



**HAL**  
open science

# Etude de la diversité microbienne de produits fermentés traditionnels méditerranéens : olives de table et fromage de chèvre

Marine Penland

## ► To cite this version:

Marine Penland. Etude de la diversité microbienne de produits fermentés traditionnels méditerranéens : olives de table et fromage de chèvre. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2020. Français. NNT : 2020BRES0052 . tel-03615224v2

**HAL Id: tel-03615224**

**<https://theses.hal.science/tel-03615224v2>**

Submitted on 21 Mar 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE

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

Par

**Marine PENLAND**

## **Étude de la diversité microbienne de produits fermentés traditionnels méditerranéens : olives de table et fromage de chèvre**

**Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 2 novembre 2020**

**Unité de recherche : Laboratoire de Biodiversité et Écologie Microbienne (EA 3882), UBO  
Science et Technologie du Lait et de l'Œuf (UMR 1253), INRAE**

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Isabelle MASNEUF-POMAREDE

Professeur, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux

Henry-Éric SPINLER

Professeur, AgroParisTech, Paris

### **Composition du Jury :**

Président : Emmanuel COTON

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Rapporteurs : Isabelle MASNEUF-POMAREDE

Professeur, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux

Henry-Éric SPINLER

Professeur, AgroParisTech, Paris

Examineurs : Anne-Laure ABRAHAM

Ingénieure de Recherche, INRAE, Jouy-en-Josas

Céline DELBÈS

Chargée de Recherche, INRAE, Aurillac

Dir. de thèse : Monika COTON

Maître de Conférences, Université de Bretagne Occidentale, Brest

Co-encadrants : Stéphanie-Marie DEUTSCH

Chargée de Recherche, INRAE, Rennes

Jérôme MOUNIER

Professeur, Université de Bretagne Occidentale, Brest



# Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et me faire profiter ainsi de leur expertise.

Je souhaite également remercier les co-financeurs du projet PROMEDFOODS, l'Agence Nationale de la Recherche et les autres agences européennes, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu.

Ces travaux de thèse n'auraient pu se faire sans l'aide des producteurs partenaires du projet. Mes plus chaleureux remerciements vont à Mme Anne Laurent directrice de la coopérative Vignolis de Nyons pour la bienveillance et l'enthousiasme dont elle a fait preuve tout au long du projet. Je tiens à remercier également Mr Nicolas Lepesteur qui a été mon intermédiaire direct dans le suivi des fermentations et l'envoi des échantillons. Mes plus vifs remerciements également notre partenaire pour l'étude du Pélardon pour nous avoir reçus au sein de son exploitation et partagé avec nous sa passion et son savoir-faire.

Mes remerciements les plus sincères vont bien entendu à mes encadrants. Monika, Stéphanie, Hélène et Jérôme. Vous avez chacun contribué à me faire évoluer, que ce soit par votre approche de la recherche ou nos échanges. Monika, merci pour ton soutien sans faille et ton accompagnement tout au long de ces trois ans. Au-delà de ton encadrement et expertise scientifique indéniable, merci d'avoir su me guider et poussé quand c'était nécessaire. Jérôme, merci pour ta disponibilité, que ce soit pour répondre à mes multiples questions ou relire un document. Merci d'avoir toujours trouvé une solution quand un aléa se présentait. Stéphanie, Hélène, même si cet encadrement a été réalisé en partie à distance, je me suis toujours sentie pleinement épaulée et vous en suis plus que reconnaissante. Stéphanie, merci pour ta disponibilité et ta sagacité qui me forçait à envisager les choses d'une autre manière et voir plus loin. Je pense que cela a été très formateur. Hélène, la bio-informatique a moins de secret pour moi et c'est toi que je le dois. Par ailleurs, merci également pour tous tes conseils avisés, ta rigueur et les discussions formelles et informelles toujours enrichissantes que nous avons eu et qui m'ont permis d'avancer. De manière générale, vous avez été tous les quatre complémentaires et je vous remercie sincèrement de la confiance que vous m'avez accordée et pour votre bienveillance et réactivité en particulier pendant le marathon qu'ont été ces derniers mois. Je garderai par ailleurs d'excellents souvenirs de nos expéditions qu'elles aient été européennes, françaises ou Rennaises.

Travailler dans deux laboratoires peut s'avérer un challenge mais je pense que cela m'a été enrichissant d'un point de vue professionnel et personnel.

Même si je n'ai pas passé autant de temps que souhaité au STLO, je me suis toujours sentie très bien accueillie et je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai croisées lors de mes venues en commençant par son directeur Yves Le Loir. Je tiens également à remercier Laurence pour son aide avec les aléas administratifs qui ont ponctué ces trois années. Je remercie Aurélie, Lucie, Sergine, Émeline et Éric pour leur gentillesse et les pauses déjeuners partagées. Plus particulièrement, Sandrine, merci de m'avoir pris sous ton aile à chacune de mes venues et pour ton aide dans les longues séries d'analyse. J'ai été très contente de travailler avec toi Anne, je te remercie sincèrement pour le temps que tu m'as consacré et pour la pédagogie dont tu as fait preuve. Si j'ai (presque) réussi à dompter R et l'analyse GC-MS, c'est en grande partie grâce à toi. Merci également à Marie-Bernadette pour m'avoir laissé envahir son espace de travail et avoir pris le temps de m'épauler sur les analyses.

Je tiens à remercier Emmanuel Coton, directeur du LUBEM pour m'avoir accueillie en thèse au sein du laboratoire. Merci pour les échanges et discussions enrichissantes que nous avons pu avoir, notamment lors des trajets Rennes- Brest lors des réunions du conseil de l'ED.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel administratif, technique et enseignant que j'ai côtoyé au quotidien et avec qui j'ai partagé de bons moments au détour d'un couloir ou autour d'un café : Florence, Laurence, Anne-Cécile, Karim, Gaëtan B., Gaëtan LF., Marie-Hélène, Franck, Marie-Elisabeth, Jean-Luc, Nolwenn, Valérie, Patrice, Adeline, Flora, Dominique, Catherine. Je tiens à remercier tout particulièrement ceux qui ont par bien des aspects facilité le déroulement de mes travaux : Christophe et Élisabeth pour leur aide précieuse dans les analyses menées sur les olives, Stella pour sa disponibilité au quotidien, Sylvie pour la préparation des milieux, Christelle pour ses multiples conseils toujours empreints de bonne humeur, Marielle pour sa bienveillance et son aide dans la gestion des déplacements et des commandes. Merci également à Alix, Giorgia et Azzurra qui ont travaillé sur ce projet comme stagiaires.

Je tiens à remercier mes camarades doctorants dans ce périple qu'est le doctorat. En particulier, Océane et Mélanie, merci pour les moments précieux passés ces deux dernières années, les fous-rires, les sessions karaoké pour me faire décompresser. Merci également pour votre aide ponctuelle quand les expériences le nécessitaient. Je vous souhaite ainsi qu'à Bastien et Vincent bon courage pour la suite. J'ai également une pensée pour Guillaume pour son soutien et ses conseils même après son départ et pour Irene qui a un temps été ma collègue de bureau. Cette bonne ambiance entre doctorants a été essentielle au cours de ces trois années.









Une thèse peut avoir ses hauts et ses bas et c'est toujours plus facile lorsque l'on est bien entourée par ses collègues de travail. Il y a des personnes qui savent vous redonner le sourire, vous soutenir et vous pousser. Amélie, Audrey, Laura et Maxence, vous en avez fait partie de ces personnes du début à la fin. Amélie, merci pour tes conseils autant techniques que plus personnels, merci de m'avoir toujours fait relativiser et d'avoir été présente. Audrey, une grande partie de ces travaux de thèse n'aurait pu être réalisée sans ton aide et je t'en remercie sincèrement. Ton aide n'a pas été que technique, tu as été un vrai soutien, d'une bonne humeur à toute épreuve. Les heures passées devant le MALDI ou à la paillasse m'ont parues moins longues en ta compagnie et j'ai également beaucoup appris en te regardant faire. Laura, merci pour les bons moments passés ensemble lors de ta dernière année de thèse. Merci pour tes conseils et ton soutien moral bien après que tu aies été diplômée. Maxence, nous avons commencé le même jour et sommes en passe de terminer à quelques semaines d'intervalles. J'ai un peu l'impression que l'on a avancé côte à côte pendant trois ans. Merci pour tes à-peu-près qui ont bien souvent illuminé mes journées, merci d'avoir supporté au quotidien mes sarcasmes et de m'avoir écouté quand j'avais besoin de parler et de décompresser (et c'est arrivé souvent).

Enfin je souhaite remercier ma famille, qui sans toujours comprendre ce sur quoi je travaillais, a compris ce que cela représentait. Je remercie particulièrement mes parents de m'avoir laissé libre de suivre ma voie et de m'avoir soutenu dans tous mes choix et au cours de ma thèse : ces trois dernières années vous avez eu droit au pire et au meilleur de moi-même et j'espère qu'à travers ce travail se reflète un peu du meilleur.

# Avant-propos

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet européen PROMEDFOODS (2017-2021) qui a pour but de promouvoir et valoriser les produits fermentés artisanaux du bassin méditerranéen. Il réunit des équipes de quatre pays européens, l'Espagne, la Grèce, l'Italie et la France, ainsi que de deux pays de l'Afrique du Nord, l'Algérie et la Tunisie. Chaque pays partenaire travaille en étroite collaboration avec un producteur-artisan local sur un produit typique de la région méditerranéenne (**Tableau 1**).

**Tableau 1. Aliments fermentés étudiés dans le cadre du projet Promedfoods**

Aliment fermenté	Type d'aliment	Pays d'origine	Equipe d'étude
Smen/ D'han	Beurre	Algérie	
Galotyri	Fromage	Grèce	
Varé	Fromage frais	Espagne	
Castelmagno	Fromage	Italie	
<b>Pélardon</b>	<b>Fromage</b>	<b>France</b>	
<b>Olives de Nyons</b>	<b>Olives</b>	<b>France</b>	
Meski	Olives	Tunisie	
Salame piemonte	Saucisse	Italie	

La stratégie globale du projet vise à valoriser des productions au niveau local en s'appuyant sur:

- une connaissance détaillée des communautés microbiennes de chaque produit ;
- une meilleure maîtrise de ces ressources microbiennes ;
- une valorisation de ces ressources au profit de la fermentation.

