-	12.08	3.03	-	-
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_03773	-	6.96	2.94	-	-
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_03774	-	NE	NE	-	-
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_03775	-	NE	NE	-	-
	putrescine:proton symporter, AAT family			Ga0063698_01001	Ga0063690_00830	0.84	1.22	0.96	1.25

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 17.2. Expression level of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag ^a		Normalized reads ^b							
				<i>B. aurantiacum</i> 8(6)	<i>B. aurantiacum</i> ATCC 9175	8(6)				ATCC 9175			
						T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Amine biosynthesis	Putative amino acid decarboxylase			Ga0063698_00463	Ga0063690_02024	446	406	353	336	243	261	201	194
Polyamine biosynthesis	Arginine/lysine/ornithine decarboxylase			Ga0063698_03483	Ga0063690_02210	412	365	400	454	941	844	430	650
	Arginine/lysine/ornithine decarboxylase			Ga0063698_01660	Ga0063690_00362	-	-	-	-	5	8	5	8
	Arginine decarboxylase	4.1.1.19		Ga0063698_02202	Ga0063690_02475	169	150	136	126	275	253	262	252
	Agmatinase	3.5.3.11		Ga0063698_02720	Ga0063690_01569	42	56	24	29	35	27	42	27
	Spermidine synthase	2.5.1.16		Ga0063698_03295	Ga0063690_01326	47	86	39	36	28	28	36	33
Polyamine transporter	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_02284	Ga0063690_02385	-	-	-	-	5	3	6	5
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_02285	Ga0063690_02384	13	4	8	16	26	23	27	27
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02286	Ga0063690_02383	-	-	-	-	10	7	14	9
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02287	Ga0063690_02382	-	-	-	-	7	5	7	5
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_02162	Ga0063690_01214	173	85	170	115	184	51	398	164
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02161	Ga0063690_01215	265	165	277	228	345	109	592	347
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_02160	Ga0063690_01216	366	241	355	289	432	187	610	413
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_02159	Ga0063690_01217	3183	2721	4239	4092	5053	3839	5932	4720
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component			Ga0063698_03772	-	1	4	11	10	-	-	-	-
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component			Ga0063698_03773	-	1	2	6	6	-	-	-	-
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_03774	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ABC-type polyamines transport system, permease component			Ga0063698_03775	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	putrescine:proton symporter, AAT family			Ga0063698_01001	Ga0063690_00830	151	123	127	150	138	145	129	175

^aOrthologs are present in the same line

^bBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hanssenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against each strain: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of the corresponding strain and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 18. Expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *H. alvei*.

Supplemental material 18.1. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *H. alvei*.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Fold change ^a			
					T21_DH_HA_86 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_86 vs T28_DH_HA	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH_HA	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH_HA
Polyamine biosynthesis	lysine decarboxylase	<i>cadA1</i>	4.1.1.18	Ga0116594_108694	1.75	8.25	0.99	3.72
	lysine decarboxylase	<i>cadA2</i>	4.1.1.18	Ga0116594_1018149	0.52	1.18	0.47	0.91
	ornithine decarboxylase	<i>speF</i>	4.1.1.17	Ga0116594_1018208	5.58	3.62	0.55	0.30
	arginine decarboxylase	<i>adiA1</i>	4.1.1.19	Ga0116594_100537	1.19	1.88	0.94	1.08
	arginine decarboxylase	<i>adiA2</i>	4.1.1.19	Ga0116594_10455	1.01	1.17	0.78	1.25
	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_106836	1.05	1.17	0.54	0.51
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0116594_106833	0.60	1.25	0.79	1.14
Polyamine transporter	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>potF</i>		Ga0116594_1077166	0.33	0.25	1.41	1.90
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>potG</i>		Ga0116594_1077167	0.28	0.47	0.85	1.38
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potH</i>		Ga0116594_1077168	0.16	0.57	0.76	1.54
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potI</i>		Ga0116594_1077169	0.26	0.49	0.86	1.38
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>potD</i>		Ga0116594_1007437	0.79	0.82	0.93	1.03
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potC</i>		Ga0116594_1007439	0.58	0.60	1.05	0.59
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potB</i>		Ga0116594_1007440	0.73	0.39	0.84	0.54
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>potA</i>		Ga0116594_1007441	0.76	0.52	0.95	0.80
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>ycdS</i>		Ga0116594_101411	0.68	0.60	1.06	1.21
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>ycdT</i>		Ga0116594_101413	0.43	0.40	0.68	0.98
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>ycdU</i>		Ga0116594_101414	0.37	0.35	0.66	0.99
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>ycdV</i>		Ga0116594_101415	0.27	0.20	0.40	0.47
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB</i>		Ga0116594_1007438	0.74	0.68	0.89	1.05
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB2</i>		Ga0116594_1018148	0.53	1.18	0.56	1.06
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB1</i>		Ga0116594_108692	1.39	3.33	1.38	2.40
	putrescine:ornithine antiporter	<i>potE</i>		Ga0116594_1018207	5.76	3.23	0.70	0.38
	arginine:agmatine antiporter	<i>adiC1</i>		Ga0116594_100539	1.15	2.90	0.86	1.74
	arginine:agmatine antiporter	<i>adiC2</i>		Ga0116594_10456	0.89	0.88	0.85	0.99
	arginine:ornithine antiporter / lysine permease	<i>ydgI</i>		Ga0116594_112145	1.53	1.86	0.38	0.68
	spermidine export protein MdtJ	<i>mdtJ</i>		Ga0116594_1007362	2.86	1.17	1.38	0.51
	spermidine export protein MdtI	<i>mdtI</i>		Ga0116594_1007363	2.22	0.83	1.13	0.40
	putrescine importer	<i>puuP</i>		Ga0116594_107759	0.37	0.13	0.40	0.27

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 18.2. Impact of *Brevibacterium* strains on the expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *H. alvei*.

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	EC number	Locus tag	Normalized reads ^a					
					T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Polyamine biosynthesis	lysine decarboxylase	<i>cadA1</i>	4.1.1.18	Ga0116594_108694	44	34	78	282	41	115
	lysine decarboxylase	<i>cadA2</i>	4.1.1.18	Ga0116594_1018149	1256	838	668	994	557	691
	ornithine decarboxylase	<i>speF</i>	4.1.1.17	Ga0116594_1018208	700	1912	3964	6947	361	522
	arginine decarboxylase	<i>adiA1</i>	4.1.1.19	Ga0116594_100537	38	38	46	73	34	38
	arginine decarboxylase	<i>adiA2</i>	4.1.1.19	Ga0116594_10455	18	12	18	14	13	14
	arginine decarboxylase	<i>speA</i>	4.1.1.19	Ga0116594_106836	286	360	303	422	145	165
	agmatinase	<i>speB</i>	3.5.3.11	Ga0116594_106833	155	111	94	138	115	115
Polyamine transporter	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>potF</i>		Ga0116594_1077166	138	107	46	27	182	184
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>potG</i>		Ga0116594_1077167	72	52	20	25	57	65
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potH</i>		Ga0116594_1077168	14	13	2	8	10	19
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potI</i>		Ga0116594_1077169	18	17	4	9	14	22
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>potD</i>		Ga0116594_1007437	305	271	245	223	264	253
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potC</i>		Ga0116594_1007439	15	22	9	13	15	12
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>potB</i>		Ga0116594_1007440	18	27	13	11	14	13
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>potA</i>		Ga0116594_1007441	58	76	45	40	52	56
	ABC-type polyamines transport system, substrate binding component	<i>ydcS</i>		Ga0116594_101411	272	264	186	159	270	290
	ABC-type polyamines transport system, ATPase component	<i>ydcT</i>		Ga0116594_101413	103	104	45	42	65	92
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>ydcU</i>		Ga0116594_101414	18	17	7	6	11	16
	ABC-type polyamines transport system, permease component	<i>ydcV</i>		Ga0116594_101415	77	91	21	18	29	39
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB</i>		Ga0116594_1007438	23	25	17	17	19	24
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB2</i>		Ga0116594_1018148	333	208	178	246	175	199
	cadaverine:lysine antiporter	<i>cadB1</i>		Ga0116594_108692	26	19	37	65	34	42
	putrescine:ornithine antiporter	<i>potE</i>		Ga0116594_1018207	54	147	315	478	35	51
	arginine:agmatine antiporter	<i>adiC1</i>		Ga0116594_100539	3	2	4	6	3	3
	arginine:agmatine antiporter	<i>adiC2</i>		Ga0116594_10456	7	8	6	7	6	7
	arginine:ornithine antiporter / lysine permease	<i>ydgI</i>		Ga0116594_112145	31	23	47	43	11	14
	spermidine export protein MdtJ	<i>mdtJ</i>		Ga0116594_1007362	483	1337	1395	1569	624	617
	spermidine export protein MdtI	<i>mdtI</i>		Ga0116594_1007363	229	694	513	575	242	254
	putrescine importer	<i>puuP</i>		Ga0116594_107759	406	650	151	84	153	158

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *H. alvei*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *H. alvei* and multiplied by a factor 1,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 19. Expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *D. hansenii*.

Supplemental material 19.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *D. hansenii* (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
				T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Polyamine biosynthesis	similar to uniprot P21182 Saccharomyces cerevisiae YOL052C SPE2 S-adenosylmethionine decarboxylase and similar to ca CA2712 CaSPE2 Candida albicans CaSPE2	<i>SPE2</i>	DEHA2E12254g	1.12	0.99	0.95	1.14	1.23	0.70	1.06	0.97	1.08	1.02
	highly similar to uniprot Q12074 Saccharomyces cerevisiae YPR069C SPE3 putrescine aminopropyltransferase (spermidine synthase)	<i>SPE3</i>	DEHA2D10472g	1.03	1.06	0.92	1.12	0.97	0.69	0.87	0.83	1.04	0.82
	similar to uniprot Q12455 Saccharomyces cerevisiae YLR146C SPE4 Spermine Synthase	<i>SPE4</i>	DEHA2E16456g	1.04	1.15	0.95	1.23	1.30	0.76	0.96	1.05	1.04	1.09
	similar to uniprot P08432 Saccharomyces cerevisiae YKL184W SPE1 Ornithine decarboxylase	<i>SPE1</i>	DEHA2D09614g	1.20	1.11	0.85	1.07	0.98	0.69	0.87	0.75	0.96	0.81
	similar to uniprot P50264 Saccharomyces cerevisiae YMR020W FMS1 Polyamine oxidase	<i>FMS1</i>	DEHA2A02552g	0.92	0.84	1.08	0.90	0.87	1.04	0.81	0.85	0.72	0.72
Polyamine importer	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2D07018g	3.43	26.06	0.08	0.38	0.03	0.13	0.09	0.32	1.09	7.32
	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C Saccharomyces cerevisiae DUR3 Plasma membrane urea transporter and highly similar to CA5245 CaDUR32 Candida albicans CaDUR32	<i>DUR3</i>	DEHA2E24112g	0.92	1.36	0.92	1.20	1.30	2.97	0.99	1.82	0.77	1.34
	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E23320g	0.95	1.10	0.96	1.06	1.02	1.06	1.02	1.30	0.90	1.22
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G06930g	1.05	0.68	1.37	1.41	1.67	0.78	1.21	0.84	1.28	0.87
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C12056g	1.10	0.88	0.28	0.24	0.04	0.27	0.17	0.15	0.31	0.42
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039w GAP1 general amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C07194g	1.20	1.06	1.00	1.10	1.07	0.69	0.95	0.87	1.04	1.02
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E11308g	1.28	0.96	1.07	1.04	1.34	1.04	0.95	0.87	1.28	1.04
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E10076g	1.01	1.35	1.38	1.78	2.58	1.84	1.64	2.13	1.55	1.78
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E14630g	1.19	0.99	0.86	1.13	0.73	0.37	0.70	0.58	0.77	0.81
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2D10164g	1.03	1.03	1.13	0.81	0.49	0.40	0.87	0.95	0.61	1.11
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G21934g	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2C00770g	0.87	1.53	0.59	0.81	1.27	1.51	0.85	2.26	2.46	2.76
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2E15026g	1.23	1.11	0.98	1.08	1.33	0.55	1.04	0.96	1.48	1.29
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2E18700g	1.18	1.17	1.06	1.19	1.78	1.10	1.33	1.22	1.46	1.21

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 19.1. Impact of *Brevibacterium* strains and/or *H. alvei* on the expression of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *D. hansenii* (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Fold change ^a									
				T21_DH_HA vs T21_DH	T28_DH_HA vs T28_DH	T21_DH_86 vs T21_DH	T28_DH_86 vs T28_DH	T21_DH_HA_86 vs T21_DH	T28_DH_HA_86 vs T28_DH	T21_DH_9175 vs T21_DH	T28_DH_9175 vs T28_DH	T21_DH_HA_9175 vs T21_DH	T28_DH_HA_9175 vs T28_DH
Polyamine exporter	some similarities with uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028w TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1-like</i>	DEHA2A02640g	0.80	1.39	1.14	0.90	0.55	0.90	0.81	2.09	0.60	2.03
	weakly similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1-like</i>	DEHA2C00506g	1.44	1.33	0.86	1.58	5.06	8.33	3.45	7.08	1.64	4.59
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2C15466g	0.84	1.22	0.98	1.12	0.72	1.58	0.92	1.28	0.59	1.10
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2D05808g	1.01	1.36	1.04	1.76	2.37	1.63	1.54	2.05	1.28	1.59
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2E05786g	1.01	1.09	1.23	1.48	1.61	1.45	1.12	1.37	1.12	1.34
	weakly similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2-like</i>	DEHA2A00506g	1.38	1.30	0.47	1.57	1.38	4.35	0.47	2.22	1.11	2.35
	similar to uniprot Q06451 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR156C TPO3 Polyamine transporter or uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2</i> or <i>TPO3</i>	DEHA2B14740g	0.86	0.55	0.91	1.45	1.82	3.24	0.87	1.85	0.70	1.16
	weakly similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2-like</i>	DEHA2E06006g	1.11	1.10	0.99	1.13	1.08	0.92	0.94	1.05	1.12	1.07
	similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2</i>	DEHA2G00616g	1.20	1.22	1.07	1.25	0.64	0.89	0.42	0.58	0.47	0.54
	some similarities with uniprot Q12256 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR273C TPO4 Polyamine transporter	<i>TPO4-like</i>	DEHA2F14542g	0.73	0.82	0.98	1.18	1.24	2.85	0.85	1.26	0.66	1.02
similar to uniprot Q12256 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR273C TPO4 Polyamine transporter	<i>TPO4</i>	DEHA2F14564g	1.00	0.93	1.26	1.46	2.08	2.04	1.27	1.89	1.21	1.40	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Fold change values are colored according to the following rules: white=no change; slight red=down-regulation and fold change > 0.5; dark red=down-regulation and fold change ≤ 0.5; slight green=up-regulation and fold change < 2; dark green=up-regulation and fold change ≥ 2. NE=gene not expressed. Differential expression analysis was conducted using DESeq2 package, adjusted p-value < 0.05

Supplemental material 19.2. Expression level of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *D. hansenii* (1/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
				T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Polyamine biosynthesis	similar to uniprot P21182 Saccharomyces cerevisiae YOL052C SPE2 S-adenosylmethionine decarboxylase and similar to ca CA2712 CaSPE2 Candida albicans CaSPE2	<i>SPE2</i>	DEHA2E12254g	3410	3449	3524	3290	3279	3569	3404	2061	3487	3009	3435	3211
	highly similar to uniprot Q12074 Saccharomyces cerevisiae YPR069C SPE3 putrescine aminopropyltransferase (spermidine synthase)	<i>SPE3</i>	DEHA2D10472g	1036	1055	978	1074	958	1067	821	619	928	776	999	785
	similar to uniprot Q12455 Saccharomyces cerevisiae YLR146C SPE4 Spermine Synthase	<i>SPE4</i>	DEHA2E16456g	945	825	915	913	918	922	1003	536	838	781	918	817
	similar to uniprot P08432 Saccharomyces cerevisiae YKL184W SPE1 Ornithine decarboxylase	<i>SPE1</i>	DEHA2D09614g	2582	2389	2856	2542	2220	2316	2059	1398	2289	1595	2322	1761
	similar to uniprot P50264 Saccharomyces cerevisiae YMR020W FMS1 Polyamine oxidase	<i>FMS1</i>	DEHA2A02552g	149	164	126	133	162	136	107	146	102	102	99	108
Polyamine importer	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2D07018g	7284	479	23231	11895	564	168	158	55	652	152	7275	3089
	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C Saccharomyces cerevisiae DUR3 Plasma membrane urea transporter and highly similar to CA5245 CaDUR32 Candida albicans CaDUR32	<i>DUR3</i>	DEHA2E24112g	142	89	121	117	130	98	151	226	96	118	100	109
	similar to uniprot P33413 Saccharomyces cerevisiae YHL016C DUR3 Plasma membrane urea transporter	<i>DUR3</i>	DEHA2E23320g	353	254	309	271	340	247	295	230	299	274	295	281
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G06930g	898	1529	867	1007	1242	1960	1217	1017	986	1188	1071	1210
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C12056g	25653	8238	25911	6972	7294	1907	747	1951	4765	867	7390	3122
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039w GAP1 general amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2C07194g	2067	2008	2301	2045	2104	2005	1801	1185	1876	1601	2000	1867
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E11308g	795	917	940	846	856	861	864	814	742	666	943	871
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E10076g	6334	7116	5963	9318	8911	11441	13442	11134	9011	13698	9172	11489
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2E14630g	309	239	344	228	272	244	183	75	227	132	223	175
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2D10164g	627	274	594	274	710	204	252	93	454	240	354	277
	similar to uniprot P19145 Saccharomyces cerevisiae YKR039W GAP1 General amino acid permease	<i>GAP1</i>	DEHA2G21934g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2C00770g	7	4	6	5	4	3	7	5	5	6	16	9
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2E15026g	1950	2162	2203	2293	1923	2115	2072	997	2112	1987	2676	2540
	similar to uniprot P38090 Saccharomyces cerevisiae YBR132C AGP2 Plasma membrane carnitine/polyamine transporter	<i>AGP2</i>	DEHA2E18700g	4340	5467	4703	6130	4620	5901	6210	5093	5406	5841	5897	6008

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

Supplemental material 19.2. Expression level of selected genes involved in amine/polyamine metabolism in *D. hansenii* (2/2).

Pathway / Function	Predicted protein product	Gene symbol	Locus tag	Normalized reads ^a											
				T21_DH	T28_DH	T21_DH_HA	T28_DH_HA	T21_DH_86	T28_DH_86	T21_DH_HA_86	T28_DH_HA_86	T21_DH_9175	T28_DH_9175	T21_DH_HA_9175	T28_DH_HA_9175
Polyamine exporter	some similarities with uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028w TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1-like</i>	DEHA2A02640g	11	3	8	4	13	2	5	2	8	5	6	5
	weakly similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1-like</i>	DEHA2C00506g	11	6	15	8	10	9	47	43	22	34	17	26
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2C15466g	42	21	33	25	42	22	25	29	33	22	23	22
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2D05808g	2841	2625	2663	3430	3020	4171	5554	3635	3458	4681	3402	3779
	similar to uniprot Q07824 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YLL028W TPO1 Polyamine transporter	<i>TPO1</i>	DEHA2E05786g	2596	2540	2443	2656	3246	3399	3399	3133	2692	3099	2711	3081
	weakly similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2-like</i>	DEHA2A00506g	5057	1695	6648	2108	2464	2375	5901	6260	2493	3294	5374	3605
	similar to uniprot Q06451 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPR156C TPO3 Polyamine transporter or uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2</i> or <i>TPO3</i>	DEHA2B14740g	36642	26506	29329	14067	33966	34728	55040	73385	23892	38232	24032	27994
	weakly similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2-like</i>	DEHA2E06006g	175	169	180	180	175	174	154	132	148	151	182	165
	similar to uniprot P53283 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YGR138C TPO2 Polyamine transporter	<i>TPO2</i>	DEHA2G00616g	3061	2252	3435	2642	3327	2531	1612	1718	1130	1020	1334	1116
	some similarities with uniprot Q12256 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR273C TPO4 Polyamine transporter	<i>TPO4-like</i>	DEHA2F14542g	415	309	278	248	408	335	419	754	255	315	253	286
similar to uniprot Q12256 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YOR273C TPO4 Polyamine transporter	<i>TPO4</i>	DEHA2F14564g	4434	4474	4100	4025	5608	5933	7439	7728	5222	7652	4986	5706	

^aBiological conditions are coded according to the following rules: T21 and T28 correspond to the sampling time (day 21 and day 28, respectively); DH, HA, 86 and 9175 correspond to the presence of *D. hansenii*, *H. alvei*, *B. aurantiacum* 8(6) and *B. aurantiacum* ATCC 9175, respectively. Normalization was performed against *D. hansenii*: the read numbers were divided by the sum of the reads that mapped to the CDSs of *D. hansenii* and multiplied by a factor 10,000,000. The color scale represents the abundance of normalized reads, with red indicating low abundance and green indicating high abundance

References

1. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11:259–274.
2. Irlinger F, Layec S, Hélinck S, Dugat-Bony E. 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–11.
3. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. 2017. Microbiology of Cheese Ripening, p. 333–390. In Fox, PF, Guinee, TP, Cogan, TM, McSweeney, PLH (eds.), *Fundamentals of Cheese Science*. Springer, Boston, MA.
4. Rudolf M, Scherer S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol* 63:91–98.
5. Bockelmann W, Hoppe-Seyler T. 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int Dairy J* 11:307–314.
6. Bockelmann W. 2010. Secondary Cheese Starter Cultures, p. 193–230. In Law, BA, Tamime, AY (eds.), *Technology of Cheesemaking*. Wiley-Blackwell, Oxford.
7. Mounier J, Goerges S, Gelsomino R, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Brennan NM, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM. 2006. Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol* 101:668–681.
8. Brennan NM, Ward AC, Beresford TP, Fox PF, Goodfellow M, Cogan TM. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 68:820–830.
9. Feurer C, Vallaëys T, Corrieu G, Irlinger F. 2004. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a french soft, red-smear cheese? *J Dairy Sci* 87:3189–3197.
10. Goerges S, Mounier J, Rea MC, Gelsomino R, Heise V, Beduhn R, Cogan TM, Vancanneyt M, Scherer S. 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Appl Environ Microbiol* 74:2210–2217.
11. Gori K, Ryssel M, Arneborg N, Jespersen L. 2013. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microb Ecol* 65:602–615.
12. Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Scherer S, Swings J, Fitzgerald GF, Cogan TM. 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol* 71:6489–6500.
13. Rea MC, Gorges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, Scherer S, Swings J, Cogan TM. 2007. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J Dairy Sci* 90:2200–2210.
14. Rattray FP, Fox PF. 1999. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review. *J Dairy Sci* 82:891–909.
15. Onraedt A, Soetaert W, Vandamme E. 2005. Industrial importance of the genus *Brevibacterium*. *Biotechnol Lett* 27:527–533.
16. Forquin-Gomez M-P, Weimer BC, Sorieul L, Kalinowski J, Vallaëys T. 2014. The Family *Brevibacteriaceae*, p. 141–153. In Rosenberg, E, DeLong, EF, Lory, S, Stackebrandt, E, Thompson, F (eds.), *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.

17. Cogan TM. 2011. Bacteria, Beneficial | *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum* and Other Smear Microorganisms, p. 395–400. In Fuquay, JW, Fox, PF, McSweeney, PLH (eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, San Diego, CA.
18. Gavrish EY, Krauzova VI, Potekhina NV, Karasev SG, Plotnikova EG, Altyntseva OV, Korosteleva LA, Evtushenko LI. 2004. Three new species of brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp nov., and *Brevibacterium permense* sp nov. *Microbiology* 73:176–183.
19. Mounier J, Coton M, Irlinger F, Landaud S, Bonnarme P. 2017. Smear-Ripened Cheeses, p. 955–996. In McSweeney, PLH, Fox, PF, Cotter, PD, Everett, DW (eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, San Diego, CA.
20. Monnet C, Landaud S, Bonnarme P, Swennen D. 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol Lett* 362:1–9.
21. Pham N-P, Layec S, Dugat-Bony E, Vidal M, Irlinger F, Monnet C. 2017. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics* 18:955.
22. Purko M, Nelson WO, Wood WA. 1951. The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens*. *J Dairy Sci* 34:699–705.
23. Beattie SE, Torrey GS. 1986. Toxicity of methanethiol produced by *Brevibacterium linens* toward *Penicillium expansum*. *J Agr Food Chem* 34:102–104.
24. Kastman EK, Kamelamela N, Norville JW, Cosetta CM, Dutton RJ, Wolfe BE. 2016. Biotic Interactions Shape the Ecological Distributions of *Staphylococcus* Species. *mBio* 7:e01157-16.
25. Zhang Y, Kastman EK, Guasto JS, Wolfe BE. 2018. Fungal networks shape dynamics of bacterial dispersal and community assembly in cheese rind microbiomes. *Nat Commun* 9:336.
26. Wolf T, Kämmer P, Brunke S, Linde J. 2018. Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 42:7–12.
27. Kagkli DM, Vancanneyt M, Vandamme P, Hill C, Cogan TM. 2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *J Appl Microbiol* 103:1393–1405.
28. Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, Villani F. 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol* 26:228–231.
29. Sablé S, Portrait V, Gautier V, Letellier F, Cottenceau G. 1997. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme Microb Tech* 21:212–220.
30. Abriouel H, Martín-Platero A, Maqueda M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol* 127:200–208.
31. Coton M, Delbés-Paus C, Irlinger F, Desmasures N, Le Fleche A, Stahl V, Montel M-C, Coton E. 2012. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol* 29:88–98.
32. Le Boucher C, Courant F, Jeanson S, Chereau S, Maillard M-B, Royer A-L, Thierry A, Dervilly-Pinel G, Le Bizec B, Lortal S. 2013. First mass spectrometry metabolic fingerprinting of bacterial metabolism in a model cheese. *Food Chem* 141:1032–1040.
33. Monnet C, Back A, Irlinger F. 2012. Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Appl Environ Microbiol* 78:3185–3192.

34. Monnet C, Dugat-Bony E, Swennen D, Beckerich J-M, Irlinger F, Fraud S, Bonnarme P. 2016. Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis. *Front Microbiol* 7:536.
35. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17:10–12.
36. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25.
37. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169.
38. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* 40:D109–D114.
39. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
40. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B Met* 57:289–300.
41. Arndt A, Eikmanns BJ. 2007. The Alcohol Dehydrogenase Gene *adhA* in *Corynebacterium glutamicum* Is Subject to Carbon Catabolite Repression. *J Bacteriol* 189:7408.
42. Auchter M, Arndt A, Eikmanns BJ. 2009. Dual transcriptional control of the acetaldehyde dehydrogenase gene *ald* of *Corynebacterium glutamicum* by RamA and RamB. *J Biotechnol* 140:84–91.
43. Schneider BL, Ruback S, Kiupakis AK, Kasbarian H, Pybus C, Reitzer L. 2002. The *Escherichia coli* *gabDTPC* Operon: Specific γ -Aminobutyrate Catabolism and Nonspecific Induction. *J Bacteriol* 184:6976.
44. Hofman-Bang J. 1999. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biotechnol* 12:35–71.
45. Bonham KS, Wolfe BE, Dutton RJ. 2017. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. *eLife* 6.
46. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27:215–237.
47. Philpott CC. 2006. Iron uptake in fungi: A system for every source. *BBA-Mol Cell Res* 1763:636–645.
48. Forquin M-P, Hébert A, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier J-F, Landaud S, Junot C, Bonnarme P, Martin-Verstraete I. 2011. Global Regulation of the Response to Sulfur Availability in the Cheese-Related Bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. *Appl Environ Microbiol* 77:1449–1459.
49. Bockelmann W. 2003. The production of smear cheeses, p. 470–491. In Smit, G (ed.), *Dairy Processing: Improving Quality*. Woodhead Publishing, Cambridge.
50. 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.
51. Brune I, Werner H, Hüser AT, Kalinowski J, Pühler A, Tauch A. 2006. The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 7:21.

52. Wennerhold J, Bott M. 2006. The DtxR Regulon of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 188:2907.
53. Sheldon JR, Heinrichs DE. 2015. Recent developments in understanding the iron acquisition strategies of gram positive pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 39:592–630.
54. Noordman WH, Reissbrodt R, Bongers RS, Rademaker JLW, Bockelmann W, Smit G. 2006. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *J Appl Microbiol* 101:637–646.
55. Inoue H, Inagaki K, Eriguchi SI, Tamura T, Esaki N, Soda K, Tanaka H. 1997. Molecular characterization of the *mde* operon involved in L-methionine catabolism of *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 179:3956.
56. Manukhov IV, Mamaeva DV, Morozova EA, Rastorguev SM, Faleev NG, Demidkina TV, Zavilgelsky GB. 2006. L-methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*: Cloning of the gene and kinetic parameters of the enzyme. *Biochem (Mosc)* 71:361–369.
57. Bonnarme P, Lapadatescu C, Yvon M, Spinnler H-E. 2001. L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J Dairy Res* 68:663–674.
58. Monnet C, Loux V, Gibrat J-F, Spinnler E, Barbe V, Vacherie B, Gavory F, Gourgbeyre E, Siguier P, Chandler M, Elleuch R, Irlinger F, Vallaes T. 2010. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLOS ONE* 5:e15489.
59. Liu H, Valdehuesa KNG, Ramos KRM, Nisola GM, Lee W-K, Chung W-J. 2014. L-arabonate and d-galactonate production by expressing a versatile sugar dehydrogenase in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technol* 159:455–459.

CHAPITRE III
DISCUSSION ET
PERSPECTIVES

CHAPITRE III-DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre des mécanismes sous-jacents à l'adaptation au milieu fromager chez les bactéries d'affinage du genre *Brevibacterium*, un genre souvent utilisé en technologie fromagère, mais dont l'implantation est parfois difficile à maîtriser. Dans ce but, deux axes de recherche ont été explorés : (i) La génomique comparative, qui consistait à identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation du genre *Brevibacterium* au milieu fromager via l'analyse *in silico* des génomes de différentes souches, et (ii) L'étude fonctionnelle, qui consistait à étudier les interactions biotiques entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei* dans les fromages modèles par une approche transcriptomique via la méthode RNA-seq.

Des analyses de génomique comparative révèlent des déterminants génétiques responsables de l'adaptation de *Brevibacterium* au milieu fromager.

Nous avons réalisé une étude de génomique comparative sur 23 souches de *Brevibacterium* isolées de différents habitats, dont 12 souches provenant de fromages. La génomique comparative est une approche couramment utilisée pour étudier des phénomènes d'adaptation microbienne dans différents environnements, y compris le fromage [280, 505–508]. Lors de cette étude, nous avons séquencé le génome de 13 souches de *Brevibacterium*, dont 11 souches isolées de différents fromages. Ceci a permis d'enrichir considérablement les données génomiques du genre *Brevibacterium*, notamment des souches isolées de fromage, puisqu'avant ce projet de séquençage, il n'y avait qu'une seule souche fromagère dont le génome était disponible (*B. aurantiacum* ATCC 9174). Par la suite, l'exploitation de ces données génomiques nous a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation de *Brevibacterium* à l'environnement fromager, et de suggérer certains mécanismes écologiques et évolutifs sous-jacents à cette adaptation.

L'étude phylogénétique de 23 souches de *Brevibacterium*, par une approche phylogénomique (c'est-à-dire, la phylogénie issue des alignements de plusieurs gènes concaténés), a confirmé la répartition des souches fromagères de *Brevibacterium* dans différentes espèces et dans des groupes phylogénétiques différents, ce qui suggère des adaptations indépendantes au milieu fromager. Les souches fromagères séquencées appartiennent aux espèces déjà décrites telles que *B. aurantiacum*, *B. anticum*, *B. linens* et *B. casei*, mais aussi à des espèces qui restent à décrire, comme dans le cas des souches *Brevibacterium* sp. Mu109 et 239c. Il serait intéressant d'étudier ces nouvelles espèces. De plus, certaines souches fromagères sont relativement proches de souches isolées d'autres habitats, ce qui suggère une adaptation récente à l'environnement fromager. L'analyse du pan-génome (c'est-à-dire, la gamme complète de gènes présents dans une espèce donnée) de l'espèce *B. aurantiacum*, considérée comme l'espèce de *Brevibacterium* la plus fréquemment trouvée dans des fromages à pâte molle [509], a montré une grande diversité intra-spécifique. En effet, parmi un pan-génome de 5988 gènes, seulement 2684 gènes sont conservés chez les 5 souches de *B. aurantiacum* étudiées. Nous avons également identifié un prophage complet dans le génome de la souche fromagère *Brevibacterium* sp. Mu109, ce qui suggère que

Brevibacterium pourrait subir des attaques de phages dans le fromage. À notre connaissance, un tel phénomène n'a jamais été décrit. Il serait donc intéressant dans de prochaines études d'étudier l'impact des phages sur la croissance et l'activité de souches de *Brevibacterium* et des ferments qui en contiennent.

La reconstruction des voies métaboliques prédites à partir de la séquence des génomes de *Brevibacterium* a révélé des différences concernant des déterminants génétiques impliqués dans la capacité de croître à la surface du fromage. Parmi ces différences, plusieurs sont corrélées à la phylogénie des souches, qu'elles soient isolées de fromage ou d'autres habitats. C'est notamment le cas des voies de catabolismes de substrats énergétiques présents dans le fromage tels que le galactose, le lactate, l'acétate, l'éthanol, le glycérol et les acides aminés. La capacité de synthétiser des osmoprotecteurs, un facteur important pour la croissance à la surface du fromage car ce dernier subit une étape de salage, est également corrélée à la phylogénie des souches de *Brevibacterium*. De plus, en comparaison des autres *Actinobacteria*, les génomes de *Brevibacterium* codent en moyenne pour plus de transporteurs de betaine/carnitine/choline (BCCT en Anglais pour Betaine/Carnitine/Choline Transporter), de systèmes d'antiport $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$ et de symporteurs Na^+ /soluté (SSS en Anglais pour Sodium Solute Symporter), ce qui pourrait expliquer la forte halotolérance de *Brevibacterium*, certaines souches étant d'ailleurs stimulées par le sel [169]. La sécrétion de triacylglycérol lipase est prédite chez 15 souches de *Brevibacterium*, y compris chez 11 des 12 souches fromagères, ce qui suggère que ces dernières contribuent à la lipolyse des fromages. De plus, les génomes de *Brevibacterium*, notamment la souche fromagère Mu109, ont dans l'ensemble plus de gènes de transport d'acides gras à chaîne courte que les autres *Actinobacteria*. Ceci représente peut-être un caractère utile pour la croissance dans le fromage, car il est connu que les triglycérides dans le lait des ruminants sont riches en acides gras à chaîne courte [250]. Lors de cette étude, nous avons également identifié le gène codant pour une protéase extracellulaire qui avait été précédemment purifiée et caractérisée chez *B. aurantiacum* ATCC 9174 [112]. Ce gène est contigu à un autre gène putatif de protéase extracellulaire, suggérant que ce groupe de deux gènes pourrait avoir un rôle important dans l'activité protéolytique de cette souche. Ce type de groupe de gènes est présent chez 16 souches de *Brevibacterium*. Il serait donc intéressant dans de futures études de mieux le caractériser et d'examiner son rôle pour l'activité protéolytique des souches fromagères de *Brevibacterium*.