Mes travaux de thèse consistaient à réaliser l'étude de deux aliments fermentés traditionnels originaires du sud de la France et fabriqués par fermentation naturelle :

- Les olives de Nyons, produites par la coopérative Vignolis située à Nyons
- Le Pélardon, un fromage au lait cru de chèvre des Cévennes fabriqué par un producteur fermier dont l'exploitation est située dans la Drôme

Ce manuscrit rend compte de l'ensemble des études réalisées sur chacun de ces deux aliments fermentés et est structuré en quatre parties.

La première partie consiste en une **introduction générale** du sujet. Elle propose une introduction bibliographique autour des produits fermentés traditionnels, des méthodes d'études des communautés microbiennes et une synthèse des connaissances actuelles sur la microbiologie de chacun des aliments fermentés étudiés. La **problématique** et les **objectifs** précis des travaux de thèse appliqués à ces deux produits sont exposés à l'issue de la partie introductive.

La deuxième partie « **Résultats** » comprenant les études menées est découpée en trois chapitres. Le chapitre I retranscrit l'étude de la diversité microbienne du Pélardon, le chapitre II se focalise sur la diversité microbienne des olives de Nyons tandis que le chapitre III consiste en une étude préliminaire de l'exploitation de micro-organismes autochtones dans le cadre de fermentations dirigées des olives de Nyons. Chaque chapitre intègre un ou plusieurs articles scientifiques rédigés en anglais.

La troisième partie propose une **discussion** des principaux résultats et conclusions obtenus suite aux études des deux aliments fermentés et des perspectives de travaux sont également envisagées.

Enfin, la quatrième et dernière partie « **Valorisations scientifiques** » rassemble les communications orales et écrites réalisées au cours de ces travaux de thèse.

# Table des matières

Avant-propos.....	5
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>11</b>
I. Les aliments fermentés.....	12
II. Les méthodes d'étude des communautés microbiennes.....	23
III. Microbiologie des fromages au lait cru.....	40
IV. Microbiologie des olives de table.....	50
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>63</b>
<b>Chapitre I - Étude de la diversité microbienne du Pélardon .....</b>	<b>65</b>
I. Résumé des travaux.....	67
II. Présentation du Pélardon.....	74
III. Article soumis à International Journal of Food Microbiology .....	80
IV. Annexe 1 - Process environmental sampling campaign.....	137
V. Annexe 2 - Validation des étapes d'extraction et d'amplification pour des analyses métagénomiques.....	138
<b>Chapitre II - Étude de la diversité microbienne des olives de Nyons.....</b>	<b>143</b>
I. Présentation des olives de Nyons .....	146
II. Étude 1 - caractérisation de la diversité microbienne des olives de Nyons .....	152
III. Article publié dans Frontiers in microbiology .....	156
IV. Étude 2 – Influence de l'environnement de production sur le microbiote des olives de Nyons .....	187
V. Article 3 soumis à Food Research International .....	191
VI. Annexe 1 - Validation des étapes d'extraction et d'amplification pour les analyses métagénomiques.....	230
VII. Annexe 2 – Position phylogénétique de <i>Celerinatantimonas diazotrophica</i> .....	234
<b>Chapitre III - Exploitation des ressources microbiennes autochtones au profit de la fermentation .....</b>	<b>237</b>
I. Résumé des travaux.....	239
II. Article 4 en préparation.....	245
<b>DISCUSSION GÉNÉRALE &amp; PERSPECTIVES .....</b>	<b>281</b>
<b>VALORISATIONS SCIENTIFIQUES.....</b>	<b>295</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>305</b>



# Liste des illustrations

<b>Figure 1.</b> Historique de la fermentation des aliments.....	<b>13</b>
<b>Figure 2.</b> Approches culture-dépendante et indépendante appliquées à l'étude des communautés microbiennes .....	<b>24</b>
<b>Figure 3.</b> Principe des méthodes de spectrométrie appliquées à l'identification de micro-organismes. (A) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (B) Spectrométrie de masse MALDI-TOF .....	<b>29</b>
<b>Figure 4.</b> Représentations schématiques du (A) gène codant l'ARNr 16S chez les bactéries et (B) de la région ITS chez les champignons.....	<b>32</b>
<b>Figure 5.</b> Schéma de préparation des olives de table selon les trois méthodes les plus couramment utilisées.....	<b>51</b>
<b>Figure 6.</b> Échantillonnage réalisé pour l'étude du Pélardon .....	<b>69</b>
<b>Figure 7.</b> Pélardon cheese typical aspect.....	<b>74</b>
<b>Figure 8.</b> Production area of PDO Pélardon cheese .....	<b>75</b>
<b>Figure 9.</b> Pélardon cheese making process diagram.....	<b>77</b>
<b>Figure 10.</b> Pélardon cheese production steps .....	<b>79</b>
<b>Figure 11.</b> Courbes de raréfactions des données de séquençage.....	<b>139</b>
<b>Figure 12.</b> Représentation graphique des indices de diversité alpha (Richesse et Chao1) des communautés bactériennes d'échantillons de Pélardon en fonction de la prise d'essai pour l'extraction .....	<b>140</b>
<b>Figure 13.</b> Composition des communautés bactériennes des échantillons de cœur, croûte et de caillé de Pélardon obtenus après amplification ciblée d' ADN microbien. ....	<b>141</b>
<b>Figure 14.</b> Nyons table olives.....	<b>146</b>
<b>Figure 15.</b> Production are of Tanche cultivar growth and Nyons table olive production .	<b>147</b>
<b>Figure 16.</b> Preparation of Nyons table olives in Vignolis cooperative .....	<b>149</b>
<b>Figure 17.</b> Fermentation vats preparation at Vignolis cooperative. ....	<b>149</b>
<b>Figure 18.</b> Comparaison diversité alpha des échantillons selon le kit d'extraction utilisé	<b>231</b>
<b>Figure 19.</b> Représentations graphiques de la diversité alpha en fonction des deux variables étudiées, le kit d'extraction (A) et les amorces ITS2 (B) utilisées. ....	<b>233</b>
<b>Figure 20.</b> Position phylogénétique de <i>Celerinatantimonas diazotrophica</i> .....	<b>234</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Aliments fermentés étudiés dans le cadre du projet Promedfoods.....	<b>5</b>
<b>Tableau 2.</b> Types de fermentation selon les métabolites produits.....	<b>16</b>
<b>Tableau 3.</b> Exemples d'aliments fermentés à travers le monde .....	<b>18</b>
<b>Tableau 4.</b> Comparaison des méthodes de production industrielle et artisanale des produits fermentés .....	<b>21</b>
<b>Tableau 5.</b> Champs d'applications de la métagénomique à l'étude des communautés microbiennes .....	<b>37</b>
<b>Tableau 6.</b> Comparaison des avantages et limites des approches culture-dépendante et -indépendante.....	<b>39</b>
<b>Tableau 7.</b> Principales voies métaboliques impliquées dans les caractéristiques organoleptiques des fromages .....	<b>47</b>
<b>Tableau 8.</b> Exemples de procédés spécifiques de préparation d'olives de table .....	<b>53</b>
<b>Tableau 9.</b> Bactéries lactiques fréquemment identifiées au cours de la fermentation des olives .....	<b>55</b>
<b>Tableau 10.</b> Levures fréquemment impliquées dans la fermentation des olives.....	<b>56</b>
<b>Tableau 11.</b> Characteristics of the Pélardon cheese according to the PDO syndicate and its producers .....	<b>74</b>
<b>Tableau 12.</b> Résultats des tests d'Analyse de la Variance sur la diversité alpha des communautés fongiques des différents échantillons en fonction des paramètres d'extraction et d'amplification testés. ....	<b>141</b>
<b>Tableau 13.</b> Nyons table olive characteristics based on the PDO specification and the “French Code of fair practice for table olives” .....	<b>146</b>
<b>Tableau 14.</b> Microbiological criteria for table olives according to UE regulation and the Code of faire practices for table olives.....	<b>150</b>
<b>Tableau 15.</b> Analyse de la diversité alpha et beta des communautés bactériennes selon les différentes variables expérimentales. ....	<b>232</b>
<b>Tableau 16.</b> Résultats des tests d'Analyse de la Variance sur la diversité alpha des communautés fongiques des différents échantillons en fonction des paramètres d'extraction et d'amplification testés. ....	<b>232</b>

# Liste des abréviations

**ADN** Acide désoxyribonucléique  
**AOP** Appellation Origine Protégée  
**ARN** Acide ribonucléique  
**ARNr** Acide ribonucléique ribosomique  
**CE** Commission européenne  
**CO<sub>2</sub>** Dioxyde de carbone  
**GC-MS** Gaz Chromatography Mass Spectrometry  
**GRAS** Generally Recognized As Safe  
**HPLC** High Performance Liquid Chromatography  
**H<sub>2</sub>S** Sulfure d'hydrogène  
**IRTF** Infrarouge à Transformée de Fourier  
**ITS** Internal Transcribed Spacer (espaceur interne transcrit)  
**LAB** Lactic Acid Bacteria (Bactéries lactiques)  
**LC-Qtof MS** Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry  
**MALDI-TOF** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight  
**MDS** Multi-dimensional Scaling  
**NGS** Next Generation Sequencing  
**NSLAB** Non Starter lactic acid bacteria  
**OTU** Operational Taxonomic Unit  
**PCA** Principal component analysis  
**PCoA** Principal correspondence analysis  
**PCR** Polymerase Chain Reaction  
**RAPD** Random Amplified Polymorphic DNA  
**SLAB** Starter Lactic Acid Bacteria  
**VBNC/ VNC** Viable Non Cultivable  
**VOC** Volatile Organic Compound