Hormis les différences corrélées à la phylogénie, nous avons aussi révélé lors de cette étude des caractéristiques distinctives des souches de *Brevibacterium* qui résultent probablement de transferts horizontaux. La voie de catabolisme du D-galactonate représente une de ces caractéristiques. Un groupe de gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate a été identifié chez 8 souches de *Brevibacterium* et son occurrence n'est pas corrélée à la phylogénie des souches. Chez *Glutamicibacter arilaitensis* Re117, qui est une autre bactérie d'affinage du fromage, il a été suggéré que ces gènes de catabolisme du D-galactonate provenaient d'un transfert horizontal, probablement à partir de *Pseudomonas* [280]. À notre connaissance, la présence du D-galactonate dans le fromage n'a jamais été démontrée. Cependant, il a été proposé que ce composé, qui est absent dans le lait, pourrait être produit *via* l'oxydation du lactose résiduel ou du galactose par des fungi et serait ensuite utilisé comme substrat énergétique par des bactéries du fromage [280]. L'acquisition du fer constitue une autre caractéristique des génomes de *Brevibacterium* faisant intervenir des transferts horizontaux. Le fromage est connu comme un milieu très restreint en fer, et il a été démontré que la disponibilité en fer est un facteur limitant pour la croissance de bactéries aérobies à la surface du fromage [320]. Dans notre étude génomique, nous avons recensé les gènes associés à la production et à l'utilisation de sidérophores chez *Brevibacterium* et mis en évidence des transferts horizontaux pour certains d'entre eux. Des groupes de gènes impliqués dans la biosynthèse de sidérophores de type catécholates ont été identifiés seulement chez deux souches fromagères (*Brevibacterium* sp. Mu109 et *B. aurantiacum* ATCC 9174), et leurs

homologues les plus proches connus à ce jour sont présents chez des microorganismes très éloignés du point de vue phylogénétique tels que des *Streptomyces* ou des bactéries à Gram négatif. De plus, la souche ATCC 9174, comme la plupart des souches de *Brevibacterium*, possède également des gènes de biosynthèse d'un sidérophore de type hydroxamate. Ceci suggère que cette souche est capable de produire deux sidérophores de nature différente. Une telle caractéristique a été décrite chez *Glutamicibacter arilaitensis* Re117, une autre bactérie du fromage, qui possède un groupe de gènes de biosynthèse de sidérophore de type hydroxamate et un autre de type catécholate, ce dernier étant issu d'un transfert horizontal [280]. La capacité de produire et d'utiliser des sidérophores de type hydroxamate a été montrée *in vitro* chez certaines souches de *Brevibacterium* [343]. Il pourrait être intéressant dans de prochaines études d'examiner la production et l'utilisation de sidérophores de type catécholate chez *Brevibacterium* et de voir si ceci a un impact sur la capacité à croître dans le fromage. Lors de cette étude, des transferts horizontaux concernant des gènes de transport de sidérophores, notamment des composants d'ABC transporteurs de complexes fer-sidérophores, ont été identifiés chez différentes souches fromagères de *Brevibacterium*. Nous avons déterminé quatre îlots génomiques contenant des gènes de transport et d'utilisation de sidérophores partagés entre des souches fromagères de *Brevibacterium* et des bactéries d'affinage appartenant à d'autres genres tels que *Glutamicibacter*, *Microbacterium* et *Corynebacterium*. Un de ces îlots correspond à l'îlot ActinoRUSTI récemment décrit et détecté dans plusieurs génomes et métagénomes fromagers [510]. Ainsi, par une approche de génomique comparative, notre étude a confirmé le rôle majeur du métabolisme du fer chez des bactéries d'affinage du fromage.

Ce travail a également montré la prévalence de transferts horizontaux de gènes de biosynthèse de bactériocines chez des souches fromagères de *Brevibacterium*. En effet, hormis le gène codant pour une bactériocine de la famille de la linocine M18 détecté chez plusieurs souches de *Brevibacterium* (15/23 souches), la majorité des autres groupes de gènes de biosynthèse de bactériocines ont été identifiés dans le génome des souches d'origine fromagère. Plusieurs de ces groupes de gènes correspondent à des transferts horizontaux, et l'un de ceux-ci est situé dans un transposon conjugatif d'environ 96 kb que nous avons nommé BreLI (pour *Brevibacterium* Lanthipeptide Island). Ce transposon, qui comporte des gènes codant pour un lanthipeptide de classe III, a été retrouvé dans des souches de *Brevibacterium* d'origine fromagère, mais aussi dans une souche fromagère du genre *Corynebacterium*. Dans de prochaines études, il serait intéressant d'étudier l'expression et la régulation de ces gènes de biosynthèse de bactériocines, ainsi que leur spectre d'activité. Ces informations pourraient servir pour la conception des ferments d'affinage ayant une meilleure compétitivité par rapport à des bactéries adventices ou par rapport à des bactéries d'altération et/ou pathogènes.

En résumé, l'analyse comparative des génomes de *Brevibacterium* a permis de mettre en évidence des déterminants génétiques responsables de l'adaptation au milieu fromager. De nombreuses caractéristiques distinctives des souches de *Brevibacterium* peuvent être expliquées, soit par leur position phylogénétique, soit par des événements de transferts horizontaux. De plus, parmi ces caractéristiques, certaines pourraient être à l'origine d'interactions biotiques dans le fromage, par exemple pour ce qui concerne la sécrétion de protéases et de lipases, l'acquisition du fer ou la production de bactériocines. Il est donc intéressant de mieux connaître les phénomènes d'interactions de *Brevibacterium* avec d'autres microorganismes des fromages.

L'étude fonctionnelle des interactions entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei* dans des fromages modèles révèle des mécanismes à l'origine de relations mutualistes entre ces bactéries.

La manipulation des communautés microbiennes reconstituées représente une approche utile pour répondre à des questions fondamentales d'écologie microbienne telles que les mécanismes d'assemblage des espèces et les processus qui influent sur leurs distributions, leurs abondances et leurs interactions [511]. Nous avons entrepris cette démarche pour mener une étude fonctionnelle des interactions biotiques entre différentes souches de *Brevibacterium* d'origine fromagère et *Hafnia alvei*, une bactérie qui est présente à la surface de certains fromages et dont des souches sont commercialisées en tant que ferment d'affinage. Dans ce but, nous avons développé un nouveau modèle de mini-fromage, qui est relativement proche des conditions réelles pour la croissance des microorganismes dans le fromage pendant l'affinage, plutôt représentatif de la surface du fromage du fait de sa faible épaisseur, et permettant de réaliser en même temps un grand nombre d'essais en conditions aseptiques. La levure *Debaryomyces hansenii* a été utilisée pour la désacidification du caillé, ce qui permet ensuite l'implantation des bactéries d'affinage acido-sensibles. Cette succession levures-bactéries a été bien documentée dans les fromages à pâte molle [7]. En utilisant ce modèle fromager, et en combinant des analyses microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques, nous avons pu révéler différents phénomènes d'interaction impliquant *Brevibacterium* et *H. alvei*, ce qui ouvre des perspectives pour mieux maîtriser ces bactéries d'intérêt technologique dans la fabrication fromagère.

Les tests de croissance dans les fromages modèles contenant différentes souches de *Brevibacterium* ont montré que celles-ci participaient à la désacidification du fromage. Il semble que cette désacidification a été initiée par la levure *D. hansenii*, puis complétée par *Brevibacterium*, via la consommation du lactate et la formation des métabolites alcalins tels que l'ammoniac lors du catabolisme des acides aminés. Nous avons aussi noté que dans certains cas, la présence de *Brevibacterium* pouvait diminuer la population de *D. hansenii* en fin de l'affinage. Il serait possible que cette inhibition de *D. hansenii* par *Brevibacterium* soit due au pH plus élevé, et il serait intéressant dans de prochains travaux d'étudier ce phénomène.

Concernant les interactions entre *Brevibacterium* et *H. alvei*, nous avons observé une forte stimulation de certaines souches de *Brevibacterium* par *H. alvei*, alors même que les niveaux de population atteints par *H. alvei* dans les fromages modèles étaient beaucoup plus faibles que ceux de *Brevibacterium*. De plus, *H. alvei* était stimulé dans la plupart des associations avec *Brevibacterium*. Cette co-stimulation entre certaines souches de *Brevibacterium* et *H. alvei* constitue une piste intéressante pour l'amélioration des ferments d'affinage. Une étude transcriptomique a été ensuite menée pour décortiquer des mécanismes sous-jacents à ce phénomène. Nous avons utilisé l'approche de "dual RNA-seq", une approche relativement nouvelle issue des progrès du séquençage à haut débit, qui consiste à séquencer et analyser simultanément les transcriptomes de toutes les espèces en interaction, permettant ainsi d'avoir une vue plus complète des interactions interspécifiques [503]. Deux souches de l'espèce *B. aurantiacum* qui présentaient des comportements différents par rapport à *H. alvei* ont été sélectionnées pour ces études : la souche 8(6), stimulée par *H. alvei*, et la souche ATCC 9175^T, qui ne l'était pas. De son côté, *H. alvei* était stimulée par les deux souches de *Brevibacterium*. L'interaction entre *B. aurantiacum* 8(6) et *H. alvei* est donc de type mutualiste, puisque les deux partenaires sont bénéficiaires de l'interaction. De plus, le fait que les deux souches de *Brevibacterium* étudiées appartiennent à la même espèce (*B. aurantiacum*) et qu'elles sont très proches du point de vue phylogénétique, avec une identité nucléotidique moyenne de 99,74%, nous a permis de comparer des niveaux d'expression entre leurs gènes orthologues (et pas uniquement d'analyser l'expression différentielle des gènes

d'une souche donnée dans des conditions différentes), et ainsi mieux caractériser leur comportement dans les fromages modèles. Les analyses transcriptomiques par RNA-seq ont suggéré différents mécanismes moléculaires sous-jacents aux interactions entre *Brevibacterium* et *H. alvei*, qui concernent notamment l'acquisition du fer, la protéolyse, la lipolyse, le métabolisme soufré et le catabolisme du D-galactonate.

Les analyses transcriptomiques tendaient à montrer que l'acquisition du fer avait un rôle important dans l'interaction souche-dépendante entre *Brevibacterium* et *H. alvei*. En effet, les deux souches *B. aurantiacum* 8(6) et *B. aurantiacum* ATCC 9175^T possèdent un groupe de gènes orthologues codant pour la biosynthèse de sidérophore, mais en absence de *H. alvei* ce dernier était beaucoup moins exprimé chez 8(6) que chez ATCC 9175^T. De plus, l'expression du gène codant pour la ferritine, responsable du stockage du fer, était également plus basse chez 8(6) que chez ATCC 9175^T. Ceci nous a donc permis d'émettre l'hypothèse qu'en absence de *H. alvei*, la plus faible croissance de la souche 8(6) par rapport à la souche ATCC 9175^T serait due à une plus faible disponibilité en fer, résultant d'une moindre expression des gènes de biosynthèse de sidérophore chez 8(6). La cause de cette différence d'expression reste à déterminer. En associant *B. aurantiacum* 8(6) et *H. alvei* dans des fromages modèles, nous avons observé une induction du gène codant pour la ferritine, ainsi qu'une répression de la plupart des gènes impliqués dans l'acquisition du fer chez la souche 8(6), ce qui suggère une meilleure disponibilité en fer pour cette souche lorsqu'elle se développe en présence de *H. alvei*. Ceci est probablement dû à la production de sidérophore par *H. alvei*, dont nous avons identifié un groupe de gène de biosynthèse de sidérophore de type hydroxamate. L'utilisation de xénosidérophores (c'est-à-dire des sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes) a été décrite chez plusieurs microorganismes. Cette stratégie, souvent qualifiée "de triche", permet à des microorganismes de capter du fer sans avoir besoin d'assurer le coût énergétique élevé de production de sidérophores [512]. Il pourrait s'agir d'une adaptation de certaines souches de *Brevibacterium* à des environnements où d'autres souches produisent suffisamment de sidérophores. Dans la littérature, il a été décrit que la présence des "tricheurs" pouvait conduire à une réduction de compétitivité pour les "coopérateurs", c'est-à-dire des souches productrices des sidérophores [513]. Il est intéressant de noter que la présence de *B. aurantiacum* 8(6) n'a pas modifié l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer chez *H. alvei*, ce qui suggère que la disponibilité en fer pour ce dernier n'a pas diminuée du fait de la présence de *B. aurantiacum* 8(6). De plus, malgré l'utilisation probable par la souche 8(6) de sidérophores produits par *H. alvei*, cette dernière était stimulée par la souche 8(6). Contrairement à *B. aurantiacum* 8(6), l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition et le stockage du fer chez *B. aurantiacum* ATCC 9175^T n'a pas été modifiée par la présence de *H. alvei*, ce qui pourrait être dû au fait que la souche ATCC 9175^T ne dispose peut-être pas des gènes nécessaires au transport des sidérophores produits par *H. alvei*, et/ou qu'elle produit elle-même suffisamment de sidérophores pour sa croissance dans les fromages modèles. Dans un travail récent, en utilisant des communautés microbiennes reconstituées de souches fromagères, Kastman et coll. [341] a observé une stimulation spécifique de la bactérie *Staphylococcus equorum* par le champignon *Scopulariopsis*, ce qui a été attribué à l'augmentation de la disponibilité en fer pour *S. equorum* par la production de sidérophores par *Scopulariopsis*. Ici, nous proposons que la capacité de produire et d'utiliser des sidérophores chez *Brevibacterium* représente probablement le mécanisme sous-jacent à la stimulation souche-spécifique de *Brevibacterium* par *H. alvei*. Il serait donc possible que l'acquisition du fer soit un des mécanismes clés de l'assemblage des espèces dans les communautés microbiennes fromagères. Une perspective de recherche intéressante serait d'étudier plus largement les capacités des microorganismes du fromage de synthétiser et d'utiliser des sidérophores, ce qui permettra peut-être une conception plus raisonnée des mélanges de souches dans les ferments d'affinage.

Notre travail a montré que les activités protéolytiques et lipolytiques de *Brevibacterium* contribuaient probablement à la stimulation de *H. alvei* par *Brevibacterium*. En effet, des données transcriptomiques ont indiqué qu'en présence de *B. aurantiacum* 8(6) ou ATCC 9175^T, *H. alvei* induisait l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme de certains acides aminés et du glycérol, ces composés étant issus de la dégradation des caséines et des triglycérides. Ceci est en concordance avec des tests de protéolyse et de lipolyse sur milieux gélosés, où aucune activité protéolytique et lipolytique n'a été détectée chez *H. alvei* à 15°C (température de l'affinage), contrairement aux deux souches de *Brevibacterium*. De plus, nous avons identifié chez *H. alvei* deux gènes putatifs codant pour l'activité méthionine γ -lyase (MGL, EC 4.4.1.11) et dont les expressions étaient fortement induites en présence de *B. aurantiacum* 8(6) ou ATCC 9175^T. Le méthanthiol (MTL) issu de la dégradation de la méthionine par la MGL est connu comme étant le précurseur commun de plusieurs composés soufrés volatils (CSVs) contribuant à l'arôme caractéristique de fromages affinés [176]. Il a été montré dans un fromage modèle de type Livarot que la présence de *H. alvei* augmentait la production des CSVs, mais le mécanisme de ce phénomène était inconnu [29]. Compte tenu des résultats de la présente étude, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la production des CSVs par *H. alvei* à partir de la méthionine est stimulée par des activités protéolytiques des autres microorganismes présents dans le fromage. Une étude systématique des associations de *H. alvei* avec d'autres microorganismes protéolytiques dans des ferments d'affinage pourrait être envisagée pour élaborer un catalogue des profils organoleptiques générés. Ceci ouvre des perspectives pour mieux maîtriser la production de composés soufrés volatils dans les fromages.

Nos données transcriptomiques ont également mis en évidence des phénomènes d'interaction biotique au niveau du métabolisme du soufre. En absence de *H. alvei*, des gènes impliqués dans l'assimilation du soufre et dans la biosynthèse des acides aminés soufrés étaient plus exprimés chez la souche *B. aurantiacum* 8(6) que la souche *B. aurantiacum* ATCC 9175^T, ce qui suggère une moindre disponibilité en acides aminés soufrés chez 8(6) par rapport à ATCC 9175^T. La présence de *H. alvei* réprimait l'expression de ces gènes chez la souche 8(6) mais ne présentait pas d'impact sur la souche ATCC 9175^T. Il est intéressant de noter que cet effet souche-spécifique de *H. alvei* sur *Brevibacterium* avait été également observé pour des gènes impliqués dans l'acquisition du fer, comme discuté précédemment. À l'heure actuelle, nous ne savons pas s'il existe un lien métabolique entre la disponibilité en fer et la disponibilité en acides aminés soufrés chez les microorganismes qui se développent dans le fromage. Nous supposons que la faible croissance de la souche 8(6) dans les fromages modèles en absence de *H. alvei*, probablement due à une faible disponibilité en fer, limiterait également la quantité de protéases sécrétées dans le fromage, entraînant ainsi une faible disponibilité en acides aminés soufrés. Il serait intéressant dans de prochaines études d'examiner ce phénomène chez un plus grand nombre de souches de *Brevibacterium*, par exemple *via* des analyses par RT-PCR quantitative où l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer et dans le métabolisme du soufre serait mesurée dans des fromages modèles où l'on fait varier la disponibilité en fer.