---

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

# **I. Les aliments fermentés**

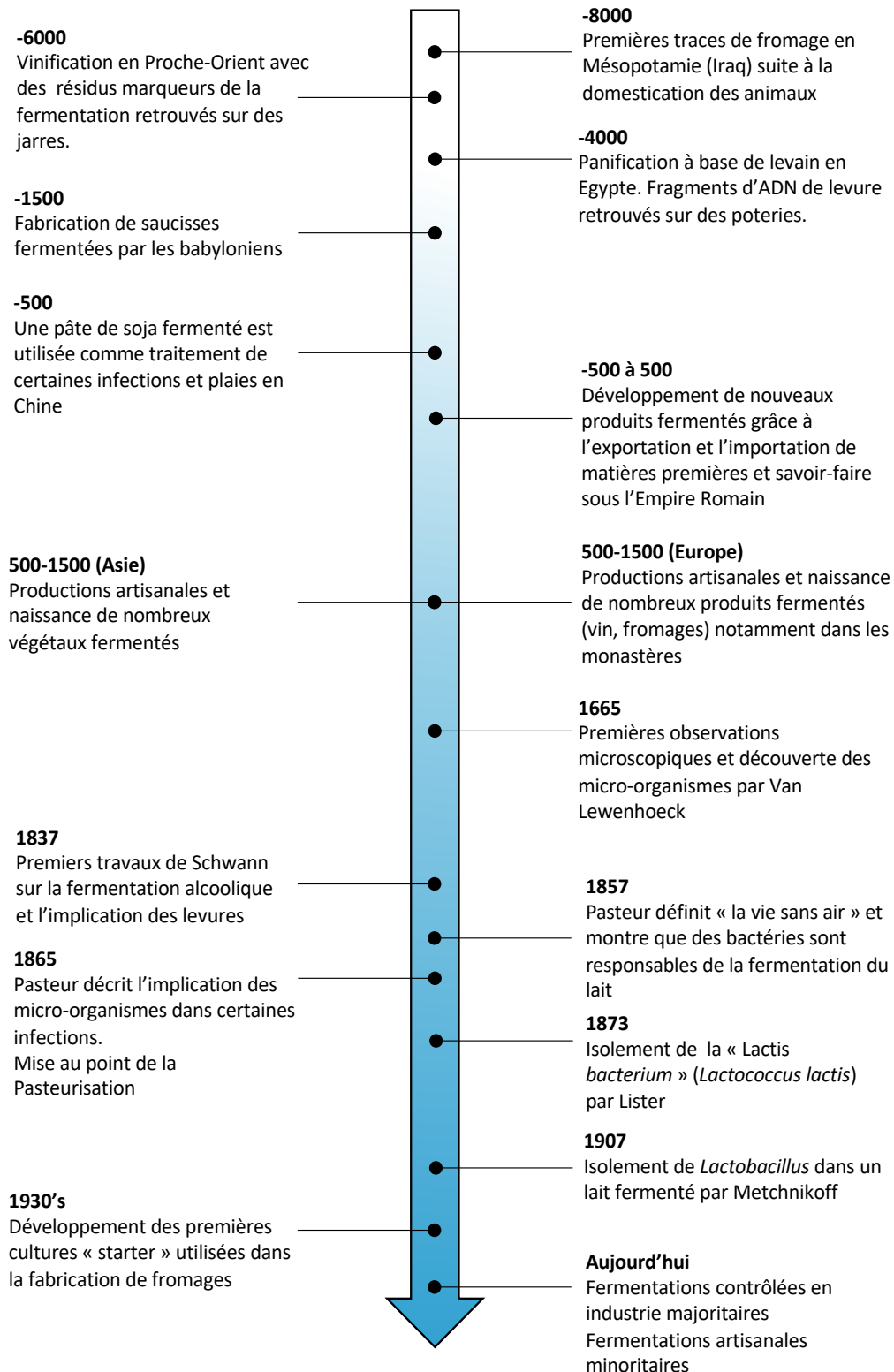
## **1. Généralités sur la fermentation**

### **1.1. Principe de la fermentation**

La fermentation alimentaire peut être définie comme la transformation biochimique d'une matière première en un aliment complexe sous l'action de micro-organismes. Ce procédé biologique peut s'appliquer à de nombreuses matières premières, animales comme végétales, et fait intervenir trois principaux groupes de micro-organismes : les bactéries, les levures et les champignons filamenteux (Haard, 1999). Ces micro-organismes peuvent agir en parallèle ou de manière séquentielle. Au cours de la fermentation, ils utilisent les composants des matières premières (sucres, matières grasses et protéines) comme source d'énergie et, par conversion enzymatique, synthétisent des métabolites très variés (Ansorena and Astiasarán, 2016; Kim et al., 2016). Ces métabolites vont modifier les caractéristiques des matières premières et contribuer à leur meilleure conservation tout en améliorant leurs propriétés organoleptiques (texture, flaveur et odeur) et nutritionnelles (Holzapfel, 1997; Smid and Hugenholtz, 2010). Ainsi, l'aliment fermenté obtenu présente généralement une plus grande complexité biochimique et des qualités supérieures à la matière première dont il dérive.

### **1.2. Histoire de la fermentation et des aliments fermentés**

La fermentation compte parmi les plus anciens procédés de conservation et de stockage des denrées périssables. Les premières traces de fermentations fromagères remontent à -8000 ans avec la découverte d'ustensiles et de contenants ayant probablement servi à la fabrication de fromages en Iraq (Fox, 1993) (**Figure 1**). Les plus anciennes traces de la vinification et de la panification remontent quant à elles à -6000 et -4000 ans respectivement. Des vertus thérapeutiques étaient également attribuées aux aliments fermentés depuis l'Antiquité: Hippocrate en Grèce Antique recommandait de consommer des produits fermentés. En Chine, vers -500, des pâtes de soja fermenté étaient prescrites comme médicament pour le traitement des plaies (Hutkins, 2008).



**Figure 1. Historique de la fermentation des aliments (Sources : Fox et al., 1993 ; Barrett et al., 2003 ; Bernardeau et al., 2006 ; Hutkins et al., 2008 ; Tamang et al., 2016 )**

Si le procédé de fermentation est né par hasard et s'est développé et transmis par la suite de manière empirique, les avancées scientifiques du XVII<sup>e</sup> puis du XIX<sup>e</sup> siècle ont permis de mieux comprendre ce phénomène et de mettre en lumière le rôle des micro-organismes. Louis Pasteur sera ainsi le premier à mettre en évidence l'application des micro-organismes dans

les fermentations alimentaires en 1861, suivi par John Lister en 1877 qui démontrera le rôle d'une bactérie dans la fermentation du lait baptisée « *Bacterium lactis* » (plus tard renommée *Lactococcus lactis*). La définition de la fermentation comme « la vie sans air » par Louis Pasteur dans la même période et les travaux qui suivront, amèneront au début du XX<sup>e</sup> siècle à l'application de la microbiologie à la fermentation avec le développement de cultures et de la fermentation à l'échelle industrielle.

Les aliments fermentés sont donc consommés depuis des milliers d'années par l'Homme qui en a progressivement découvert et expliqué les nombreuses propriétés.

### **1.3. Propriétés des aliments fermentés**

#### **a. Propriétés de conservation**

Comme retranscrit à travers l'historique, la conservation des aliments est la fonction première de la fermentation. Elle assure une stabilisation du produit en agissant sur le pH et l'activité de l'eau ( $a_w$ ) de l'aliment. Il est aujourd'hui établi que la conservation des aliments par la fermentation est ainsi assurée par la production d'acides organiques, d'alcools mais également de composants antimicrobiens comme les bactériocines qui vont limiter le développement de micro-organismes délétères comme des pathogènes ou des micro-organismes d'altération (Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015).

#### **b. Propriétés organoleptiques**

Une conséquence secondaire de l'activité des micro-organismes sur les matières premières est la modification des propriétés organoleptiques de l'aliment. Les aliments fermentés présentent souvent un profil organoleptique différent des matières premières dont ils dérivent. L'action des micro-organismes peut ainsi modifier de manière importante la texture et l'aspect visuel comme c'est le cas pour la transformation du lait en fromage. Le plus fréquemment, la fermentation change drastiquement les arômes et saveurs des produits. Par exemple, les olives à la récolte sont naturellement amères. Après fermentation, l'amertume a diminué suite à une dégradation des composés phénoliques naturellement présents dans les fruits et les olives deviennent ainsi comestibles. Les modifications des profils aromatiques au cours de la fermentation sont nombreuses et sont engendrées par la production d'acides, de peptides mais aussi de composés organiques volatils (VOC). Ces composés de faibles poids moléculaires incluent les alcools, les cétones et les esters qui vont

apporter des notes plaisantes fruitées, beurrées ou à l'inverse plus terreuses, piquantes selon leur nature. Toutes ces molécules participent aux caractéristiques de chaque produit fermenté et à leur typicité. Ces différents métabolites sont issus des activités enzymatiques (protéolytique, lipolytique, etc) microbiennes en association avec la composition initiale des matières premières.

### **c. Propriétés nutritionnelles et bénéfiques sur la santé**

Les bénéfices de la fermentation ne se limitent pas aux aspects gustatifs. Le procédé peut aussi améliorer les propriétés nutritionnelles ou fonctionnelles des aliments. De nombreux travaux se sont intéressés à l'identification de composés bioactifs lors de la fermentation et l'implication des micro-organismes dans leur synthèse (Septembre-Malaterre et al., 2018; Tamang et al., 2016a). Ainsi la flore microbienne associée aux produits fermentés contribuerait par exemple à :

- (i) dégrader des composés anti-nutritifs naturellement présents dans certains légumes (Tamang et al., 2016b) ;
- (ii) améliorer la digestibilité de l'aliment en dégradant certains sucres (lactose, xylose) comme c'est le cas dans les produits fermentés laitiers (Tamang, 2010) ;
- (iii) favoriser la disponibilité de certains nutriments en produisant des vitamines et des minéraux (Hwang et al., 2017) ;
- (iv) produire des composés antioxydants ;
- (v) préserver la santé gastro-intestinale grâce à des propriétés probiotiques comme en possèdent certaines bactéries lactiques.

### **d. Attentes autour des aliments fermentés**

Les avantages de la fermentation sont donc multiples et non sans lien avec l'engouement actuel des consommateurs. On assiste, par ailleurs, à une recrudescence des recherches ces dernières années notamment autour des aliments fermentés traditionnels. Il est important de noter que l'importance d'une propriété des aliments fermentés peut toutefois différer d'une région du monde à une autre. En Europe et en Occident, les produits fermentés sont de nos jours particulièrement mis en avant pour leurs bénéfices sur la santé humaine tandis que dans les pays en voie de développement la problématique de la conservation des aliments en lien avec leur qualité sanitaire est toujours d'actualité (Motarjemi, 2002). En revanche, au niveau mondial, les propriétés sensorielles particulières des aliments fermentés restent au premier



plan et expliquent également la place de ces produits dans la culture et le quotidien quelle que soit la région du monde.

## 2. Diversité des aliments fermentés

### 2.1. Les différents types de fermentation

A travers le monde, plus de 5000 aliments fermentés seraient recensés (Tamang et al., 2017). Ces aliments diffèrent les uns des autres par la matière première initiale, les conditions de fermentations, les micro-organismes impliqués et les métabolites produits. La classification en fonction des métabolites produits est la plus proche de la définition de la fermentation au sens biochimique du terme : la dégradation de matières organiques pour produire de l'énergie aux cellules, le plus souvent en l'absence d'oxygène ou anaérobie. On distingue ainsi la fermentation alcoolique, lactique, malo-lactique, alcaline, acétique et propionique (Tableau 2).

**Tableau 2. Types de fermentation selon les métabolites produits**

Type de fermentation	Substrat	Produit(s) majeur(s)	Micro-organismes majeurs
<b>Lactique</b>	lactose, glucose	acide lactique	Bactéries lactiques
<b>Acétique</b>	éthanol	acide acétique	Bactéries acétiques (genre <i>Acetobacter</i> )
<b>Alcoolique</b>	glucose	éthanol	Levures
<b>Alcaline</b>	protéines	ammoniac et acides aminés	Champignons filamenteux, <i>Bacillus</i> spp.
<b>Malo-lactique</b>	acide malique	acide lactique	Bactéries lactiques (genre <i>Oenococcus</i> )
<b>Propionique</b>	acide lactique	acide propionique	Bactéries propioniques (genre <i>Propionibacterium</i> )

Steinkraus (1997) proposa une classification dérivée, sur la base de ces éléments et des caractéristiques finales de l'aliment. Il distingua sept types de fermentations : les végétaux et céréales fermentés en mélange, les aliments fermentés à forte teneur en sel et acides aminés (sauce soja), les fermentations lactiques, les fermentations alcooliques, la fermentation acétique, les aliments obtenus par fermentation alcaline et les pains au levain.

Ces types de classification ont certaines limites. Elles sont laborieuses et impliquent également qu'un seul type de micro-organismes ou qu'une seule réaction intervienne lors de la fermentation. Or les aliments fermentés sont le résultat de procédés complexes mettant en

jeu diverses réactions métaboliques en cascade. Une des classifications les plus communément utilisée repose sur la nature de la matière première ou substrat utilisé. De plus, cette classification reflète particulièrement la diversité des produits à travers le monde.

## 2.2. Les produits fermentés dans le monde

Les aliments fermentés peuvent être classés en six catégories : les aliments fermentés laitiers (fromages, laits et beurres fermentés, yaourts), carnés (viande), céréaliers, les aliments fermentés à base de poisson, les légumes/légumineuses fermentés, les fruits fermentés.

Comme évoqué précédemment, les aliments fermentés ont toujours fait partie intégrante de la vie de l'Homme et de sa culture. La plupart des types d'aliments fermentés précités sont retrouvés dans le monde entier. En revanche, même au sein de chaque catégorie, une grande diversité de produits existe en fonction de la nature des matières premières, du matériel et des procédés utilisés. Cette diversité se reflète également entre les régions du monde où le climat, l'importance de certaines productions agricoles mais également les traditions et la culture ont influencé le développement des aliments fermentés (Tamang et al., 2020). À ce titre, le **Tableau 3** propose quelques exemples de produits fermentés à travers le monde.

Les produits fermentés originaires d'Asie sont souvent obtenus à partir de riz ou de soja, les produits fermentés originaires d'Afrique reposent en majorité sur la fermentation de céréales comme le millet, le sorgho, le blé ou le manioc. Enfin, les produits laitiers sont particulièrement représentés en Europe où l'élevage d'ovins et de bovins s'est fortement développé au cours de l'Histoire. Les régions autour du bassin méditerranéen et notamment dans la partie ouest (Espagne, Italie, Sud de la France, Algérie, Tunisie, Maroc) ont en commun une longue tradition d'élevage de petits ruminants (caprins, ovins) et de pastoralisme en raison des massifs escarpés mais aussi de cultures arboricoles. Ces pays ont vu se développer de nombreux produits laitiers, carnés et végétaux fermentés parmi lesquels les fromages et les olives de tables qui seront abordés en détail en partie III et IV de cette introduction bibliographique.

**Tableau 3. Exemples d'aliments fermentés à travers le monde (Sources: Chilton et al., 2015; Tamang et al., 2020)**

Aliment fermenté	Catégorie (matière première)	Localité d'origine	Groupes microbiens	Fermentation majeure
Pain au levain	Céréales (blé)	Monde	Levures	Alcoolique
Sauce soja	Légumineuses (graines de soja)	Asie	Champignons filamenteux ( <i>Aspergillus oryzae</i> ), bactéries lactiques	Alcaline puis lactique
Olives de table	Fruits (olives vertes ou noires)	Méditerranée	Bactéries lactiques, levures	Lactique
Choucroute	Légumes (chou)	Chine	Bactéries lactiques	Lactique
Kefir	Lait	Russie	Bactéries lactiques, levures	Lactique, alcoolique
Smen	Lait (beurre)	Maghreb, Méditerranée	Bactéries lactiques, levures	Lactique
Saucisson sec	Carnés (viande de bœuf)	Méditerranée	Bactéries lactiques, Staphylocoques à coagulase négative, levures, champignons filamenteux	Lactique
Gari	Légumes (manioc)	Afrique de l'Ouest	Bactéries lactiques, levures	Lactique
Natto	Légumineuses (graines de soja)	Asie	<i>Bacillus subtilis</i>	Alcaline
Fromages affinés	Lait (vache, brebis, chèvre)	Monde	Bactéries lactiques, levures, champignons filamenteux	Lactique
Kimchi	Légumes (chou, oignons)	Asie (Corée)	Bactéries lactiques	Lactique
Vin	Boissons fermentées (fruits)	Monde	Levures, bactéries lactiques	Alcoolique, malo-lactique
Vinaigre	Fruits (raisins, pomme...)	Monde	Bactéries acétiques	Acétique
Kombucha	Boissons fermentées (thé sucré)	Asie	Bactéries lactique, acétiques, levures	Lactique, acétique, alcoolique

<b>Aliment fermenté</b>	<b>Catégorie (matière première)</b>	<b>Localité d'origine</b>	<b>Groupes microbiens</b>	<b>Fermentation majeure</b>
Tempeh	Légumineuse (soja)	Inde	Champignons filamenteux ( <i>Rhizopus oligosporus</i> )	Alcoolique
Bière	Boissons fermentées (houblon, malte)	Monde	Levures, bactéries lactiques	Alcoolique
Ogi	Céréales (maïs)	Afrique de l'Ouest	Champignons filamenteux, levures, bactéries lactiques	Lactique
Cornichon	Légumes (concombre)	Monde	Bactéries lactiques, levures	Lactique
Sake	Boissons fermentées (riz)	Japon	Champignons filamenteux, levures	Alcoolique
Cacao	Fèves de cacao	Amérique du sud, Afrique de l'Est	Levures, bactéries lactiques, bactéries acétiques	Lactique, acétique
Yaourt	Lait	Europe, Amérique du Nord	Bactéries lactiques	Lactique
Chhu	Lait (yak)	Inde, Népal	Bactéries lactiques, levures	Lactique
Mesu	Légumes (racine de bambou)	Inde	Bactéries lactiques	Lactique
Miso	Légumineuses (soja)	Japon	Bactéries lactiques, Levures	Alcaline puis lactique
Tapai ubi	Légumes (tapioca)	Indonésie	Levures, champignons filamenteux	Alcoolique
Chorizo	Carnés (viande de porc)	Espagne	Bactéries lactiques, Staphylocoques à coagulase négative	Lactique
Pastirma	Carnés (viande de bœuf)	Turquie	Bactéries lactiques, Staphylocoques à coagulase négative	Lactique

Autour du bassin méditerranéen, les aliments fermentés revêtent donc une importance particulière et représentent une part non négligeable du régime alimentaire méditerranéen, reconnu comme patrimoine mondial par l'UNESCO en 2010 (Saulle and La Torre, 2010). Le régime méditerranéen est un régime alimentaire commun aux pays du bassin méditerranéen qui repose sur les principes suivants : une consommation abondante de fruits, légumineuses, céréales, une consommation modérée de produits laitiers d'origine diverses (fromages au lait de chèvre, de brebis) et une consommation faible de poisson et de viande. Au-delà de ces considérations purement nutritionnelles, le régime méditerranéen est également construit autour d'« un ensemble de savoir-faire, de connaissances, de traditions qui concernent la culture, la récolte, la pêche, l'élevage, la préparation et la conservation des aliments » (Moro, 2016).

Si, au fil des siècles, les procédés et aliments fermentés se sont transmis d'une région à une autre, le savoir-faire et l'héritage associés à ces produits fermentés restent très ancrés localement.

### **3. Les aliments fermentés traditionnels : cas des fermentations naturelles**

#### **3.1. Les fermentations dites « naturelles »**

Les aliments fermentés traditionnels désignent les aliments produits selon un savoir-faire particulier transmis de génération en génération et empreints de la culture locale (Guerrero et al., 2009). En cela, les fermentations traditionnelles sont plus proches des aliments fermentés ancestraux par comparaison aux produits fermentés industriels et reposent plus fréquemment sur des fermentations naturelles.