Notre travail a aussi permis de montrer que les gènes impliqués dans le catabolisme du D-galactonate chez *B. aurantiacum* 8(6) et *H. alvei* (les deux souches où ces gènes sont présents) étaient exprimés lors de leur croissance dans les fromages modèles et qu'ils y étaient soumis à une régulation transcriptionnelle. Il est possible que du D-galactonate ait été produit par la levure *D. hansenii* dans les fromages modèles et ensuite utilisé par ces bactéries comme substrat énergétique. Il serait intéressant d'effectuer des études complémentaires pour vérifier cette hypothèse.

Pour résumer, en couplant des analyses microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques, notre étude fonctionnelle des interactions biotiques entre *Brevibacterium* et *H. alvei* dans les fromages modèles a permis de révéler l'existence de différents mécanismes

d'interaction entre ces bactéries. Nous avons mis en évidence une relation de type mutualiste entre certaines souches de *Brevibacterium* et *H. alvei*, dans laquelle *H. alvei* sécrète des sidérophores qui sont utilisés par *Brevibacterium* pour capter le fer plus efficacement, stimulant ainsi leur croissance, et en contrepartie *Brevibacterium* sécrète des lipases et des protéases qui dégradent les caséines et triglycérides du fromage en constituants énergétiques favorisant la croissance de *H. alvei*. Ce type d'interaction est intéressant à considérer pour la formulation des ferments d'affinage car il en résulte une meilleure capacité de tous les partenaires à coloniser le fromage, et ainsi à générer les propriétés technologiques recherchées.

En conclusion, ce travail de thèse, *via* le modèle de *Brevibacterium* et par une approche intégrative d'analyses génomiques et transcriptomiques, a permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'adaptation microbienne au milieu fromager, ainsi que des interactions microbiennes dans cet environnement. Notre étude se trouve parmi les premières à démontrer la faisabilité et l'intérêt du séquençage simultané des transcriptomes (dual RNA-seq) pour caractériser des interactions microbiennes dans le milieu fromager. Notre travail a souligné le rôle du fer comme un élément central qui module le développement des microorganismes et leurs interactions dans le fromage. La production des bactériocines par *Brevibacterium*, déduite des analyses génomiques, reste un phénomène d'interaction intéressant à valider et à éventuellement à exploiter. Compte tenu de la diversité des fromages et des microorganismes qui s'y développent, il est certain que de nombreux autres phénomènes d'adaptation et d'interaction entre microorganismes fromagers restent à découvrir. Une approche intégrative des données -omiques, qui comprennent la (méta)génomique, la (méta)transcriptomique, mais aussi la métabolomique, est prometteuse pour l'étude du fonctionnement des communautés microbiennes fromagères ainsi que pour des applications en terme de développement de ferments d'affinage.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

1. Fox PF, McSweeney PLH. Cheese: An Overview. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 5–21.
2. Almena-Aliste M, Mietton B. Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. In: Donnelly CW, editor. *Cheese and Microbes*. Washington, DC: ASM Press; 2014. p. 39–71.
3. FAO/WHO. General standard for cheese. In: *Codex Alimentarius*. 1978. http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCODEX%2B283-1978%252FCXS_283e.pdf. Accessed 14 Aug 2018.
4. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Overview of Cheese Manufacture. In: Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH, editors. *Fundamentals of Cheese Science*. Boston, MA: Springer; 2017. p. 11–25.
5. Bertrand F. Cheese, the masterpiece of microbes [study of the whole of cheese manufacture, nature and action of main micro-organisms]. *Rev Gen Froid Fr*. 1988.
6. Lenoir J, Lamberet G, Schmidt JL, Tourneur C. La maîtrise du bioréacteur fromage. *Biofutur*. 1985;:23–50.
7. Irlinger F, Mounier J, Vallaeyts T, Monnet C, Landaud S, Helinck S, et al. Bactéries et champignons des fromages: Un travail d'équipe exemplaire. *Biofutur*. 2007;:24–7.
8. Montel M-C, Buchin S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuitton DA, Desmasures N, et al. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int J Food Microbiol*. 2014;177:136–54.
9. Irlinger F, Layec S, Hélinck S, Dugat-Bony E. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:1–11.
10. Fleet GH. Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol*. 1990;68:199–211.
11. Fröhlich-Wyder M-T. Yeasts in dairy products. In: Boekhout T, Robert V, editors. *Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects*. Hamburg: Behr's Verlag; 2003. p. 209–37.
12. Corsetti A, Rossi J, Gobbetti M. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Int J Food Microbiol*. 2001;69:1–10.
13. Vassal L, Monnet V, Le Bars D, Roux C, Gripon JC. Relation entre le pH, la composition chimique et la texture des fromages de type Camembert. *Lait*. 1986;66:341–51.
14. Gripon J-C. Flavour and texture in soft cheese. In: Law BA, editor. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. Boston, MA: Springer; 1997. p. 193–206.

15. Le Graet Y, Brule G, Maubois J-L, Oeuvarard G. Répartition et évolution des éléments minéraux au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite type Beaufort. *Lait*. 1986;66:391–404.
16. Jakobsen M, Narvhus J. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy J*. 1996;6:755–68.
17. Spinnler H-E, Berger C, Lapadatescu C, Bonnarme P. Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *Int Dairy J*. 2001;11:245–52.
18. Fatichenti F, Bergere JL, Deiana P, Farris GA. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. *J Dairy Res*. 1983;50:449–57.
19. Deiana P, Fatichenti F, Farris GA, Mocquot G, Lodi R, Todesco R, et al. Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. *Lait*. 1984;64:380–94.
20. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J*. 2001;11:259–74.
21. Moreau C. Nomenclature des *Penicillium* utiles à la préparation du Camembert. *Lait*. 1979;59:219–33.
22. Moreau C. Le *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, intérêt en industrie fromagère, mycotoxines. (Révision bibliographique). *Lait*. 1980;60:254–71.
23. Halász A. Lactic acid bacteria. In: Lasztity R, editor. *Food Quality and Standards*. Oxford: Eolss Publishers; 2009. p. 70–82.
24. Parente E, Cogan TM, Powell IB. Starter Cultures: General Aspects. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 201–26.
25. Urbach G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *Int Dairy J*. 1995;5:877–903.
26. Bergère JL, Tourneur C. Les bactéries de surface des fromages. *Groupes Microbiens D'intérêt Lait CEPIL Paris*. 1992;:127–63.
27. Brennan NM, Cogan TM, Loessner M, Scherer S. Bacterial surface-ripened cheeses. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. London: Academic Press; 2004. p. 199–225.
28. Mounier J, Gelsomino R, Goerges S, Vancanneyt M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, et al. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:6489–500.
29. Irlinger F, Yung SAYI, Sarthou A-S, Delbès-Paus C, Montel M-C, Coton E, et al. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *Int J Food Microbiol*. 2012;153:332–8.
30. Morales P, Fernández-García E, Nuñez M. Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Lett Appl Microbiol*. 2003;37:410–4.

31. Chaves-López C, De Angelis M, Martuscelli M, Serio A, Paparella A, Suzzi G. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J Appl Microbiol*. 2006;101:353–60.
32. Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, Dutton RJ. Cheese rind communities provide tractable systems for *in situ* and *in vitro* studies of microbial diversity. *Cell*. 2014;158:422–33.
33. Janda JM, Abbott SL. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:12–28.
34. Sakazaki R. *Hafnia*. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo ME, Chun J, DeVos P, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2015.
35. Wertz JE, Riley MA. Chimeric Nature of Two Plasmids of *Hafnia alvei* Encoding the Bacteriocins Alveicins A and B. *J Bacteriol*. 2004;186:1598–605.
36. Mourgues R, Vassal L, Auclair J, Mocquot G, Vandeweghe J. Origine et développement des bactéries coliformes dans les fromages à pâte molle. *Lait*. 1977;57:131–49.
37. Richard J, Zadi H. Inventaire de la flore bactérienne dominante des Camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait*. 1983;63:25–42.
38. Mounier J, Monnet C, Jacques N, Antoinette A, Irlinger F. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int J Food Microbiol*. 2009;133:31–7.
39. Coton M, Delbès-Paus C, Irlinger F, Desmasures N, Le Fleche A, Stahl V, et al. Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol*. 2012;29:88–98.
40. Chataud J, Martin V, Prigent J-R. Composition pour l'aromatisation de fromages. 2003. <https://patents.google.com/patent/EP1056350B1/en?q=European+Patent+EP1056350>. Accessed 13 Aug 2018.
41. Dainty RH, Edwards RA, Hibbard CM, Marnewick JJ. Volatile compounds associated with microbial growth on normal and high pH beef stored at chill temperatures. *J Appl Bacteriol*. 1989;66:281–9.
42. Delbès-Paus C, Pochet S, Helinck S, Veisseire P, Bord C, Lebecque A, et al. Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese. *Food Microbiol*. 2012;30:74–82.
43. Marino M, Maifreni M, Moret S, Rondinini G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Lett Appl Microbiol*. 2001;31:169–73.
44. Delbès-Paus C, Miszczucha S, Ganet S, Helinck S, Veisseire P, Pochet S, et al. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. *Int J Food Microbiol*. 2013;160:212–8.
45. Callon C, Arliguie C, Montel M-C. Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. *Food Microbiol*. 2016;53:63–70.

46. Baird-Parker AC. The staphylococci: an introduction. *J Appl Bacteriol.* 1990;69:1S-8S.
47. Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes.* New York: Springer; 2009.
48. Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol.* 2008;126:302–10.
49. Bockelmann W, Krusch U, Engel G, Klijn N, Smit G, Heller KJ. The microflora of Tilsit cheese. I. Variability of the smear flora. *Nahr-Food.* 1997;41:208–12.
50. Brennan NM, Ward AC, Beresford TP, Fox PF, Goodfellow M, Cogan TM. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:820–30.
51. Curtin AC, Gobbetti M, McSweeney PLH. Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese. *Int J Food Microbiol.* 2002;76:231–40.
52. Ruaro A, Andrighetto C, Torriani S, Lombardi A. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Microbiol.* 2013;34:106–11.
53. Jensen HL. The Coryneform Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 1952;6:77–90.
54. Cure GL, Keddie RM. Methods for the morphological examination of aerobic coryneform bacteria. In: Board RG, Lovelock DW, editors. *Sampling–microbiological monitoring of environments.* London: Academic Press; 1973. p. 123–35.
55. Denis C, Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2008;126:311–5.
56. Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:479–91.
57. Busse H-J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:9–37.
58. Bockelmann W, Hoppe-Seyler T. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int Dairy J.* 2001;11:307–14.
59. Dufossé L, Galaup P, Carlet E, Flamin C, Valla A. Spectrocolorimetry in the CIE L*a*b* color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. *Food Res Int.* 2005;38:919–24.
60. Landaud S, Helinck S, Bonnarme P. Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;77:1191–205.

61. Irlinger F, Bimet F, Delettre J, Lefevre M, Grimont PAD. *Arthrobacter bergerei* sp. nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005;55:457–62.
62. Brennan NM, Brown R, Goodfellow M, Ward AC, Beresford TP, Simpson PJ, et al. *Corynebacterium mooreparkense* sp. nov. and *Corynebacterium casei* sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:843–52.
63. Brennan NM, Brown R, Goodfellow M, Ward AC, Beresford TP, Vancanneyt M, et al. *Microbacterium gubbeenense* sp. nov., from the surface of a smear-ripened cheese. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1969–76.
64. Gavrish EY, Krauzova VI, Potekhina NV, Karasev SG, Plotnikova EG, Altyntseva OV, et al. Three new species of brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp nov., and *Brevibacterium permense* sp nov. *Microbiology.* 2004;73:176–83.
65. Boyaval P, Desmazeaud MJ. Le point des connaissances sur *Brevibacterium linens*. *Lait.* 1983;63:187–216.
66. Forquin-Gomez M-P, Weimer BC, Sorieul L, Kalinowski J, Vallaeyts T. The Family *Brevibacteriaceae*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F, editors. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. p. 141–53.
67. Trujillo ME, Goodfellow M. *Brevibacterium*. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo ME, Chun J, DeVos P, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2015.
68. Trujillo ME, Goodfellow M. Genus I. *Brevibacterium* Breed 1953a. 13AL emend. Collins, Jones, Keddie and Sneath 1980. In: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Ludwig W, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. New York: Springer; 2012. p. 685–700.
69. Mulder EG, Adamse AD, Antheunisse J, Deinema MH, Woldendorp JW, Zevenhuizen LPTM. The Relationship between *Brevibacterium linens* and Bacteria of the Genus *Arthrobacter*. *J Appl Bacteriol.* 1966;29:44–71.
70. Crombach WHJ. Morphology and physiology of coryneform bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1974;40:361–76.
71. Famelart M-H, Bouillanne C, Kobilinsky A, Desmazeaud M. Studies on *Brevibacterium linens* metabolism in fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1987;26:378–382.
72. Goodfellow M, Trujillo ME. *Brevibacteriaceae*. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo ME, Chun J, DeVos P, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2015.
73. Lee SD. *Spelaicoccus albus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from a natural cave. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:3958–63.
74. Zhang G, Wang S, Wang L. *Sediminivirga luteola* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Brevibacteriaceae*, isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:1494–8.

75. Breed RS. The *Brevibacteriaceae* fam. nov. of order Eubacteriales. Riassunti Delle Communi VI Congr Internazionale Microbiol Roma. 1953;1:13–4.
76. Jones D, Keddle RM. Genus *Brevibacterium*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins; 1986. p. 1301–13.
77. Bernard KA, Wiebe D, Burdz T, Reimer A, Ng B, Singh C, et al. Assignment of *Brevibacterium stationis* (ZoBell and Upham 1944) Breed 1953 to the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium stationis* comb. nov., and emended description of the genus *Corynebacterium* to include isolates that can alkalize citrate. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60:874–9.
78. Tang S-K, Wang Y, Schumann P, Stackebrandt E, Lou K, Jiang C-L, et al. *Brevibacterium album* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58:574–7.
79. Kim J, Srinivasan S, You T, Bang JJ, Park S, Lee S-S. *Brevibacterium ammoniilyticum* sp. nov., an ammonia-degrading bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63:1111–8.
80. Pascual C, Collins MD. *Brevibacterium avium* sp. nov., isolated from poultry. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1999;49:1527–30.
81. Collins MD, Farrow JAE, Goodfellow M, Minnikin DE. *Brevibacterium casei* sp. nov. and *Brevibacterium epidermidis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol*. 1983;4:388–95.
82. Ivanova EP, Christen R, Alexeeva YV, Zhukova NV, Gorshkova NM, Lysenko AM, et al. *Brevibacterium celere* sp. nov., isolated from degraded thallus of a brown alga. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:2107–11.
83. Cui Y, Kang M-S, Woo S-G, Jin L, Kim KK, Park J, et al. *Brevibacterium daeguense* sp. nov., a nitrate-reducing bacterium isolated from a 4-chlorophenol enrichment culture. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63:152–7.
84. Collins MD, Jones D, Keddle RM, Sneath PHA. Reclassification of *Chromobacterium iodinum* (Davis) in a Redefined Genus *Brevibacterium* (Breed) as *Brevibacterium iodinum* nom. rev.; comb. nov. *Microbiology*. 1980;120:1–10.
85. Choi EJ, Lee SH, Jung JY, Jeon CO. *Brevibacterium jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63:3430–6.
86. Wauters G, Avesani V, Laffineur K, Charlier J, Janssens M, Van Bosterhaut B, et al. *Brevibacterium lutescens* sp. nov., from human and environmental samples. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:1321–5.
87. Lee SD. *Brevibacterium marinum* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58:500–4.
88. McBride ME, Ellner KM, Black HS, Clarridge JE, Wolf JE. A new *Brevibacterium* sp. isolated from infected genital hair of patients with white piedra. *J Med Microbiol*. 1993;39:255–61.

89. Bhadra B, Raghukumar C, Pindi PK, Shivaji S. *Brevibacterium oceani* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58:57–60.
90. Pascual C, Collins MD, Funke G, Pitcher DG. Phenotypic and genotypic characterisation of two *Brevibacterium* strains from the human ear: description of *Brevibacterium otitidis* sp. nov. *Med Microbiol Lett.* 1996;5:113–23.
91. Wauters G, Charlier J, Janssens M, Delmée M. *Brevibacterium paucivorans* sp. nov., from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51:1703–7.
92. Heyrman J, Verbeeren J, Schumann P, Devos J, Swings J, De Vos P. *Brevibacterium picturae* sp. nov., isolated from a damaged mural painting at the Saint-Catherine chapel (Castle Herberstein, Austria). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:1537–41.
93. Katı H, Ince IA, Demir I, Demirbağ Z. *Brevibacterium pityocampae* sp. nov., isolated from caterpillars of *Thaumetopoea pityocampa* (Lepidoptera, Thaumetopoeidae). *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:312–6.
94. Mages IS, Frodl R, Bernard KA, Funke G. Identities of *Arthrobacter* spp. and *Arthrobacter*-Like Bacteria Encountered in Human Clinical Specimens. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2980–6.
95. Guan T-W, Zhao K, Xiao J, Liu Y, Xia Z-F, Zhang X-P, et al. *Brevibacterium salitolerans* sp. nov., an actinobacterium isolated from salt-lake sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2991–5.
96. Lee SD. *Brevibacterium samyangense* sp. nov., an actinomycete isolated from a beach sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:1889–92.
97. Kämpfer P, Schäfer J, Lodders N, Busse H-J. *Brevibacterium sandarakinum* sp. nov., isolated from a wall of an indoor environment. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:909–13.
98. Wauters G, Haase G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Van Broeck J, et al. Identification of a Novel *Brevibacterium* Species Isolated from Humans and Description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2829–32.
99. Chen P, Zhang L, Wang J, Ruan J, Han X, Huang Y. *Brevibacterium sediminis* sp. nov., isolated from deep-sea sediments from the Carlsberg and Southwest Indian Ridges. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:5268–74.
100. Kokcha S, Ramasamy D, Lagier J-C, Robert C, Raoult D, Fournier P-E. Non-contiguous finished genome sequence and description of *Brevibacterium senegalense* sp. nov. *Stand Genomic Sci.* 2012;7:233–45.
101. Kumar A, Ince İA, Katı A, Chakraborty R. *Brevibacterium siliguriense* sp. nov., a facultatively oligotrophic bacterium isolated from river water. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:511–5.
102. Tonouchi A, Kitamura K, Fujita T. *Brevibacterium yomogidense* sp. nov., isolated from a soil conditioner made from poultry manure. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:516–20.
103. Parte AC. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D613–6.

104. Bernard KA, Pacheco AL, Burdz T, Wiebe D, Huynh C, Bonner C, et al. *Brevibacterium massiliense* (Roux and Raoult 2009) is a later heterotypic synonym of *Brevibacterium ravensturnense* (Mages, Frodl, Bernard and Funke 2009), using whole-genome sequence analysis as a comparative tool. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016;66:4440–4.
105. Cogan TM. Bacteria, Beneficial | *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium aurantiacum* and Other Smear Microorganisms. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH, editors. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, CA: Academic Press; 2011. p. 395–400.
106. Marcellino N, Benson DR. The good, the bad and the ugly: tales of mold-ripened cheese. In: Donnelly CW, editor. *Cheese and Microbes*. Washington, DC: ASM Press; 2014.
107. Albert JO, Long HF, Hammer BW. Classification of the organisms important in dairy products IV. *Bacterium linens*. *Res Bull Iowa Agric Home Econ Exp Stn.* 1944;27:1.
108. Foissy H. Examination of *Brevibacterium linens* by an electrophoretic zymogram technique. *Microbiology.* 1974;80:197–205.
109. Frings E, Holtz C, Kunz B. Studies about casein degradation by *Brevibacterium linens*. *Milchwissenschaft.* 1993.
110. Coskun H, Sienkiewicz T. Degradation of milk proteins by extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* flk-61. *Food Biotechnol.* 1999;13:267–75.
111. Clancy M, O’Sullivan M. Partial Purification and Characterisation of a Proteinase from *Brevibacterium linens*. *Ir J Agric Food Res.* 1993;32:185–94.
112. Rattray FP, Bockelmann W, Fox PF. Purification and Characterization of an Extracellular Proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3454–6.
113. Rattray FP, Fox PF, Healy A. Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine alpha s1-casein. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:501–6.
114. Rattray FP, Fox PF, Healy A. Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine beta-casein. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2468–71.
115. Tomaschova J, Buchinger W, Hampel W, Zemanovic J. Purification and characterization of extracellular proteinase produced by *Brevibacterium linens* ATCC 9172. *Food Chem.* 1998;63:499–503.
116. Friedman ME, Nelson WO, Wood WA. Proteolytic Enzymes from *Bacterium linens*. *J Dairy Sci.* 1953;36:1124–34.
117. Tokita F, Hosono A. Studies on the extracellular protease produced by *Brevibacterium linens*. I. Production and some properties of the extracellular protease. *Jpn J Zootech Sci.* 1972.
118. Zemanovic J, Skárka B. Culture media for extracellular proteinases production by *Brevibacterium linens*. In: Neijssel OM, van der Meer RR, Luyben KCAM, editors. *Proceedings, 4th European Congress on Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 541–4.

119. Hayashi K, Cliffe AJ, Law BA. Culture conditions of *Brevibacterium linens* for production of proteolytic enzymes. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 1990;37:737–9.
120. Strauss S, Kopetcky A, Zemanovic J, Hampel WA. Production of Proteases from *Brevibacterium linens*. *Biocatalysis*. 1994;10:317–23.
121. Shabbiri K, Adnan A, Jamil S, Ahmad W, Noor B, Rafique HM. Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using statistical approach. *Braz J Microbiol*. 2012;43:1051–61.
122. Foissy H. Some properties of aminopeptidase from *Brevibacterium linens*. *FEMS Microbiol Lett*. 1978;3:207–10.
123. Brezina P, Musil P, Kopecny J, Plockovč M, Rauch P. Isolation and properties of proteinases and aminopeptidases of *Brevibacterium linens*. *Sci Pap Prague Inst Chem Technol*. 1987;E61:149–60.
124. Hayashi K, Law BA. Purification and characterization of two aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens*. *Microbiology*. 1989;135:2027–34.
125. Rattray FP, Fox PF. Aspects of Enzymology and Biochemical Properties of *Brevibacterium linens* Relevant to Cheese Ripening: A Review. *J Dairy Sci*. 1999;82:891–909.
126. Torgersen H, Sørhaug T. Peptide hydrolases of *Brevibacterium linens*. *FEMS Microbiol Lett*. 1978;4:151–3.
127. Rattray FP, Fox PF. Purification and characterisation of an intracellular aminopeptidase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Lait*. 1997;77:169–80.
128. Ezzat N, El Soda M, El Shafei H, Olson NF. Cell-wall associated peptide hydrolase and esterase activities in several cheese-related bacteria. *Food Chem*. 1993;48:19–23.
129. Buchinger W, Tomaschová J, Zemanovic J, Hampel WA. Autodegradation of the extracellular proteases of *Brevibacterium linens* ATCC 9172. *Food Chem*. 2001;74:61–8.
130. Juhasz O, Škárka B. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens*. *Can J Microbiol*. 1990;36:510–2.
131. Hayashi K, Cliffe AJ, Law BA. Purification and preliminary characterization of five serine proteinases produced by *Brevibacterium linens*. *Int J Food Sci Technol*. 1990;25:180–7.
132. El-Soda M, Macedo A, Olson N. Aminopeptidase and dipeptidylaminopeptidase activities of several cheese related microorganisms. *Milchwissenschaft*. 1991.
133. Fernández J, Mohedano AF, Gaya P, Medina M, Nuñez M. Purification and properties of two intracellular aminopeptidases produced by *Brevibacterium linens* SR3. *Int Dairy J*. 2000;10:241–8.
134. Movsesian S, Vaganova T, Zaïstseva Z, Ovumian R, Timokhina E, Stepanov V. Isolation and properties of intracellular peptidase from *Brevibacterium*. *Biokhimiia*. 1992;57:236–45.

135. Ali YB, Verger R, Abousalham A. Lipases or Esterases: Does It Really Matter? Toward a New Bio-Physico-Chemical Classification. In: Sandoval G, editor. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 31–51.
136. Clemente CLS, Vadehra DV. Instrumental Assay of Microbial Lipase at Constant pH. *Appl Microbiol.* 1967;15:110–3.
137. Sørhaug T, Ordal ZJ. Cell-Bound Lipase and Esterase of *Brevibacterium linens*. *Appl Microbiol.* 1974;27:607–8.
138. El-Shafei H, Ezzat N, El-Soda M. The esterolytic activity of several strains of *Brevibacterium linens*. *Egypt J Dairy Sci.* 1989;17:171–9.
139. Lambrechts C, Galzy P. Esterase Activities of *Brevibacterium* sp. R312 and *Brevibacterium linens* 62. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995;59:1464–71.
140. Adamitsch BF, Hampel WA. Formation of lipolytic enzymes by *Brevibacterium linens*. *Biotechnol Lett.* 2000;22:1643–6.
141. Adamitsch BF, Karner F, Hampel WA. High cell density cultivation of *Brevibacterium linens* and formation of proteinases and lipase. *Biotechnol Lett.* 2003;25:705–8.
142. Weimer B, Dias B, Ummadi M, Broadbent J, Brennand C, Jaegi J, et al. Influence of NaCl and pH on intracellular enzymes that influence Cheddar cheese ripening. *Lait.* 1997;77:383–98.
143. Lambrechts C, Escudero J, Galzy P. Purification and properties of three esterases from *Brevibacterium* sp. R312. *J Appl Bacteriol.* 1995;78:180–8.
144. Rattray FP, Fox PF. Purification and characterization of an intracellular esterase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Int Dairy J.* 1997;7:273–8.
145. Grecz N, Wagenaar RO, Dack GM. Inhibition of *Clostridium botulinum* by culture filtrates of *Brevibacterium linens*. *J Bacteriol.* 1959;78:506–10.
146. Martin F, Friedrich K, Beyer F, Terplan G. Antagonistic effects of strains of *Brevibacterium linens* against *Listeria*. *Arch Leb.* 1995;46:7–11.
147. Kato F, Eguchi Y, Nakano M, Oshima T, Murata A. Purification and Characterization of Linecin-A, a Bacteriocin of *Brevibacterium linens*. *Agric Biol Chem.* 1991;55:161–6.
148. Valdés-Stauber N, Scherer S. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 1994;60:3809–14.
149. Motta AS, Brandelli A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol.* 2002;92:63–70.
150. Maisnier-Patin S, Richard J. Activity and purification of linenscin OC2, an antibacterial substance produced by *Brevibacterium linens* OC2, an orange cheese coryneform bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:1847–52.
151. Boucabeille C, Mengin-Lecreulx D, Henckes G, Simonet J-M, van Heijenoort J. Antibacterial and hemolytic activities of linenscin OC2, a hydrophobic substance produced by *Brevibacterium linens* OC2. *FEMS Microbiol Lett.* 1997;153:295–301.

152. Boucabeille C, Letellier L, Simonet JM, Henckes G. Mode of action of linenscin OC2 against *Listeria innocua*. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:3416–21.
153. Beattie SE, Torrey GS. Toxicity of methanethiol produced by *Brevibacterium linens* toward *Penicillium expansum*. *J Agric Food Chem*. 1986;34:102–4.
154. Lewis BA. A study of the antifungal agent(s) produced by four strains of *Brevibacterium*. The University of Southern Mississippi; 1980.
155. Osman MM. Factors affecting the antifungal properties of *Brevibacterium linens*. *Int Dairy J*. 2004;14:713–22.
156. Ryser ET, Maisnier-Patin S, Gratadoux JJ, Richard J. Isolation and identification of cheese-smear bacteria inhibitory to *Listeria* spp. *Int J Food Microbiol*. 1994;21:237–46.
157. Siswanto HP, Gratadoux JJ, Richard J. Potentiel inhibiteur de la souche de *Brevibacterium linens* productrice de la linenscine OC2, vis-à-vis des listeria et de *Staphylococcus aureus*. *Lait*. 1996;76:501–12.
158. Kato F, Yoshimi M, Araki K, Motomura Y, Matsufune Y, Nobunaga H, et al. Screening of Bacteriocins in Amino Acid or Nucleic Acid Producing Bacteria and Related Species. *Agric Biol Chem*. 1984;48:193–200.
159. Valdes-Stauber N, Scherer S. Nucleotide sequence and taxonomical distribution of the bacteriocin gene *lin* cloned from *Brevibacterium linens* M18. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62:1283–6.
160. Valdes-Stauber N, Götz H, Busse M. Antagonistic effect of coryneform bacteria from red smear cheese against *Listeria* species. *Int J Food Microbiol*. 1991;13:119–30.
161. Eppert I, Valdés-Stauber N, Götz H, Busse M, Scherer S. Growth reduction of *Listeria* spp. caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:4812–7.
162. Motta AS, Brandelli A. Influence of growth conditions on bacteriocin production by *Brevibacterium linens*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;62:163–7.
163. Seiler H. Identification of cheese-smear coryneform bacteria. *J Dairy Res*. 1986;53:439–49.
164. Kohl W, Achenbach H, Reichenbach H. The pigments of *Brevibacterium linens*: Aromatic carotenoids. *Phytochemistry*. 1983;22:207–10.
165. Britton G. Carotenoids. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. *Natural Food Colorants*. Boston, MA: Springer; 1996. p. 197–243.
166. Krubasik P, Sandmann G. A carotenogenic gene cluster from *Brevibacterium linens* with novel lycopene cyclase genes involved in the synthesis of aromatic carotenoids. *Mol Gen Genet*. 2000;263:423–32.
167. Dufossé L, de Echanove MC. 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.* 2005;38:967–73.
168. Ferchichi M, Hemme D, Bouillanne C. Influence of Oxygen and pH on Methanethiol Production from L-Methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Appl Environ Microbiol.* 1986;51:725–9.
169. Masoud W, Jakobsen M. Surface ripened cheeses: the effects of *Debaryomyces hansenii*, NaCl and pH on the intensity of pigmentation produced by *Brevibacterium linens* and *Corynebacterium flavescens*. *Int Dairy J.* 2003;13:231–7.
170. de Valdez GF, de Giori GS, de Ruiz Holgado AP, Oliver G. An Orange-Reddish Pigmentation in Roquefort Cheese. *J Food Prot.* 1986;49:412–6.
171. Guyomarc'h F, Binet A, Dufossé L. Characterization of *Brevibacterium linens* pigmentation using spectrophotometry. *Int J Food Microbiol.* 2000;57:201–10.
172. Leclercq-Perlat M-N, Corrieu G, Spinnler H-E. The Color of *Brevibacterium linens* Depends on the Yeast Used for Cheese Deacidification. *J Dairy Sci.* 87:1536–44.
173. Guyomarc'h F, Binet A, Dufossé L. Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2000;24:64–70.
174. Dufossé L, Mabon P, Binet A. Assessment of the Coloring Strength of *Brevibacterium linens* Strains: Spectrophotometry Versus Total Carotenoid Extraction/Quantification. *J Dairy Sci.* 2001;84:354–60.
175. Deetae P, Bonnarme P, Spinnler H-E, Helinck S. Production of volatile aroma compounds by bacterial strains isolated from different surface-ripened French cheeses. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76:1161–71.
176. Bonnarme P, Lapadatescu C, Yvon M, Spinnler H-E. L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J Dairy Res.* 2001;68:663–74.
177. Lamberet G, Auberger B, Bergère JL. Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis. II. Comparison of coryneform bacteria, Micrococcaceae and some lactic acid bacteria starters. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;48:393–7.
178. Arfi K, Amárita F, Spinnler H-E, Bonnarme P. Catabolism of volatile sulfur compounds precursors by *Brevibacterium linens* and *Geotrichum candidum*, two microorganisms of the cheese ecosystem. *J Biotechnol.* 2003;105:245–53.
179. Forquin M-P, Hébert A, Roux A, Aubert J, Proux C, Heilier J-F, et al. Global Regulation of the Response to Sulfur Availability in the Cheese-Related Bacterium *Brevibacterium aurantiacum*. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1449–59.
180. Ferchichi M, Hemme D, Nardi M. Induction of Methanethiol Production by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Microbiology.* 1986;132:3075–82.
181. Ferchichi M, Hemme D, Nardi M. Na⁺-Stimulated Transport of L-Methionine in *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:2159–64.

182. Cholet O, Hénaut A, Bonnarme P. Transcriptional analysis of L-methionine catabolism in *Brevibacterium linens* ATCC 9175. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;74:1320–32.
183. Amarita F, Yvon M, Nardi M, Chambellon E, Delettre J, Bonnarme P. Identification and Functional Analysis of the Gene Encoding Methionine- γ -Lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:7348–54.
184. Cuer A, Dauphin G, Kergomard A, Dumont JP, Adda J. Production of S-Methylthioacetate by *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 1979;38:332–4.
185. Arfi K, Landaud S, Bonnarme P. Evidence for Distinct l-Methionine Catabolic Pathways in the Yeast *Geotrichum candidum* and the Bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:2155–62.
186. Tokita F, Hosono A. Production of volatile sulfur compounds by *Brevibacterium linens*. *Jpn J Zootech Sci.* 1968;39:127–32.
187. Lamberet G, Auberger B, Bergère JL. Aptitude of cheese bacteria for volatile S-methyl thioester synthesis I. Effect of substrates and pH on their formation by *Brevibacterium linens* GC171. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;47:279–83.
188. Sourabié AM, Spinnler H-E, Bourdat-Deschamps M, Tallon R, Landaud S, Bonnarme P. S-methyl thioesters are produced from fatty acids and branched-chain amino acids by brevibacteria: focus on l-leucine catabolic pathway and identification of acyl-CoA intermediates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93:1673–83.
189. Weimer B, Seefeldt K, Dias B. Sulfur metabolism in bacteria associated with cheese. In: Konings WN, Kuipers OP, In 't Veld JHJH, editors. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Dordrecht: Springer; 1999. p. 247–61.
190. Milo C, Reineccius GA. Identification and Quantification of Potent Odorants in Regular-Fat and Low-Fat Mild Cheddar Cheese. *J Agric Food Chem.* 1997;45:3590–4.
191. Hemme D, Bouillanne C, Metro F, Desmazeaud MJ. Microbial catabolism of amino acids during cheese ripening. *Sci Aliments.* 1982;2:113–23.
192. Ferchichi M, Hemme D, Nardi M, Pamboukdjian N. Production of Methanethiol from Methionine by *Brevibacterium linens* CNRZ 918. *Microbiology.* 1985;131:715–23.
193. Dias B, Weimer B. Conversion of Methionine to Thiols by Lactococci, Lactobacilli, and Brevibacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3320–6.
194. Bonnarme P, Psoni L, Spinnler H-E. Diversity of l-Methionine Catabolism Pathways in Cheese-Ripening Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:5514–7.
195. Tanaka H, Esaki N, Soda K. A versatile bacterial enzyme: l-methionine γ -lyase. *Enzyme Microb Technol.* 1985;7:530–7.
196. Collin JC, Law BA. Isolation and characterization of the l-methionine- γ -demethylase from *Brevibacterium linens* NCDO 739. *Sci Aliments.* 1989;9:805–12.
197. Dias B, Weimer B. Purification and Characterization of l-Methionine γ -Lyase from *Brevibacterium linens* BL2. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:3327–31.