Les fermentations « naturelles » ou « spontanées » sont les fermentations qui reposent en partie ou intégralement sur les micro-organismes autochtones, c'est-à-dire naturellement présents sur les matières premières ou dans l'environnement de production et de stockage. Une variante de cette pratique consiste en la fermentation par *backslopping* ou « ensemencement traditionnel ». Ce procédé consiste à ajouter à la matière première une portion de l'aliment fermenté issu de la production précédente afin d'en amorcer la fermentation en y apportant les micro-organismes nécessaires (Demarigny et al, 2014). Si cela s'apparente à une inoculation, il faut souligner que d'une part, la flore microbienne

apportée est constituée de micro-organismes indigènes et d'autre part, sa composition microbienne n'est pas définie. La fermentation par *backslopping* est aujourd'hui toujours utilisée en France et en Italie, pour la préparation de produits fermentés traditionnels de certains fromages notamment au lait cru (Pélardon, Rocamadour, Parmigiano Reggiano), des pains au levain, de la choucroute ou *Sauerkraut* (Di Cagno et al., 2008), le kombucha (Coton et al., 2017) et couramment utilisée dans de nombreux pays en Asie et Afrique mais aussi en Europe, pour la production de produits fermentés à l'échelle locale.

### 3.2. Productions traditionnelles versus productions industrielles

Aujourd'hui, particulièrement dans les pays occidentaux, l'essor de l'industrie agro-alimentaire et du progrès scientifique dans ce domaine ont conduit à la raréfaction des productions traditionnelles au profit des productions industrielles des aliments fermentés. La production de ces derniers repose souvent sur des matières premières parfaitement caractérisées, des flores microbiennes définies et un processus optimisé et maîtrisé. Comme présenté en **Tableau 4**, les procédés s'opposent par de nombreux aspects qui s'articulent autour de deux priorités majeures de ces derniers siècles : le rendement économique et la qualité sanitaire des aliments.

**Tableau 4. Comparaison des méthodes de production industrielle et artisanale des produits fermentés (adapté de Hutkins, 2008)**

Critère	Production artisanale	Production industrielle
<b>Capacité production</b>	petite échelle	grande échelle
<b>Environnement de production</b>	septique, ouvert	aseptique, fermé
<b>Matières premières</b>	brutes	standardisées
<b>Traitement des matières premières</b>	non stérile	stérile (pasteurisation, traitement thermique)
<b>Élaboration</b>	manuelle	automatisée
<b>Contamination</b>	Exposition plus élevée	exposition plus restreinte
<b>Inoculation, usage cultures starters</b>	limité (ou backslopping)	recours intensif
<b>Qualité production</b>	plus variable	constante
<b>Diversité microbienne</b>	riche	plus réduite

Les étapes d'élaboration des aliments traditionnels reposent de manière générale sur un savoir-faire technique nécessitant dans la plupart des cas une intervention humaine importante, ce qui est peu compatible avec une production de masse. Une seconde

considération, est liée à la constance de la qualité de la production et la qualité sanitaire des produits. La production d'aliments fermentés traditionnels est particulièrement dépendante de la qualité des matières premières. Les conditions d'élaboration et l'utilisation de matières premières brutes peuvent limiter le contrôle exercé sur la vitesse et le rendement de la fermentation. Les produits fermentés finaux sont ainsi plus fortement influencés par l'environnement (production et stockage) et dans le cas des fermentations naturelles, des micro-organismes présents. De fait, dans la majeure partie des cas, il peut en résulter une qualité de production variable.

A l'inverse, pour pallier ces risques, la fermentation industrielle se base sur une standardisation des matières premières autant biochimique (on peut notamment citer la standardisation protéique du lait) que microbienne. Les procédés de fabrication peuvent inclure une étape de stérilisation/pasteurisation des matières premières et l'usage intensif de cultures microbiennes définies comme moteur de la fermentation, dites cultures starters. De surcroît, les micro-organismes inoculés à travers ces cultures sont souvent isolés de matrices semblables et donc bien adaptés aux substrats, leurs activités métaboliques sont parfaitement caractérisées et sélectionnées pour leurs propriétés technologiques. La régularité de la production et l'incidence de contaminants s'en trouvent indéniablement améliorées et permettent de répondre à la demande croissante de produits sûrs pour la consommation humaine et d'assurer la conformité aux critères réglementaires auxquels sont soumis au niveau national et international les denrées alimentaires (Regulation (EC) No 2073/2005, 2005).

Néanmoins, une conséquence secondaire induit une homogénéisation et standardisation des goûts (Kwon, 2017) dans la mesure où les cultures inoculées sont commercialisées et sont applicables dans le monde entier et pour des produits différents.

### **3.3. Place et devenir des produits fermentés traditionnels**

Les aliments fermentés traditionnels sont donc souvent limités à une production plus confidentielle, notamment en France. Toutefois, ces dernières décennies, les consommateurs retournent vers des produits naturels, moins transformés. Plusieurs études ces dernières décennies se sont intéressées à la perception des aliments traditionnels dans la société (Almli et al., 2011; Caputo et al., 2018; Kupiec and Revell, 1998). Deux d'entre elles, menées dans six pays européens dont la France, ont ainsi mis en évidence que les trois principaux moteurs de consommation d'aliments traditionnels étaient la typicité sensorielle, la dimension

« familière » et la connotation « naturelle » liée au produit (Guerrero et al., 2009; Pieniak et al., 2009). Si ces deux derniers aspects sont empreints de subjectivité, des études comparatives ont montré que les produits fermentés traditionnels présentaient des profils aromatiques supérieurs à ceux de leurs équivalents industriels (Scintu and Piredda, 2007) en lien avec l'action combinée de micro-organismes spécifiques sur des matières premières particulières.

Pour promouvoir et préserver ces produits, des initiatives à différents niveaux ont vu le jour et notamment en Europe avec la création des labels de qualité « Appellation d'Origine Protégée » (AOP ou PDO pour Protected Designation of Origin). Ce label a pour but de protéger des « produits qui ont été transformés et élaborés dans une aire géographique déterminée, en mettant en œuvre le savoir-faire reconnu de producteurs locaux et des ingrédients provenant de la région concernée » et concerne de nombreux produits fermentés comme des fromages, des viandes et des fruits-légumes fermentés.

En lien avec ces labels de qualités, Spano and Capozzi, (2011) s'interrogeaient sur la notion de « micro-organismes du terroir » argumentant que des micro-organismes spécifiques étaient nécessaires au développement des caractéristiques de certains de ces produits au même titre que certaines pratiques déjà prises en compte dans les labels. Si les cahiers des spécifications relatives à chaque produit AOP incluent de nombreux paramètres telles que l'aire géographique de production, la provenance et nature des matières premières ainsi que les différentes étapes de fabrication, il est rarement fait explicitement mention des micro-organismes malgré leur importance.

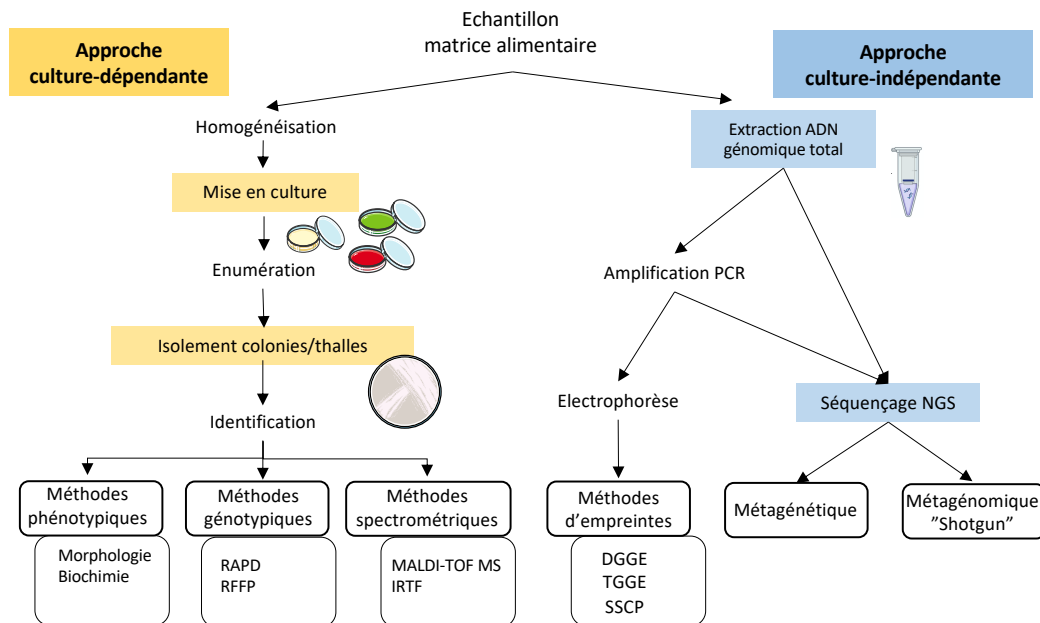
Ces dernières années ont donc vu une prise de conscience de la richesse des produits fermentés traditionnels avec un intérêt croissant pour les communautés microbiennes de ces produits et la complexité et la diversité qu'ils renferment (De Angelis et al., 2015; Greppi et al., 2015). Compte-tenu de l'importance de ces communautés dans la fermentation des aliments, il est nécessaire de caractériser et d'identifier au mieux les micro-organismes qui interviennent.

## **II. Les méthodes d'étude des communautés microbiennes**

Depuis l'avènement de la microbiologie et les premières observations microscopiques de micro-organismes par Leeuwenhoek au XIXe siècle, les méthodes d'étude des communautés microbiennes se sont fortement développées. Aujourd'hui, on distingue deux



approches majeures : l'approche culture-dépendante et l'approche culture-indépendante (**Figure 2**). Comme leur nom le laisse transparaître, elles diffèrent par l'existence ou non d'une phase de culture sur boîte de Pétri des micro-organismes, mais également sur les méthodes d'identification des micro-organismes en aval. Cette partie propose une présentation de ces méthodes, de leurs apports à l'analyse des produits fermentés et une comparaison de leurs limites et avantages respectifs.



**Figure 2. Approches culture-dépendante et indépendante appliquées à l'étude des communautés microbiennes**

## 4. Approche culture-dépendante

### 4.1. Isolement des micro-organismes : cultivabilité et sélectivité des milieux

L'étude de la diversité microbienne par approche culture-dépendante représente l'approche classique de la microbiologie. Elle consiste à étaler un échantillon environnemental ou alimentaire sur différents milieux de culture en vue d'en dénombrer les populations microbiennes en présence et/ou d'en isoler certains représentants.

Les milieux de cultures utilisés en routine en laboratoire sont des milieux synthétiques de composition et pH définis. Ils contiennent des éléments nutritifs nécessaires à la croissance de micro-organismes donnés (source d'azote, de carbone, autres nutriments ou facteurs de croissance). En fonction de leur composition, les milieux vont être plus ou moins favorables à certains groupes ou genres microbiens. Ainsi, les milieux dits sélectifs vont permettre de

cibler certains micro-organismes spécifiques en intégrant dans leur composition des éléments favorisant leur croissance mais surtout des éléments inhibant la croissance des autres populations. Outre la composition, le caractère sélectif d'un milieu est accru par les conditions d'incubation (température et durée). Sur ce principe, des milieux de cultures ont été développés pour dénombrer les principaux groupes microbiens retrouvés dans les aliments dont les produits fermentés tels que les lactocoques, les lactobacilles, les champignons, les entérobactéries mais aussi les pathogènes (*Listeria* spp., Salmonelles). Il est intéressant de préciser que ces milieux génériques et méthodes de dénombrements sont actuellement considérés comme des méthodes de référence pour évaluer la qualité microbiologique sanitaire et hygiénique des aliments par la réglementation européenne (règlement européen CE 2073/2005).

La mise en culture et l'isolement via des milieux sélectifs a des limites dans l'étude de communautés microbiennes complexes. En effet, un seul milieu ne peut reproduire toutes les conditions environnementales auxquelles sont soumis une diversité de micro-organismes pour leur croissance (Davis et al., 2005). Un milieu de culture générique sous conditions « standards » d'incubation est inadapté à la vitesse de croissance de l'ensemble des micro-organismes dans un échantillon. Par ailleurs, les genres ou espèces les plus favorisés seront donc particulièrement représentés et perçus comme dominants. À l'inverse, les micro-organismes moins bien adaptés verront leur croissance ralentie et pourront être perçus comme sous-dominants sans réalité biologique. De fait, même dans l'hypothèse où de multiples milieux seraient utilisés, l'approche culture-dépendante seule ne permet qu'une vision fractionnée de l'écosystème microbien.

Une seconde limite de l'approche culture-dépendante porte sur la question de la cultivabilité des micro-organismes. Il est en effet clairement établi que l'approche culture-dépendante ne donne accès qu'à la portion « cultivable » des micro-organismes constituant un écosystème. Les micro-organismes « non-cultivables » sont les micro-organismes qui, dans l'état des connaissances actuelles, ne peuvent être cultivés ou isolés (Giraffa and Neviani, 2001). Ainsi il est estimé que la part « cultivable » ne représenterait que 1% des communautés microbiennes (toute origine environnementale confondue). Parmi les micro-organismes « non-cultivables », on distingue les micro-organismes dont les conditions de croissance ne peuvent pas être techniquement reproduites (métabolisme respiratoire, conditions de pression par exemple) et les micro-organismes entrés dans un état dit « viable non cultivable » (VBNC – Viable but not cultivable). Il a en effet été démontré que certains micro-organismes suite à un stress (nutritif, environnemental) pouvaient entrer dans un état physiologique dans

lequel ils étaient métaboliquement actifs, mais avaient perdu leur capacité à croître et former des colonies sur un milieu supportant habituellement leur développement (Ayrapetyan and Oliver, 2016). Ce type de phénomène a été rapporté chez certaines bactéries lactiques, notamment les flores d'acidification fromagères lors de l'affinage mais aussi chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* suite à un stress provoqué par l'ajout de sulfites lors de la fermentation alcoolique (Capozzi et al., 2016; Salma et al., 2013).

Malgré ces biais, l'approche culture-dépendante présente l'avantage majeur de pouvoir isoler des micro-organismes représentants des communautés microbiennes présentes, permettant ainsi de procéder à leur préservation et leur identification, et parfois à leur dénombrement.

## **4.2. Les techniques d'identification phénotypique**

Il s'agit donc des méthodes historiques d'identification des micro-organismes. Les techniques d'identification phénotypique reposent sur l'examen des caractéristiques macroscopiques, microscopiques et biochimiques des micro-organismes.

Les critères d'observation sont donc nombreux et diffèrent entre bactéries (type de paroi, forme de la cellule, mobilité), levures (forme de la cellule, mode de division) et champignons filamenteux (aspect macroscopique et couleur du thalle ; forme des spores et des structures les produisant).

Ces techniques basées sur l'observation requièrent donc une certaine expertise et peuvent donc s'avérer laborieuses. En outre, les critères d'identification sont fortement dépendants des conditions de croissance et du stade physiologique du micro-organisme, en particulier pour les champignons filamenteux.

Les caractéristiques biochimiques comprennent de nombreux critères comme le métabolisme respiratoire, la capacité à utiliser certains substrats (sucres, acides aminés), à produire certains acides notamment via certaines activités enzymatiques. Des kits d'identification commerciaux ont été développés dont les plus connus sont les plaques Biolog pour champignons (Singh, 2009) et bactéries et les galeries API principalement pour les bactéries. Ces tests miniatures permettent une caractérisation rapide du profil métabolique et biochimique des micro-organismes et leur identification par confrontation des résultats à une base de données.

Ces techniques phénotypiques sont essentiellement utilisées en analyse préliminaire afin d'éventuellement orienter une identification au niveau du genre ou à l'opposé pour caractériser le micro-organisme après identification par une technique génotypique.

### **4.3. Les techniques d'identification géotypique**

Les méthodes géotypiques regroupent les méthodes moléculaires basées sur l'analyse de l'ADN et présentent donc l'avantage de ne pas être impactées par l'état physiologique de la cellule ou de la culture. Ces méthodes sont soit basées sur l'obtention de l'empreinte génétique (*fingerprinting*) d'un micro-organisme soit sur le séquençage d'un ou plusieurs gènes ubiquitaires.

Leur point commun est qu'elles reposent toutes sur les différences de séquences nucléotidiques existant au niveau de régions conservées de l'ADN génomique microbien. Celles-ci vont permettre de discriminer les micro-organismes et nécessitent le recours à l'amplification de l'ADN par Polymerase Chain Reaction (PCR).

#### **a. Les techniques d'empreintes génétiques**

De nombreuses techniques d'empreinte génétique ont été développées. Ces méthodes exploitent les régions polymorphiques de l'ADN microbien : les fragments d'ADN sont digérés ou amplifiés au niveau d'un gène ou d'une région de séquences variables puis séparés sur gel d'électrophorèse générant ainsi un profil génétique caractéristique du micro-organisme (Franklin et al., 1999). Une comparaison de similarité entre des profils générés est alors réalisée et permet une identification présomptive des micro-organismes. Parmi ces méthodes, la RAPD ou Random Amplified Polymorphic DNA a été particulièrement appliquée pour grouper ou typer des bactéries lactiques de différents produits fermentés comme des saucisses italiennes (Urso et al., 2006) et des fromages traditionnels (Dolci et al., 2008; Randazzo et al., 2006). Elle a été également mise en avant pour ses capacités à discriminer les isolats à un niveau infra-spécifique aussi bien bactérien (Desmasures et al., 1998) que fongique (Tofalo et al., 2012).

Ces méthodes d'empreinte ont l'avantage de pouvoir analyser en parallèle un très grand nombre d'isolats (Oneca et al., 2003) et ont également été appliquées pour identifier mais également suivre et étudier la persistance de certains micro-organismes de produits fermentés au cours de leur fabrication. Elles sont néanmoins longues à mettre en œuvre, notamment en raison des électrophorèses pour obtenir une séparation optimale des différents fragments. Plus limitant encore, comme souligné plus haut, la capacité et la qualité de l'identification seront dépendantes des profils de référence à disposition. Or, ceux-ci sont obtenus dans des conditions très standardisées d'amplification et de migration. Ces bases de données peuvent donc être longues à implémenter (Rossetti and Giraffa, 2005). De plus, dans le cas où aucun

profil génétique ne correspond, il est nécessaire de procéder à l'identification par une méthode alternative ou complémentaire.

### **b. L'identification par séquençage**

Le séquençage de gènes d'intérêt est aujourd'hui la méthode de référence pour l'identification des micro-organismes et est utilisée en routine dans les laboratoires.

Comme les empreintes génétiques, l'identification par séquençage exploite le polymorphisme de l'ADN génomique microbien. La différence est que le séquençage donne accès aux séquences nucléotidiques du gène ou de la portion de gène ciblée. Les séquences obtenues après séquençage d'un gène ou d'une portion du gène ciblé sont ensuite comparées à des bases de données publiques, ce qui, en fonction du pourcentage d'identité des séquences et de la couverture, permettra l'identification à un rang taxonomique. Le rang taxonomique attribué va dépendre du caractère discriminant du gène ciblé. En effet, si les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'Internal Transcribed Spacer (ITS) sont considérés comme les marqueurs génétiques universels des bactéries et des champignons respectivement, ils peuvent s'avérer insuffisants pour différencier deux ou plusieurs espèces d'un même genre. Des études sur le sujet ont permis d'identifier des gènes plus appropriés en fonction des groupes microbiens ou genres. Le gène *Tuf* codant le facteur d'élongation Tu, le gène *recA* codant pour la protéine de recombinaison homologue du même nom et le gène *rpoB* codant pour la sous unité B de l'ARN polymérase se sont révélés efficaces pour discriminer les espèces de bactéries lactiques (Ventura et al., 2003). Le domaine D1/D2 du gène codant l'ARNr 26S est particulièrement adapté à l'identification des levures (Reller et al., 2007). Enfin, concernant les champignons filamenteux fréquemment retrouvés dans les produits fermentés, le gène codant pour la bêta-tubuline est approprié pour discriminer les espèces au sein des genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* tandis que le gène codant pour le facteur d'élongation alpha (EF1) peut être utilisé pour les espèces appartenant aux genres *Fusarium* et *Mucor*.