198. Lee C-W, Desmazeaud MJ. Partial Purification and Some Properties of an Aromatic-amino-acid and an Aspartate Aminotransferase in *Brevibacterium linens* 47. *Microbiology*. 1985;131:459–67.
199. Chin H-W, Lindsay RC. Ascorbate and transition-metal mediation of methanethiol oxidation to dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide. *Food Chem*. 1994;49:387–92.
200. Demarigny Y, Berger C, Desmasure N, Gueguen M, Spinnler H-E. Flavour sulphides are produced from methionine by two different pathways by *Geotrichum candidum*. *J Dairy Res*. 2000;67:371–80.
201. Tokita F, Hosono A, Gojo T, Nakamura M. Primary observation on the production of volatile substances by *Brevibacterium linens*. *J Fac Agric Shinshu Univ*. 1966;4:105–20.
202. Hosono A, Tokita F. Studies on the production of volatile carbonyl compounds by *Brevibacterium linens*. *Jpn J Zootech Sci*. 1969.
203. Jollivet N, Bézenger M-C, Vayssier Y, Belin J-M. Production of volatile compounds in liquid cultures by six strains of coryneform bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1992;36:790–4.
204. Feurer C, Vallaeyts T, Corrieu G, Irlinger F. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a french soft, red-smear cheese? *J Dairy Sci*. 2004;87:3189–97.
205. Rea MC, Gorges S, Gelsomino R, Brennan NM, Mounier J, Vancanneyt M, et al. Stability of the biodiversity of the surface consortia of Gubbeen, a red-smear cheese. *J Dairy Sci*. 2007;90:2200–10.
206. Goerges S, Mounier J, Rea MC, Gelsomino R, Heise V, Beduhn R, et al. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2210–7.
207. Bockelmann W, Hoppe-Seyler T, Krusch U, Hoffmann W, Heller KJ. The microflora of Tilsit cheese. Part 2. Development of a surface smear starter culture. *Nahr-Food*. 1997;41:213–8.
208. Spinnler H-E. Surface Mold-Ripened Cheeses. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 911–28.
209. Monnet C, Landaud S, Bonnarne P, Swennen D. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:1–9.
210. Hall HK, Karem KL, Foster JW. Molecular Responses of Microbes to Environmental pH stress. In: Poole RK, editor. *Advances in Microbial Physiology*. New York: Academic Press; 1995. p. 229–72.
211. Serrano R. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr*. 1988;947:1–28.
212. Sigler K, Höfer M. Mechanisms of acid extrusion in yeast. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr*. 1991;1071:375–91.

213. Krulwich TA, Sachs G, Padan E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9:330–43.
214. Slonczewski JL, Fujisawa M, Dopson M, Krulwich TA. Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. In: Poole RK, editor. *Advances in Microbial Physiology.* New York: Academic Press; 2009. p. 1–79.
215. Beales N. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2004;3:1–20.
216. Cowan DA, Casanueva A, Stafford W. Ecology and Biodiversity of Cold-Adapted Microorganisms. In: Gerday C, Glansdorff N, editors. *Physiology and Biochemistry of Extremophiles.* Washington, DC: ASM Press; 2007. p. 119–32.
217. Casanueva A, Tuffin M, Cary C, Cowan DA. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of ‘omic’ technologies. *Trends Microbiol.* 2010;18:374–81.
218. Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int J Food Microbiol.* 2001;69:147–52.
219. Masoud W, Jakobsen M. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Int Dairy J.* 2005;15:69–77.
220. Plaza P, Usall J, Teixidó N, Viñas I. Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *J Appl Microbiol.* 2003;94:549–54.
221. Nuñez M, Guillen AM, Rodriguez-Marin MA, Marcilla AM, Gaya P, Medina M. Accelerated Ripening of Ewes’ Milk Manchego Cheese: The Effect of Neutral Proteinases. *J Dairy Sci.* 1991;74:4108–18.
222. Reys A. Bacterial Surface-Ripened Cheeses. In: Fox PF, editor. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* London: Chapman & Hall; 1993. p. 137–72.
223. Ramet JP, Mandron V, Guiard M. Comparing ripening technology of the various types of cheese. In: Eck A, Gillis J-C, editors. *Cheesemaking: from science to quality assurance.* Paris: Lavoisier; 2000. p. 418–46.
224. Hébraud M, Potier P. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 1999;1:211–9.
225. Guinee TP, Fox PF. Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 317–75.
226. Mirade P-S, Rougier T, Kondjoyan A, Daudin J-D, Picque D, Corrieu G. Caractérisation expérimentale de l’aéroulque d’un hâloir de fromagerie et des échanges air-produit. *Lait.* 2004;84:483–500.

227. Choisy C, Desmazeaud M, Gripon JC, Lamberet G, Lenoir J. The biochemistry of ripening. In: Eck A, Gillis J-C, editors. *Cheesemaking: From Science to Quality Assurance*. Paris: Lavoisier; 2000. p. 82–151.
228. Bonaiti C, Leclercq-Perlat M-N, Latrille E, Corrieu G. Deacidification by *Debaryomyces hansenii* of smear soft cheeses ripened under controlled conditions: Relative humidity and temperature influences. *J Dairy Sci*. 2004;87:3976–88.
229. Leclercq-Perlat M-N, Sicard M, Trelea IC, Picque D, Corrieu G. Temperature and relative humidity influence the microbial and physicochemical characteristics of Camembert-type cheese ripening. *J Dairy Sci*. 95:4666–82.
230. Callon C, Picque D, Corrieu G, Montel M-C. Ripening conditions: A tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. *Food Control*. 2011;22:1911–9.
231. Haasum I, Nielsen PV. Physiological Characterization of Common Fungi Associated with Cheese. *J Food Sci*. 1998;63:157–61.
232. van den Tempel T, Nielsen MS. Effects of atmospheric conditions, NaCl and pH on growth and interactions between moulds and yeasts related to blue cheese production. *Int J Food Microbiol*. 2000;57:193–9.
233. Picque D, Leclercq-Perlat M-N, Corrieu G. Effects of Atmospheric Composition on Respiratory Behavior, Weight Loss, and Appearance of Camembert-Type Cheeses During Chamber Ripening. *J Dairy Sci*. 89:3250–9.
234. Dugat-Bony E, Straub C, Teissandier A, Onesime D, Loux V, Monnet C, et al. Overview of a surface-ripened cheese community functioning by meta-omics analyses. *PLOS ONE*. 2015;10:e0124360.
235. Zourari A, Accolas JP, Desmazeaud MJ. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review. *Lait*. 1992;72:1–34.
236. Kim CS, Ji E-S, Oh D-K. Expression and characterization of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*. 2003;25:1769–74.
237. Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;79:339–54.
238. van den Tempel T, Jakobsen M. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy J*. 2000;10:263–70.
239. Cholet O, Hénaut A, Casaregola S, Bonnarme P. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of l-Methionine, Lactate, and Lactose. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:2561–70.
240. Boutrou R, Guéguen M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int J Food Microbiol*. 2005;102:1–20.
241. Leclercq-Perlat M-N, Picque D, del Campo Barba STM, Monnet C. Dynamics of *Penicillium camemberti* growth quantified by real-time PCR on Camembert-type cheeses at different conditions of temperature and relative humidity. *J Dairy Sci*. 2013;96:4031–40.

242. Mounier J, Rea MC, O'Connor PM, Fitzgerald GF, Cogan TM. Growth characteristics of *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, and *Staphylococcus* spp. isolated from surface-ripened cheese. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:7732–9.
243. Hickey MW, Hillier AJ, Jago GR. Transport and Metabolism of Lactose, Glucose, and Galactose in Homofermentative Lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:825–31.
244. Yang J-J, Guo C-F, Ge W-P, Wang Q-N, Zhang Y, Chen Y, et al. Isolation and identification of yeast in yak milk dreg of Tibet in China. *Dairy Sci Technol*. 2014;94:455–67.
245. Williams AG, Withers SE, Banks JM. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int Dairy J*. 2000;10:17–23.
246. Eliskases-Lechner F, Ginzinger W. The bacterial flora of surface-ripened cheeses with special regard to coryneforms. *Lait*. 1995;75:571–84.
247. Gori K, Mortensen HD, Arneborg N, Jespersen L. Ammonia Production and Its Possible Role as a Mediator of Communication for *Debaryomyces hansenii* and Other Cheese-Relevant Yeast Species. *J Dairy Sci*. 90:5032–41.
248. Jiang T, Gao C, Ma C, Xu P. Microbial lactate utilization: enzymes, pathogenesis, and regulation. *Trends Microbiol*. 2014;22:589–99.
249. Lessard M-H, Viel C, Boyle B, St-Gelais D, Labrie S. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics*. 2014;15:235.
250. McSweeney PLH. Biochemistry of cheese ripening. *Int J Dairy Technol*. 2004;57 2-3:127–44.
251. McSweeney PLH, Sousa MJ. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*. 2000;80:293–324.
252. Ginger MR, Grigor MR. Comparative aspects of milk caseins. *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol*. 1999;124:133–45.
253. Bintsis T, Vafopoulou-Mastrojiannaki A, Litopoulou-Tzanetaki E, Robinson RK. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine. *J Appl Microbiol*. 2003;95:68–77.
254. Freitas AC, Pintado AE, Pintado ME, Malcata FX. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis. *Int Dairy J*. 1999;9:593–603.
255. Wyder M-T, Bachmann H-P, Puhani Z. Role of Selected Yeasts in Cheese Ripening: An Evaluation in Foil Wrapped Raclette Cheese. *LWT - Food Sci Technol*. 1999;32:333–43.
256. Gardini F, Tofalo R, Belletti N, Iucci L, Suzzi G, Torriani S, et al. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol*. 2006;23:641–8.

257. Wojtatowicz M, Chrzanowska J, Juszczak P, Skiba A, Gdula A. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int J Food Microbiol.* 2001;69:135–40.
258. Wyder M-T, Puhán Z. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int Dairy J.* 1999;9:117–24.
259. De Wit M, Osthoff G, Viljoen BC, Hugo A. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enzyme Microb Technol.* 2005;37:606–16.
260. Atanassova MR, Fernández-Otero C, Rodríguez-Alonso P, Fernández-No IC, Garabal JJ, Centeno JA. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiol.* 2016;53:172–81.
261. Gagnaire V, Mollé D, Sorhaug T, Léonil J. Peptidases of dairy propionic acid bacteria. *Lait.* 1999;79:43–57.
262. Sousa MJ, Ardö Y, McSweeney PLH. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int Dairy J.* 2001;11:327–45.
263. Ghosh BK, Bockelmann W, Heller KJ. Casein degradation by enzymes of microorganisms isolated from surface-ripened smear cheese. *Milchwissenschaft.* 2009;64:55.
264. Smacchi E, Fox PF, Gobbetti M. Purification and characterization of two extracellular proteinases from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;170:327–33.
265. Smacchi E, Gobbetti M, Lanciotti R, Fox PF. Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Arthrobacter nicotianae* 9458. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;178:191–7.
266. Gobbetti M, Smacchi E, Semeraro M, Fox PF, Lanciotti R, Cogan T. Purification and characterization of an extracellular proline iminopeptidase from *Corynebacterium variabilis* NCDO 2101. *J Appl Microbiol.* 2002;90:449–56.
267. Mansour S, Beckerich J-M, Bonnarme P. Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:6505–12.
268. Jauniaux J, Grenson M. *GAPI*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem.* 2005;190:39–44.
269. Trip H, Mulder NL, Lolkema JS. Cloning, Expression, and Functional Characterization of Secondary Amino Acid Transporters of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 2013;195:340–50.
270. Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J.* 2001;11:185–201.
271. Yvon M, Thirouin S, Rijnen L, Fromentier D, Gripon JC. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:414–9.
272. Gao S, Steele JL. Purification and characterization of oligomeric species of an aromatic amino acid aminotransferase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* S3. *J Food Biochem.* 2007;22:197–211.

273. Yvon M, Chambellon E, Bolotin A, Roudot-Algaron F. Characterization and Role of the Branched-Chain Aminotransferase (BcaT) Isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCDO 763. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:571–7.
274. Yvon M, Berthelot S, Gripon JC. Adding α -Ketoglutarate to Semi-hard Cheese Curd Highly Enhances the Conversion of Amino acids to Aroma Compounds. *Int Dairy J.* 1998;8:889–98.
275. Rijnen L, Courtin P, Gripon J-C, Yvon M. Expression of a Heterologous Glutamate Dehydrogenase Gene in *Lactococcus lactis* Highly Improves the Conversion of Amino Acids to Aroma Compounds. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1354–9.
276. Curtin AC, McSweeney PLH. Catabolism of amino acids in cheese during ripening. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.* London: Academic Press; 2004. p. 435–54.
277. Alting AC, Engels W, van Schalkwijk S, Exterkate FA. Purification and Characterization of Cystathionine (beta)-Lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and Its Possible Role in Flavor Development in Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:4037–42.
278. Smacchi E, Gobbetti M. Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;166:197–202.
279. Le Boucher C, Gagnaire V, Briard-Bion V, Jardin J, Maillard M-B, Dervilly-Pinel G, et al. Spatial Distribution of *Lactococcus lactis* Colonies Modulates the Production of Major Metabolites during the Ripening of a Model Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82:202–10.
280. Monnet C, Loux V, Gibrat J-F, Spinnler E, Barbe V, Vacherie B, et al. The *Arthrobacter arilaitensis* Re117 genome sequence reveals its genetic adaptation to the surface of cheese. *PLOS ONE.* 2010;5:e15489.
281. Schröder J, Maus I, Trost E, Tauch A. Complete genome sequence of *Corynebacterium variabile* DSM 44702 isolated from the surface of smear-ripened cheeses and insights into cheese ripening and flavor generation. *BMC Genomics.* 2011;12:545.
282. Roig-Sagués AX, Molina AP, Hernández-Herrero M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. *Eur Food Res Technol.* 2002;215:96–100.
283. Gardini F, Martuscelli M, Caruso MC, Galgano F, Crudele MA, Favati F, et al. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol.* 2001;64:105–17.
284. Leuschner RGK, Hammes WP. Degradation of Histamine and Tyramine by *Brevibacterium linens* during Surface Ripening of Munster Cheese. *J Food Prot.* 1998;61:874–8.
285. Jensen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ. The Composition of Milk Fat. *J Dairy Sci.* 1991;74:3228–43.
286. Bills DD, Day EA. Determination of the Major Free Fatty Acids of Cheddar Cheese. *J Dairy Sci.* 47:733–8.

287. Collins YF, McSweeney PLH, Wilkinson MG. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int Dairy J.* 2003;13:841–66.
288. Nelson JH, Jensen RG, Pitas RE. Pregastric Esterase and other Oral Lipases—A Review. *J Dairy Sci.* 1977;60:327–62.
289. Dupuis C, Corre C, Boyaval P. Lipase and Esterase Activities of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59:4004–9.
290. Oterholm A, Ordal ZJ, Witter LD. Purification and Properties of a Glycerol Ester Hydrolase (Lipase) from *Propionibacterium shermanii*. *Appl Microbiol.* 1970;20:16–22.
291. Kakariari E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Purification and characterization of an intracellular esterase from *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* ITG 14. *Lait.* 2000;80:491–501.
292. Abeijón Mukdsi MC, Falentin H, Maillard M-B, Chuat V, Medina RB, Parayre S, et al. The Secreted Esterase of *Propionibacterium freudenreichii* Has a Major Role in Cheese Lipolysis. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:751.
293. Pignède G, Wang H, Fudalej F, Gaillardin C, Seman M, Nicaud J-M. Characterization of an Extracellular Lipase Encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol.* 2000;182:2802–10.
294. Fickers P, Fudalej F, Le Dall MT, Casaregola S, Gaillardin C, Thonart P, et al. Identification and characterisation of *LIP7* and *LIP8* genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genet Biol.* 2005;42:264–74.
295. Yu M, Qin S, Tan T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.* 2007;42:384–91.
296. Menassa A, Lamberet G. Contribution à l'étude du système lipolytique de *Penicillium roqueforti*. Caractères comparés de deux activités exocellulaires. *Lait.* 1982;62:32–43.
297. Lamberet G, Lenoir J. Les caractères du système lipolytique de l'espèce *Penicillium caseicolum*. Purification et propriétés de la lipase majeure. *Lait.* 1976;56:622–44.
298. Hajri T, Abumrad NA. Fatty Acid Transport Across Membranes: Relevance to Nutrition and Metabolic Pathology. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:383–415.
299. Fan TY, Hwang DH, Kinsella JE. Methyl ketone formation during germination of *Penicillium roqueforti*. *J Agric Food Chem.* 1976;24:443–8.
300. King Richard D., Clegg Geoffrey H. The metabolism of fatty acids, methyl ketones and secondary alcohols by *penicillium roqueforti* in blue cheese slurries. *J Sci Food Agric.* 2006;30:197–202.
301. Irvine DM, Price WV. Influence of Salt on the Development of Acid by Lactic Starters in Skimmilk and in Curd Submerged in Brine. *J Dairy Sci.* 1961;44:243–8.
302. Empadinhas N, da Costa MS. Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *Int Microbiol.* 2008;11:151–61.