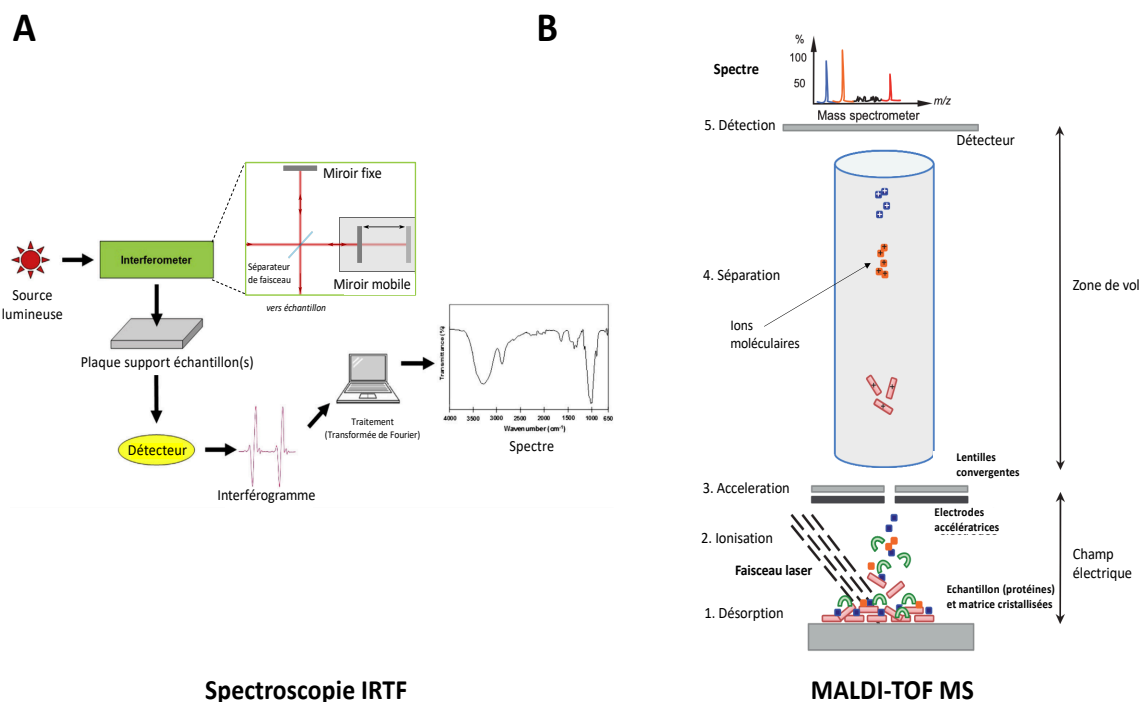
Une identification correcte et précise d'un isolat dépendra donc du choix approprié du gène d'intérêt ciblé. Par ailleurs, malgré la baisse des coûts de séquençage, le séquençage d'un gène par isolat reste coûteux. Le recours au séquençage seul comme technique d'identification, bien qu'indéniablement efficace, n'est donc pas toujours adapté aux grandes campagnes de prélèvements et d'isolement. Une stratégie de déréplication consiste à recourir dans un premier temps à une analyse d'empreinte génétique pour grouper les isolats

présentant le même profil et appartenant très probablement à la même espèce puis dans un second temps de sélectionner, parmi chacun des groupes formés, des isolats représentants qui seront identifiés par séquençage.

Cette stratégie de combinaison a ainsi été utilisée pour l'étude des communautés levuriennes de produits laitiers (Lopandic et al., 2006) et d'olives de table (Porru et al., 2018) en couplant RAPD et séquençage du domaine D1/D2 du gène codant l'ARNr 26S.

#### 4.4. Les techniques basées sur la spectrométrie comme méthodes de déréplication

Ces dernières années ont vu le développement des techniques de spectrométrie comme alternative aux méthodes génotypiques. Deux techniques peuvent être utilisées dans le domaine agroalimentaire pour l'identification rapide des micro-organismes grâce à des bases de données existantes : la spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF) et la spectrométrie de masse « Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight » (MALDI-TOF).



**Figure 3. Principe des méthodes de spectrométrie appliquées à l'identification de micro-organismes. (A) Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (B) Spectrométrie de masse MALDI-TOF**

La spectroscopie IRTF repose sur l'absorption de la lumière émise par une source polychromatique par des molécules composant les cellules microbiennes (**Figure 3A**). Les spectres IRTF de micro-organismes reflètent l'ensemble des vibrations des liaisons moléculaires et groupements chimiques caractéristiques des molécules du Vivant. Celles-ci incluent, acides gras, les protéines et les sucres et permettent donc d'obtenir une image globale des cellules entières. Comme le contenu cellulaire dépend de l'expression du génome, les spectres obtenus constituent une empreinte phénotypique des micro-organismes et le résultat est très dépendant du stade physiologique du micro-organismes (Naumann et al., 1991). Ces dernières considérations restent un facteur limitant pour la reproductibilité des analyses et nécessitent d'appliquer des conditions de culture très standardisées pour obtenir des résultats de qualité et fiables. Sur la base de ces principes, la spectrométrie IRTF s'est ainsi révélée efficace pour identifier rapidement, parfois de manière présomptive, tous types de micro-organismes avec l'obtention de spectres de bactéries (Dziuba et al., 2007), levures (Santos et al., 2010; Wenning et al., 2002) et dans une moindre mesure de champignons filamenteux (Lecellier et al., 2015). Elle a par exemple été exploitée pour l'analyse des 282 isolats de bactéries lactiques de fromages traditionnels grecs (Samelis et al., 2011), ou pour suivre l'évolution des lactocoques lors de l'affinage du Brie (Lefier et al., 2000), ou encore pour explorer la diversité des levures du moût de raisin en vinification (Grangeteau et al., 2016).

L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification rapide des micro-organismes s'est développée ces dernières années. Initialement, cette technologie a été développée pour l'identification des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles (Carbonnelle and Nassif, 2011). Le principe sur lequel est basée l'identification des micro-organismes reste proche puisque qu'il se base sur le profil en protéines ribosomales contenues dans les cellules bactériennes ou fongiques. Ces protéines présentent l'avantage d'être bien conservées au niveau de l'espèce et fortement exprimées lors de la croissance des micro-organismes. L'identification du micro-organisme initialement déposé est obtenue par confrontation de ce spectre avec ceux de la base de données associée à l'instrument. Des bases de données ont ainsi été développées pour les bactéries, les levures (Lohmann et al., 2013) et plus récemment pour l'identification des champignons filamenteux (Quéro et al., 2019).

Si l'identification de micro-organismes par MALDI-TOF a longtemps été cantonnée au domaine clinique, des études récentes se sont penchées sur l'application en agroalimentaire et notamment pour l'analyse de la diversité des bactéries lactiques de fromages (Nacef et al.,

2017; Sánchez-Juanes et al., 2020) et pour l'identification des bactéries lactiques non levains de fromages artisanaux grecs (Gantzias et al., 2020). Pour chacune des études citées, les identifications obtenues ont été comparées aux identifications obtenues par séquençage ciblant les gènes *PheS* ou codant l'ARNr 16S, montrant une bonne corrélation entre les deux techniques.

Ces techniques de spectroscopie ou de spectrométrie présentent de nombreux avantages qui en font des méthodes de choix pour implémenter une stratégie de déréplication d'isolats lors de grandes campagnes de prélèvements. Comme abordé ci-dessus, elles peuvent s'appliquer à partir de matériel biologique frais avec une étape d'extraction et un temps de manipulation réduits permettant le traitement en parallèle d'un nombre conséquent d'isolats. De plus, contrairement aux techniques de *fingerprinting*, des bases de données sont disponibles et permettent une identification rapide par confrontation directe des spectres acquis et disposent également d'outils de comparaison des spectres entre eux. Il faut néanmoins préciser qu'à ce jour leur pouvoir discriminant au niveau d'espèces proches comme *Lactiplantibacillus plantarum* /*paraplantarum* /*rhamnosus* (ex-*Lactobacillus plantarum* /*paraplantarum*/pentosus) ou certains complexes d'espèces fongiques comme *Aspergillus* est limité et rend une approche combinée au séquençage souhaitable.

## **5. L'approche culture-indépendante basée sur la métagénétique**

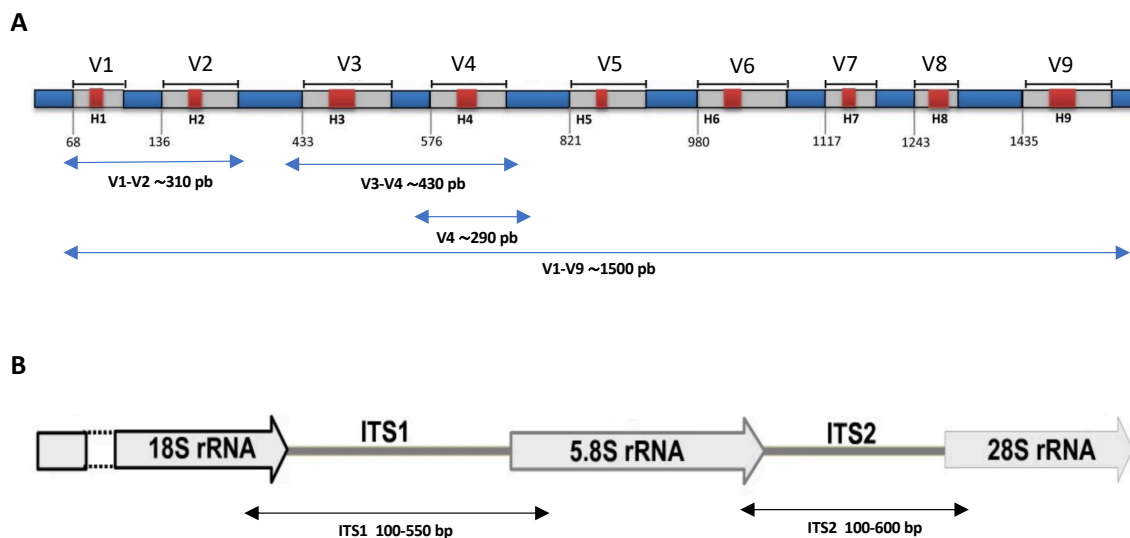
L'approche culture-indépendante et les techniques utilisées reposent sur l'analyse de l'ADN microbien total présent dans un échantillon, sans passage par une phase intermédiaire de culture. Ces dernières décennies, l'émergence de la biologie moléculaire, des technologies de séquençage massives appelées Next Generation Sequencing (NGS) et de la bioinformatique ont également doté les microbiologistes de nouvelles techniques d'étude des communautés microbiennes parmi lesquelles se trouve la métagénétique.