303. Lanyi JK. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev.* 1974;38:272–90.
304. Eisenberg H, Wachtel EJ. Structural Studies of Halophilic Proteins, Ribosomes, and Organelles of Bacteria Adapted to Extreme Salt Concentrations. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1987;16:69–92.
305. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Syst.* 2008;4:2.
306. Galinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;15 2-3:95–108.
307. Csonka LN, Hanson AD. Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annu Rev Microbiol.* 1991;45:569–606.
308. Lippert K, Galinski EA. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1992;37:61–5.
309. McGarrity JT, Armstrong JB. The effect of salt on phospholipid fatty acid composition in *Escherichia coli* K-12. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab.* 1975;398:258–64.
310. Ohno Y, Yano I, Hiramatsu T, Masui M. Lipids and fatty acids of a moderately halophilic bacterium, no. 101. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab.* 1976;424:337–50.
311. Russell NJ, Kogut M, Kates M. Phospholipid Biosynthesis in the Moderately Halophilic Bacterium *Vibrio costicola* During Adaptation to Changing Salt Concentrations. *Microbiology.* 1985;131:781–9.
312. Guinee T P. Salting and the role of salt in cheese. *Int J Dairy Technol.* 2004;57 2-3:99–109.
313. Prista C, Loureiro-Dias MC, Montiel V, García R, Ramos J. Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res.* 2005;5:693–701.
314. Feurer C, Irlinger F, Spinnler H-E, Glaser P, Vallaey T. 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.* 2004;97:546–56.
315. Ishikawa M, Kodama K, Yasuda H, Okamoto-Kainuma A, Koizumi K, Yamasato K. Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Lett Appl Microbiol.* 2006;44:308–13.
316. Roth E, Schwenninger SM, Eugster-Meier E, Lacroix C. Facultative anaerobic halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from a natural smear ecosystem inhibit *Listeria* growth in early ripening stages. *Int J Food Microbiol.* 2011;147:26–32.
317. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:215–37.
318. Flynn A. Minerals and Trace Elements in Milk. In: Kinsella JE, editor. *Advances in Food and Nutrition Research.* San Diego, CA: Academic Press; 1992. p. 209–52.

319. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*. 1995;80:252.
320. Monnet C, Back A, Irlinger F. Growth of aerobic ripening bacteria at the cheese surface is limited by the availability of iron. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:3185–92.
321. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep*. 2010;27:637–57.
322. Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL. Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol*. 2012;53:303–17.
323. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71:413–51.
324. Challis GL. A Widely Distributed Bacterial Pathway for Siderophore Biosynthesis Independent of Nonribosomal Peptide Synthetases. *ChemBioChem*. 2005;6:601–11.
325. Schröder I, Johnson E, de Vries S. Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:427–47.
326. Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR. Metalloregulation of *FRE1* and *FRE2* Homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998;273:23716–21.
327. Cowart RE. Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch Biochem Biophys*. 2002;400:273–81.
328. Homuth M, Valentin-Weigand P, Rohde M, Gerlach G-F. Identification and Characterization of a Novel Extracellular Ferric Reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun*. 1998;66:710–6.
329. Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003;62:316–30.
330. Köster W. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol*. 2001;152:291–301.
331. Kerr ID. Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2002;1561:47–64.
332. Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2004;1694:269–78.
333. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. Feo – Transport of Ferrous Iron into Bacteria. *Biometals*. 2006;19:143–57.
334. Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:16243.
335. Kim H, Lee H, Shin D. The FeoA protein is necessary for the FeoB transporter to import ferrous iron. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;423:733–8.
336. Hung K-W, Tsai J-Y, Juan T-H, Hsu Y-L, Hsiao C-D, Huang T-H. Crystal Structure of the *Klebsiella pneumoniae* NFeoB/FeoC Complex and Roles of FeoC in Regulation of Fe²⁺ Transport by the Bacterial Feo System. *J Bacteriol*. 2012;194:6518–26.

337. Rajasekaran MB, Nilapwar S, Andrews SC, Watson KA. EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *BioMetals*. 2009;23:1.
338. Miethke M, Monteferrante CG, Marahiel MA, van Dijl JM. The *Bacillus subtilis* EfeUOB transporter is essential for high-affinity acquisition of ferrous and ferric iron. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013;1833:2267–78.
339. Ong SA, Neilands JB. Siderophores in microbially processed cheese. *J Agric Food Chem*. 1979;27:990–5.
340. Winkelmann G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals*. 2007;20:379.
341. Kastman EK, Kamelamela N, Norville JW, Cosetta CM, Dutton RJ, Wolfe BE. Biotic Interactions Shape the Ecological Distributions of *Staphylococcus* Species. *mBio*. 2016;7:e01157-16.
342. Blaiseau PL, Seguin A, Camadro JM, Lesuisse E. Iron uptake in yeasts. In: Cornelis P, Andrews SC, editors. *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*. Poole: Caister Academic Press; 2010. p. 265–84.
343. Noordman WH, Reissbrodt R, Bongers RS, Rademaker JLW, Bockelmann W, Smit G. Growth stimulation of *Brevibacterium* sp. by siderophores. *J Appl Microbiol*. 2006;101:637–46.
344. Reissbrodt R, Rabsch W, Chapeaurouge A, Jung G, Winkelmann G. Isolation and identification of ferrioxamine G and E in *Hafnia alvei*. *Biol Met*. 1990;3:54–60.
345. Irlinger F, Loux V, Bento P, Gibrat J-F, Straub C, Bonnarme P, et al. Genome Sequence of *Staphylococcus equorum* subsp. *equorum* Mu2, Isolated from a French Smear-Ripened Cheese. *J Bacteriol*. 2012;194:5141–2.
346. Beasley FC, Heinrichs DE. Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *J Inorg Biochem*. 2010;104:282–8.
347. Faust K, Raes J. Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:538.
348. Sieuwerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J, van Hylckama Vlieg JET. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:4997–5007.
349. Herve-Jimenez L, Guillouard I, Guedon E, Boudebbouze S, Hols P, Monnet V, et al. Postgenomic Analysis of *Streptococcus thermophilus* Cocultivated in Milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Involvement of Nitrogen, Purine, and Iron Metabolism. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:2062–73.
350. Gilbert C, Atlan D, Blanc B, Portailer R, Germond JE, Lapierre L, et al. A new cell surface proteinase: sequencing and analysis of the *prtB* gene from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J Bacteriol*. 1996;178:3059–65.

351. Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, et al. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29:435–63.
352. Courtin P, Rul F. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. *Lait.* 2004;84:125–34.
353. Crittenden RG, Martinez NR, Playne MJ. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2003;80:217–22.
354. Derzelle S, Bolotin A, Mistou M-Y, Rul F. Proteome Analysis of *Streptococcus thermophilus* Grown in Milk Reveals Pyruvate Formate-Lyase as the Major Upregulated Protein. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:8597–605.
355. Driessen FM, Kingma F, Stadhouders J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth Milk Dairy J.* 1982.
356. Partanen L, Marttinen N, Alatossava T. Fats and Fatty Acids as Growth Factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Syst Appl Microbiol.* 2001;24:500–6.
357. van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, et al. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103:9274.
358. Tamime AY, Marshall VME. Microbiology and technology of fermented milks. In: Law BA, editor. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk.* Boston, MA: Springer; 1997. p. 57–152.
359. Gadaga TH, Mutukumira AN, Narvhus JA. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *Int J Food Microbiol.* 2001;68:21–32.
360. Narvhus JA, Gadaga TH. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int J Food Microbiol.* 2003;86:51–60.
361. Condon S, Cogan TM, Piveteau P, O’Callaghan J, Lyons B. Stimulation of Propionic Acid Bacteria by Lactic Acid Bacteria in Cheese Manufacture. Cork: Teagasc; 2001. <http://hdl.handle.net/11019/1277>.
362. Irlinger F, Mounier J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 2009;20:142–8.
363. Brüssow H. Phages of Dairy Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:283–303.
364. Sturino JM, Klaenhammer TR. Bacteriophage defense systems and strategies for lactic acid bacteria. *Adv Appl Microbiol.* 2004;56:332–78.
365. Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Lett.* 1990;87 1-2:149–64.
366. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:777.

367. Reddy GV, Shahani KM. Isolation of an antibiotic from *Lactobacillus bulgaricus*. J Dairy Sci. 1971;54:748.
368. Ivanova I, Miteva V, Stefanova TS, Pantev A, Budakov I, Danova S, et al. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. Int J Food Microbiol. 1998;42:147–58.
369. Loessner M, Guenther S, Steffan S, Scherer S. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese Surface Microbial Ripening Consortium. Appl Environ Microbiol. 2003;69:1854–7.
370. Begon M, Townsend CR, Harper JL. Ecology: from individuals to ecosystems. 2006.
371. Harrison DEF. Mixed Cultures in Industrial Fermentation Processes. In: Perlman D, editor. Advances in Applied Microbiology. New York: Academic Press; 1978. p. 129–64.
372. Lewis PM. A note on the continuous flow culture of mixed populations of lactobacilli and streptococci. J Appl Microbiol. 1967;30:406–9.
373. Buchanan JM, Hartman SC. Enzymic reactions in the synthesis of the purines. In: Nord FF, editor. Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry. New York: Interscience Publishers; 1959. p. 199–261.
374. Bringel F, Hubert J-C. Extent of Genetic Lesions of the Arginine and Pyrimidine Biosynthetic Pathways in *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, and *L. casei*: Prevalence of CO₂-Dependent Auxotrophs and Characterization of Deficient *arg* Genes in *L. plantarum*. Appl Environ Microbiol. 2003;69:2674–83.
375. Purko M, Nelson WO, Wood WA. The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens*. J Dairy Sci. 1951;34:699–705.
376. Roostita R, Fleet GH. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. Int J Food Microbiol. 1996;31:205–19.
377. Lubert DJ, Frazier WC. Microbiology of the Surface Ripening of Brick Cheese. J Dairy Sci. 1955;38:981–90.
378. Lecocq J, Gueguen M. Effects of pH and Sodium Chloride on the Interactions Between *Geotrichum candidum* and *Brevibacterium linens*. J Dairy Sci. 1994;77:2890–9.
379. Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. Nat Rev Microbiol. 2006;4:395.
380. Weinbauer MG, Rassoulzadegan F. Are viruses driving microbial diversification and diversity? Environ Microbiol. 2003;6:1–11.
381. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol Rev. 2004;28:127–81.
382. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol. 1999;50:131–49.
383. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int J Food Microbiol. 1995;24:343–62.

384. Benthin S, Villadsen J. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J Appl Bacteriol.* 1995;78:647–54.
385. Adams MR, Hall CJ. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int J Food Sci Technol.* 1988;23:287–92.
386. Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:4084–90.
387. Touati D. Iron and Oxidative Stress in Bacteria. *Arch Biochem Biophys.* 2000;373:1–6.
388. Seifu E, Buys EM, Donkin EF. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2005;16:137–54.
389. Dahiya RS, Speck ML. Hydrogen Peroxide Formation by Lactobacilli and Its Effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci.* 1968;51:1568–72.
390. Price RJ, Lee JS. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J Milk Food Technol.* 1970;33:13–8.
391. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:1–20.
392. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12 1-3:39–85.
393. Diep DB, Nes IF. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets.* 2002;3:107–22.
394. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: Riley MA, Chavan MA, editors. *Bacteriocins: Ecology and Evolution.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2007. p. 45–92.
395. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, Bulaj G, et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep.* 2013;30:108–60.
396. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol.* 2012;11:95.
397. de Arauz LJ, Jozala AF, Mazzola PG, Vessoni Penna TC. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci Technol.* 2009;20:146–54.
398. Grattepanche F, Miescher-Schwenninger S, Meile L, Lacroix C. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Sci Technol.* 2008;88:421–44.
399. Carnio MC, Eppert I, Scherer S. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. *Int J Food Microbiol.* 1999;47:89–97.

400. Iseppi R, Pilati F, Marini M, Toselli M, de Niederhäusern S, Guerrieri E, et al. Antilisterial activity of a polymeric film coated with hybrid coatings doped with Enterocin 416K1 for use as bioactive food packaging. *Int J Food Microbiol.* 2008;123:281–7.
401. Bizani D, Morrissy JAC, Dominguez APM, Brandelli A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dairy products using the bacteriocin-like peptide cerein 8A. *Int J Food Microbiol.* 2008;121:229–33.
402. Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2009;26:16–20.
403. O’Sullivan L, O’Connor EB, Ross RP, Hill C. Evaluation of live-culture-producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *J Appl Microbiol.* 2005;100:135–43.
404. Reviriego C, Fernández L, Rodríguez JM. A Food-Grade System for Production of Pediocin PA-1 in Nisin-Producing and Non-Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains: Application To Inhibit *Listeria* Growth in a Cheese Model System. *J Food Prot.* 2007;70:2512–7.
405. Liu L, O’Conner P, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Controlling *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese through heterologous production of enterocin A by *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol.* 2007;104:1059–66.
406. Jameson JE. A discussion of the dynamics of salmonella enrichment. *J Hyg (Lond).* 1962;60:193–207.
407. Guillier L, Stahl V, Hezard B, Notz E, Briandet R. Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves. *Int J Food Microbiol.* 2008;128:51–7.
408. Juillard V, Le Bars D, Kunji ER, Konings WN, Gripon JC, Richard J. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61:3024–30.
409. Juillard V, Foucaud C, Desmazeaud M, Richard J. Utilization of nitrogen sources during growth of *Lactococcus lactis* in milk. *Lait.* 1996;76:13–24.
410. Mansour S, Bailly J, Landaud S, Monnet C, Sarthou A-S, Cocaign-Bousquet M, et al. Investigation of Associations of *Yarrowia lipolytica*, *Staphylococcus xylosum*, and *Lactococcus lactis* in Culture as a First Step in Microbial Interaction Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:6422–30.
411. Almeida M, Hébert A, Abraham A-L, Rasmussen S, Monnet C, Pons N, et al. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. *BMC Genomics.* 2014;15:1101.
412. Abriouel H, Martín-Platero A, Maqueda M, Valdivia E, Martínez-Bueno M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol.* 2008;127:200–8.

413. Dolci P, Barmaz A, Zenato S, Pramotton R, Alessandria V, Cocolin L, et al. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *J Appl Microbiol.* 2009;106:278–87.
414. Ercolini D, Hill PJ, Dodd CER. Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:3540–8.
415. Jany J-L, Barbier G. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol.* 2008;25:839–48.
416. Pogačić T, Samaržija D, Corich V, D'Andrea M, Kagkli D-M, Giacomini A, et al. Microbiota of Karakačanski skakutanac, an artisanal fresh sheep cheese studied by culture-independent PCR-ARDRA and PCR-DGGE. *Dairy Sci Technol.* 2010;90:461–8.
417. Masoud W, Takamiya M, Vogensen FK, Lillevang S, Al-Soud WA, Sørensen SJ, et al. Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Int Dairy J.* 2011;21:142–8.
418. Van Hoorde K, Heyndrickx M, Vandamme P, Huys G. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiol.* 2010;27:425–33.
419. Randazzo CL, Pitino I, Ribbera A, Caggia C. Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiol.* 2010;27:363–74.
420. Fontana C, Cappa F, Rebecchi A, Cocconcelli PS. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2010;138:205–11.
421. Dolci P, Alessandria V, Rantsiou K, Bertolino M, Cocolin L. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripening of Castelmagno PDO cheese. *Int J Food Microbiol.* 2010;143:71–5.
422. Alegría Á, González R, Díaz M, Mayo B. Assessment of Microbial Populations Dynamics in a Blue Cheese by Culturing and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Curr Microbiol.* 2011;62:888–93.
423. Fuka MM, Engel M, Skelin A, Redžepović S, Schloter M. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *Int J Food Microbiol.* 2010;142:19–24.
424. Cocolin L, Nucera D, Alessandria V, Rantsiou K, Dolci P, Grassi MA, et al. Microbial ecology of Gorgonzola rinds and occurrence of different biotypes of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2009;133:200–5.
425. Casalta E, Sorba J-M, Aigle M, Ogier J-C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *Int J Food Microbiol.* 2009;133:243–51.
426. Alegría Á, Álvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int J Food Microbiol.* 2009;136:44–51.

427. Rantsiou K, Urso R, Dolci P, Comi G, Cocolin L. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *Int J Food Microbiol.* 2008;126:36–42.
428. Gala E, Landi S, Solieri L, Nocetti M, Pulvirenti A, Giudici P. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *Int J Food Microbiol.* 2008;125:347–51.
429. Bonetta S, Bonetta S, Carraro E, Rantsiou K, Cocolin L. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR–DGGE. *Food Microbiol.* 2008;25:786–92.
430. El-Baradei G, Delacroix-Buchet A, Ogier J-C. Biodiversity of Bacterial Ecosystems in Traditional Egyptian Domiati Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1248–55.
431. Flórez AB, Mayo B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int J Food Microbiol.* 2006;110:165–71.
432. Ogier JC, Lafarge V, Girard V, Rault A, Maladen V, Gruss A, et al. Molecular Fingerprinting of Dairy Microbial Ecosystems by Use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:5628–43.
433. Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, de Vos WM, Vaughan EE. Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68:1882–92.
434. Martín-Platero AM, Maqueda M, Valdivia E, Purswani J, Martínez-Bueno M. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiol.* 2009;26:294–304.
435. Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martín-Sánchez I, Martínez-Bueno M. Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:5662–73.
436. Parayre S, Falentin H, Madec M-N, Sivieri K, Le Dizes A-S, Sohier D, et al. Easy DNA extraction method and optimisation of PCR-Temporal Temperature Gel Electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *J Microbiol Methods.* 2007;69:431–41.
437. Le Bourhis A-G, Doré J, Carlier J-P, Chamba J-F, Popoff M-R, Tholozan J-L. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *Int J Food Microbiol.* 2007;113:154–63.
438. Andrighetto C, Marcazzan G, Lombardi A. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38:400–5.
439. Saubusse M, Millet L, Delbès C, Callon C, Montel M-C. Application of Single Strand Conformation Polymorphism — PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2007;116:126–35.

440. Delbès C, Ali-Mandjee L, Montel M-C. Monitoring Bacterial Communities in Raw Milk and Cheese by Culture-Dependent and -Independent 16S rRNA Gene-Based Analyses. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:1882–91.
441. Callon C, Delbès C, Duthoit F, Montel M-C. Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst Appl Microbiol.* 2006;29:172–80.
442. Duthoit F, Tessier L, Montel M-C. Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in ‘Registered Designation of Origin’ Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rRNA genes. *J Appl Microbiol.* 2005;98:1198–208.
443. Arteau M, Labrie S, Roy D. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. *Int Dairy J.* 2010;20:545–54.
444. Rademaker JLW, Peinhopf M, Rijnen L, Bockelmann W, Noordman WH. The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis. *Int Dairy J.* 2005;15:785–94.
445. Gatti M, Lindner JDD, De Lorentiis A, Bottari B, Santarelli M, Bernini V, et al. Dynamics of Whole and Lysed Bacterial Cells during Parmigiano-Reggiano Cheese Production and Ripening. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:6161–7.
446. Pogačić T, Mancini A, Santarelli M, Bottari B, Lazzi C, Neviani E, et al. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiol.* 2013;36:207–15.
447. Porcellato D, Brighton C, McMahon DJ, Oberg CJ, Lefevre M, Broadbent JR, et al. Application of ARISA to assess the influence of salt content and cation type on microbiological diversity of Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59:207–16.
448. Handelsman J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:669–85.
449. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem.* 2009;55:856–66.
450. Quigley L, O’Sullivan O, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD. High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:5717–23.
451. Bokulich NA, Mills DA. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79:5214–23.
452. Glenn TC. Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour.* 2011;11:759–69.
453. Ercolini D, De Filippis F, La Stora A, Iacono M. “Remake” by High-Throughput Sequencing of the Microbiota Involved in the Production of Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:8142–5.

454. Lusk TS, Ottesen AR, White JR, Allard MW, Brown EW, Kase JA. Characterization of microflora in Latin-style cheeses by next-generation sequencing technology. *BMC Microbiol.* 2012;12:254.
455. Alegría Á, Szczesny P, Mayo B, Bardowski J, Kowalczyk M. Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture-Dependent and -Independent Approaches. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:1890–8.
456. Fuka MM, Wallisch S, Engel M, Welzl G, Havranek J, Schloter M. Dynamics of bacterial communities during the ripening process of different Croatian cheese types derived from raw ewe's milk cheeses. *PLOS ONE.* 2013;8:e80734.
457. De Filippis F, La Stora A, Stellato G, Gatti M, Ercolini D. A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. *PLOS ONE.* 2014;9:e89680.
458. De Pasquale I, Calasso M, Mancini L, Ercolini D, La Stora A, De Angelis M, et al. Causal Relationship between Microbial Ecology Dynamics and Proteolysis during Manufacture and Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Cheese Canestrato Pugliese. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:4085–94.
459. De Pasquale I, Di Cagno R, Buchin S, De Angelis M, Gobbetti M. Microbial Ecology Dynamics Reveal a Succession in the Core Microbiota Involved in the Ripening of Pasta Filata Caciocavallo Pugliese Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80:6243–55.
460. Dolci P, De Filippis F, La Stora A, Ercolini D, Cocolin L. rRNA-based monitoring of the microbiota involved in Fontina PDO cheese production in relation to different stages of cow lactation. *Int J Food Microbiol.* 2014;185:127–35.
461. Riquelme C, Câmara S, Enes Dapkevicius M de LN, Vinuesa P, da Silva CCG, Malcata FX, et al. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *Int J Food Microbiol.* 2015;192:86–94.
462. Aldrete-Tapia A, Escobar-Ramírez MC, Tamplin ML, Hernández-Iturriaga M. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. *Food Microbiol.* 2014;44:136–41.
463. Delcenserie V, Taminiau B, Delhalle L, Nezer C, Doyen P, Crevecoeur S, et al. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *J Dairy Sci.* 2014;97:6046–56.
464. Stellato G, De Filippis F, La Stora A, Ercolini D. Coexistence of Lactic Acid Bacteria and Potential Spoilage Microbiota in a Dairy Processing Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:7893–904.
465. O'Sullivan DJ, Cotter PD, O'Sullivan O, Giblin L, McSweeney PLH, Sheehan JJ. Temporal and Spatial Differences in Microbial Composition during the Manufacture of a Continental-Type Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:2525–33.
466. Guidone A, Zotta T, Matera A, Ricciardi A, De Filippis F, Ercolini D, et al. The microbiota of high-moisture mozzarella cheese produced with different acidification methods. *Int J Food Microbiol.* 2016;216:9–17.

467. Alessandria V, Ferrocino I, De Filippis F, Fontana M, Rantsiou K, Ercolini D, et al. Microbiota of an Italian Grana-Like Cheese during Manufacture and Ripening, Unraveled by 16S rRNA-Based Approaches. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82:3988–95.
468. Calasso M, Ercolini D, Mancini L, Stellato G, Minervini F, Di Cagno R, et al. Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiol*. 2016;54:115–26.
469. De Pasquale I, Di Cagno R, Buchin S, De Angelis M, Gobbetti M. Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewes' milk cheeses. *PLOS ONE*. 2016;11:e0153213.
470. Dugat-Bony E, Garnier L, Denonfoux J, Ferreira S, Sarthou A-S, Bonnarme P, et al. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *Int J Food Microbiol*. 2016;238:265–73.
471. Silvetti T, Capra E, Morandi S, Cremonesi P, Decimo M, Gavazzi F, et al. Microbial population profile during ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter cheese, produced with and without autochthonous starter culture. *LWT - Food Sci Technol*. 2017;84:821–31.
472. Ceugniet A, Taminiou B, Coucheney F, Jacques P, Delcenserie V, Daube G, et al. Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *Int J Food Microbiol*. 2017;247:65–9.
473. Duru IC, Laine P, Andreevskaya M, Paulin L, Kananen S, Tynkkynen S, et al. Metagenomic and metatranscriptomic analysis of the microbial community in Swiss-type Maasdam cheese during ripening. *Int J Food Microbiol*. 2018;281:10–22.
474. Bertuzzi AS, Walsh AM, Sheehan JJ, Cotter PD, Crispie F, McSweeney PLH, et al. Omics-Based Insights into Flavor Development and Microbial Succession within Surface-Ripened Cheese. *mSystems*. 2018;3.
475. Escobar-Zepeda A, Sanchez-Flores A, Quirasco Baruch M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiol*. 2016;57:116–27.
476. Schirmer M, D’Amore R, Ijaz UZ, Hall N, Quince C. Illumina error profiles: resolving fine-scale variation in metagenomic sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2016;17:125.
477. Garber M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*. 2011;8:469.
478. Sonesson C, Delorenzi M. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:91.
479. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005;39:75–85.
480. Ablain W, Hallier Soulier S, Causeur D, Gautier M, Baron F. A simple and rapid method for the disruption of *Staphylococcus aureus*, optimized for quantitative reverse transcriptase applications: Application for the examination of Camembert cheese. *Dairy Sci Technol*. 2009;89:69–81.

481. Cretenet M, Laroute V, Ulvé V, Jeanson S, Nouaille S, Even S, et al. Dynamic Analysis of the *Lactococcus lactis* Transcriptome in Cheeses Made from Milk Concentrated by Ultrafiltration Reveals Multiple Strategies of Adaptation to Stresses. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:247–57.
482. Duquenne M, Fleurot I, Aigle M, Darrigo C, Borezée-Durant E, Derzelle S, et al. Tool for Quantification of Staphylococcal Enterotoxin Gene Expression in Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:1367–74.
483. Falentin H, Postollec F, Parayre S, Henaff N, Le Bivic P, Richoux R, et al. Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. *Int J Food Microbiol.* 2010;144:10–9.
484. La Gioia F, Rizzotti L, Rossi F, Gardini F, Tabanelli G, Torriani S. Identification of a Tyrosine Decarboxylase Gene (*tdcA*) in *Streptococcus thermophilus* 1TT45 and Analysis of Its Expression and Tyramine Production in Milk. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:1140–4.
485. Monnet C, Ulvé V, Sarthou A-S, Irlinger F. Extraction of RNA from Cheese without Prior Separation of Microbial Cells. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:5724–30.
486. Rossi F, Gardini F, Rizzotti L, La Gioia F, Tabanelli G, Torriani S. Quantitative Analysis of Histidine Decarboxylase Gene (*hdcA*) Transcription and Histamine Production by *Streptococcus thermophilus* PRI60 under Conditions Relevant to Cheese Making. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:2817–22.
487. Taïbi A, Dabour N, Lamoureux M, Roy D, LaPointe G. Comparative transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains under conditions simulating Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol.* 2011;146:263–75.
488. Trmčić A, Monnet C, Rogelj I, Bogovič Matijašić B. Expression of nisin genes in cheese—A quantitative real-time polymerase chain reaction approach. *J Dairy Sci.* 2011;94:77–85.
489. Ulve VM, Monnet C, Valence F, Fauquant J, Falentin H, Lortal S. RNA extraction from cheese for analysis of *in situ* gene expression of *Lactococcus lactis*. *J Appl Microbiol.* 2008;105:1327–33.
490. Heller MJ. DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:129–53.
491. Wolf JBW. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol Ecol Resour.* 2013;13:559–72.
492. Cholet O, Hénaut A, Hébert A, Bonnarme P. Transcriptional Analysis of l-Methionine Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica* in Relation to Volatile Sulfur Compound Biosynthesis. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:3356–67.
493. Nouaille S, Even S, Charlier C, Le Loir Y, Coccagn-Bousquet M, Loubière P. Transcriptomic Response of *Lactococcus lactis* in Mixed Culture with *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:4473–82.
494. Dalmaso M, Aubert J, Even S, Falentin H, Maillard M-B, Parayre S, et al. Accumulation of Intracellular Glycogen and Trehalose by *Propionibacterium freudenreichii*

- under Conditions Mimicking Cheese Ripening in the Cold. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:6357–64.
495. Dalmasso M, Aubert J, Briard-Bion V, Chuat V, Deutsch S-M, Even S, et al. A Temporal -omic Study of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T Adaptation Strategies in Conditions Mimicking Cheese Ripening in the Cold. *PLOS ONE.* 2012;7:e29083.
496. Ozsolak F, Milos PM. Single-molecule direct RNA sequencing without cDNA synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2011;2:565–70.
497. Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 2008;18:1509–17.
498. Cloonan N, Forrest ARR, Kolle G, Gardiner BBA, Faulkner GJ, Brown MK, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nat Methods.* 2008;5:613.
499. Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, et al. A Global View of Gene Activity and Alternative Splicing by Deep Sequencing of the Human Transcriptome. *Science.* 2008;321:956.
500. Monnet C, Dugat-Bony E, Swennen D, Beckerich J-M, Irlinger F, Fraud S, et al. Investigation of the Activity of the Microorganisms in a Reblochon-Style Cheese by Metatranscriptomic Analysis. *Front Microbiol.* 2016;7:536.
501. De Filippis F, Genovese A, Ferranti P, Gilbert JA, Ercolini D. Metatranscriptomics reveals temperature-driven functional changes in microbiome impacting cheese maturation rate. *Sci Rep.* 2016;6:21871.
502. Ojala T, Laine PKS, Ahlroos T, Tanskanen J, Pitkänen S, Salusjärvi T, et al. Functional genomics provides insights into the role of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS in cheese ripening. *Int J Food Microbiol.* 2017;241:39–48.
503. Wolf T, Kämmer P, Brunke S, Linde J. Two's company: studying interspecies relationships with dual RNA-seq. *Curr Opin Microbiol.* 2018;42:7–12.
504. Martin JA, Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet.* 2011;12:671.
505. Cai H, Thompson R, Budinich MF, Broadbent JR, Steele JL. Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus casei*: Insights into Their Niche-Associated Evolution. *Genome Biol Evol.* 2009;1:239–57.
506. Cheeseman K, Ropars J, Renault P, Dupont J, Gouzy J, Branca A, et al. Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. *Nat Commun.* 2014;5:2876.
507. Loux V, Mariadassou M, Almeida S, Chiapello H, Hammani A, Buratti J, et al. Mutations and genomic islands can explain the strain dependency of sugar utilization in 21 strains of *Propionibacterium freudenreichii*. *BMC Genomics.* 2015;16:296.

508. Stefanovic E, McAuliffe O. Comparative genomic and metabolic analysis of three *Lactobacillus paracasei* cheese isolates reveals considerable genomic differences in strains from the same niche. *BMC Genomics*. 2018;19:205.
509. Mounier J, Coton M, Irlinger F, Landaud S, Bonnarme P. Smear-Ripened Cheeses. In: McSweeney PLH, Fox PF, Cotter PD, Everett DW, editors. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. San Diego, CA: Academic Press; 2017. p. 955–96.
510. Bonham KS, Wolfe BE, Dutton RJ. Extensive horizontal gene transfer in cheese-associated bacteria. *eLife*. 2017;6.
511. Wolfe BE. Using Cultivated Microbial Communities To Dissect Microbiome Assembly: Challenges, Limitations, and the Path Ahead. *mSystems*. 2018;3:e00161-17.
512. Lv H, Hung CS, Henderson JP. Metabolomic Analysis of Siderophore Cheater Mutants Reveals Metabolic Costs of Expression in Uropathogenic *Escherichia coli*. *J Proteome Res*. 2014;13:1397–404.
513. Griffin AS, West SA, Buckling A. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature*. 2004;430:1024.

Titre : Analyses génomiques comparatives de souches de *Brevibacterium* et étude de leurs interactions biotiques avec *Hafnia alvei* dans un fromage modèle

Mots clés : *Brevibacterium*, *Hafnia alvei*, fromage, génomique fonctionnelle, interactions biotiques, RNA-seq

Résumé : L'objectif de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'adaptation microbienne à l'environnement fromager par des approches de génomique fonctionnelle *via* le modèle de *Brevibacterium*, un genre bactérien largement utilisé en technologie fromagère, mais dont l'implantation est parfois difficile à maîtriser.

L'analyse génomique comparative de 23 souches de *Brevibacterium*, dont 12 issues de fromages, a révélé des différences en déterminants génétiques impliqués dans la capacité à croître à la surface du fromage. Parmi ces différences, plusieurs sont corrélées à la phylogénie des souches, et d'autres résultent de transferts horizontaux, notamment dans le cas des gènes liés à l'acquisition du fer et à la biosynthèse de bactériocines. Nous avons identifié des îlots génomiques correspondant à des transferts de gènes d'acquisition du fer entre des souches fromagères de *Brevibacterium* et des bactéries d'affinage appartenant à d'autres genres. Nous avons également mis en évidence un transposon conjugatif codant pour la synthèse de bactériocines présent chez des souches de *Brevibacterium* d'origine fromagère mais aussi chez une souche fromagère du genre *Corynebacterium*.

L'étude fonctionnelle des interactions biotiques entre *Brevibacterium* et *Hafnia alvei*, une autre bactérie d'affinage du fromage, a été menée dans un modèle fromager développé au cours de ce travail. En couplant des analyses microbiologiques, biochimiques et transcriptomiques (RNA-seq), nous avons mis en évidence l'existence de différents mécanismes d'interaction entre ces bactéries. Ceux-ci concernent notamment l'acquisition du fer, la protéolyse, la lipolyse, le métabolisme soufré et le catabolisme du D-galactonate. Nos résultats suggèrent que dans la relation mutualiste observée entre certaines souches de *Brevibacterium* et *H. alvei*, cette dernière sécrète des sidérophores qui sont utilisés par *Brevibacterium* pour capter le fer plus efficacement, stimulant ainsi sa croissance. En contrepartie, *Brevibacterium* sécrète des lipases et des protéases qui dégradent les caséines et triglycérides du fromage en constituants énergétiques favorisant la croissance de *H. alvei*. Ce type d'interaction est intéressant à considérer pour la formulation des ferments d'affinage car il en résulte une meilleure capacité de tous les partenaires à coloniser le fromage, et ainsi à générer les propriétés technologiques recherchées.

Title : Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains and study of their biotic interactions with *Hafnia alvei* in a model cheese

Keywords : *Brevibacterium*, *Hafnia alvei*, cheese, functional genomic, biotic interactions, RNA-seq

Abstract : The objective of this study was to better understand the molecular mechanisms of microbial adaptation to the cheese habitat by functional genomic approaches using *Brevibacterium* as a model microorganism. This bacterium is widely used for the manufacturing of cheese but its growth on the cheese surface is sometimes difficult to control.

Comparative genomic analysis of 23 *Brevibacterium* strains, including 12 strains isolated from cheeses, revealed differences in genetic determinants involved in the growth on the cheese surface. Some of them are correlated to strain phylogeny and others are the result of gene transfers, especially those involved in iron acquisition and bacteriocin biosynthesis. We identified genomic islands corresponding to transfers of genes involved in iron acquisition between cheese-associated *Brevibacterium* strains and cheese-associated strains belonging to other genera. We also detected a conjugative transposon encoding bacteriocin production, which is present in cheese-associated *Brevibacterium* strains as well as in a cheese-associated *Corynebacterium* strain.

Functional study of biotic interactions between *Brevibacterium* and *Hafnia alvei*, another cheese-ripening bacterium, was performed in a model cheese developed in this study. By coupling microbial, biochemical and transcriptomic (RNA-seq) analyses, we revealed several interaction mechanisms between these bacteria. These concern, in particular, iron acquisition, proteolysis, lipolysis, sulfur metabolism and D-galactonate catabolism. Our findings suggest that in the mutualistic relationship between some *Brevibacterium* strains and *H. alvei*, the latter stimulates *Brevibacterium* growth by the secretion of siderophores, which can be used by *Brevibacterium* to capture iron more efficiently. In return, *Brevibacterium* secretes lipases and proteases, which degrade cheese caseins and triglycerides into energetic substrates that stimulate *H. alvei* growth. This type of interaction is interesting to consider in the formulation of ripening cultures because it results in a better ability of all partners to colonize the cheese, and thus to generate the desired technological properties.