### **5.1. La métagénétique et les marqueurs moléculaires « universels »**

La métagénétique est une technique de la famille des « *metagenomics* », terme qui désigne l'étude de toute l'information sous forme d'ADN contenue dans un environnement ou un échantillon donné. La métagénétique, également appelée *metabarcoding*, consiste à amplifier et séquencer un gène/une région intergénique ubiquitaire au sein des bactéries ou des champignons pour identifier les taxons présents, le plus souvent à l'espèce, après amplification et séquençage massif de ce gène à l'aide des technologies NGS.



Chez les bactéries, les gènes codant l'ADNr 23s, la sous-unité de l'ADN gyrase ou codant la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase sont efficaces. Toutefois, le marqueur moléculaire universel des bactéries le plus utilisé est le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S. Pour les champignons, il s'agit surtout de l'Internal Transcribed Spacer (ITS) (Schoch et al., 2012; Woese et al., 1990), bien que d'autres marqueurs puissent être également utilisés tels que le domaine D1/D2 ou RPB2 (Filippis et al., 2017). Le gène codant l'ADNr 16S comprend environ 1540 paires de bases (pb) et contient des régions conservées et variables. Ces régions variables permettent donc la discrimination des bactéries et leur assignation taxonomique tandis que les régions conservées permettent de créer les amorces (**Figure 4A**). L'ITS chez les micro-organismes eucaryotes est situé entre la petite sous-unité 16S et la grande sous-unité 28S (**Figure 4B**). Il comporte deux régions appelées ITS 1 et ITS 2 séparées par la sous-unité 5.8S qui sont couramment ciblées. Contrairement au gène de l'ADNr 16S chez les procaryotes, l'ITS peut fortement varier en taille chez les champignons et entre les deux phyla (Ascomycota et Basidiomycota) entre 200 et 900 pb. En moyenne, il comprend autour de 500 et 600 pb (Porter and Golding, 2011; Toju et al., 2012).



**Figure 4. Représentations schématiques du (A) gène codant l'ADNr 16S chez les bactéries et (B) de la région ITS chez les champignons (La figure 4A est adaptée de Shahi et al., 2017)**

Compte-tenu de leur longueur respective, il est rare, dans le cadre d'une approche métagénétique, de cibler le marqueur dans son entièreté. Pour le gène de l'ADNr 16S, l'amplification va ainsi cibler une ou plusieurs régions variables. Les portions V1-V3, V3-V4 ou la région V4 seule sont parmi les plus ciblées notamment en bactériologie alimentaire (Calasso et al., 2016; Dalmasso et al., 2016).

Concernant l'ITS, la région ITS1 ou ITS2 seront préférentiellement séquencées. Le choix de la région dépendra essentiellement des genres ou espèces *a priori* attendus ou composant normalement l'écosystème étudié (Blaalid et al., 2013). Pour chacun des règnes, de nombreuses amorces ont été dessinées et leur pouvoir discriminant évalué (Beeck et al., 2014; Klindworth et al., 2013) pour leur utilisation en séquençage Next Generation Sequencing (NGS).

Il existe différentes technologies de séquençage NGS comme la technologie Illumina, Ion torrent, ou Nanopore. Parmi ces technologies, la plus utilisée actuellement et notamment en métagénomique est la technologie Illumina Miseq, notamment en raison de son faible taux d'erreur. Cette technologie repose sur un séquençage par synthèse et permet de générer entre 15 millions (en *single-end*) et 30 millions de paires de bases (en *pair-ended*) sous formes de séquences courtes de 250 ou 300 paires de bases appelées *reads*.

## 5.2. Le traitement bioinformatique des données et la notion d'OTU

La bioinformatique est l'application de l'informatique à l'acquisition, au traitement et à l'analyse des données biologiques. Le développement de la métagénomique a été possible grâce au développement de la bioinformatique qui a permis le traitement de la quantité massive de données générées mais aussi facilité leur stockage et dissémination au sein de la communauté scientifique via des banques de données internationales libre d'accès. De même, le développement ces dernières années de plateformes mettant à disposition des outils plus simples d'utilisation comme Galaxy (Afgan et al., 2018) facilitent grandement l'analyse des données leur interprétation et les connaissances qui en découlent.

Le traitement informatique des données de séquençage consiste donc à assigner taxonomiquement les millions de séquences des échantillons à un rang taxonomique (allant du phylum à l'espèce). La méthode d'analyse aussi appelée « *pipeline* » comprend de manière simplifiée quatre grandes étapes :

- Le **pre-processing** qui s'assimile au nettoyage des données brutes de séquençage (démultiplexage, contrôle de la qualité des *reads* générés, assemblage des *reads* pairés, élimination des séquences plus courtes qu'attendues en fonction de la région ciblée) ;
- La **détection des OTUs** : consiste à regrouper les séquences/amplicons en fonction de leur similarité de séquences ;

- Le **filtrage** des données qui peut inclure une étape de déchimérisation (suppression des séquences artificiellement générées lors de l'amplification de séquences appartenant à deux organismes différents), d'élimination des OTUs dont l'abondance est inférieure à un seuil etc ;
- L'**assignation de ces OTUs** à un rang taxonomique par comparaison à une base de données dépendant du marqueur utilisé. On peut notamment citer SILVA, RDP pour les données 16S. La base de données UNITE est actuellement la plus utilisée pour les données ITS.

Il existe de multiples *pipelines* développés pour l'analyse métagénomique parmi lesquels QIIME (Quantitative insights Into Microbial Ecology), FROGS (Find Rapidly Otus with Galaxy Solution) et Dada2. Ils diffèrent par l'ordre des étapes, les outils sur lesquels ils reposent, leur paramétrage et leur méthode de détection d'OTUs. Cette partie n'a pas vocation à détailler et comparer ces *pipelines*, toutefois il est intéressant de s'attarder sur les méthodes de détection et d'assignation des OTUs, celles-ci étant déterminantes dans l'image des communautés qui en résulte.

Une OTU (« Operational Taxonomical Unit ») ou Unité Taxonomique Opérationnelle est une notion propre aux approches de métagénomique appliquée à l'écologie microbienne. Ce terme désigne un groupement d'organismes formé sur la base de la similarité de leurs séquences d'ADN. En effet, les gènes ITS et codant l'ARNr 16S sont présents en plusieurs copies au sein du génome, et leur séquence peut varier d'une copie à l'autre. Ainsi, lors de l'assemblage des séquences sur la base de leur similarité, il peut arriver qu'une espèce corresponde à plusieurs OTUs. De même, il arrive que les séquences ne soient pas assez discriminantes pour y assigner une espèce et l'assignation d'une OTUs peut être réalisée à un rang taxonomique supérieur.

Les OTUs peuvent être construites selon plusieurs approches. Le *pipeline* QIIME par défaut utilise un algorithme « *open-reference OTU* » qui consiste à regrouper les séquences sur la base des similarités de séquences par rapport à celles d'une base de données de référence en appliquant un seuil de similarité à 97%, tandis que les séquences exclues sont re-clusterisées entre elles (Kuczynski et al., 2011). Le *pipeline* FROGS (Escudie et al., 2018) utilise l'algorithme Swarm (Mahé et al., 2015) qui dérive d'une détection des OTUs « *de novo* ». Il s'agit d'une stratégie aggrégative qui s'affranchit de tout recours à une base de données de référence et agrège les séquences en OTUs de façon itérative quand elles ont moins de *d* différences (*d* compris entre 1 à 3) avec les autres séquences de l'OTU. Cette approche mime

les erreurs de séquençage qui se propagent au fur et à mesure des cycles. Ce type de stratégie est particulièrement adapté aux écosystèmes peu connus ou décrits et permet de mettre en évidence des taxons sous-dominants. En revanche, une telle approche peut donner plus de poids aux séquences artificiellement créées lors du séquençage. Enfin, le *pipeline* Dada2 utilise un algorithme s'affranchissant du seuil de similarité en modélisant les erreurs liées au séquençage (Callahan et al., 2016). En partant de la séquence la plus représentée, l'algorithme sépare progressivement les autres séquences en sous ensemble. La séparation s'effectue en calculant la probabilité que la séquence soit trop abondante pour être liée à une erreur de séquençage ; lorsque cette probabilité est inférieure à un seuil, alors il s'agit d'un amplicon différent et non d'un variant dû au séquençage. La démarche aboutit non pas à la création d'OTUs *stricto sensu* mais d' « Amplicon Sequencing Variant ».

Quel que soit le *pipeline*, les OTUs (ou ASVs) sont ensuite assignées taxonomiquement et permettent d'accéder à la composition taxonomique des communautés bactérienne et/ou fongique.

### **5.3. La métagénomique appliquée aux aliments fermentés**

La métagénomique permet donc d'accéder à la diversité taxonomique d'une communauté microbienne d'un échantillon et a permis d'avoir une vision plus complète de l'écosystème microbien de certains aliments fermentés comme les olives de table et les fromages. Quigley et al. (2012) ont comparé les communautés microbiennes de 62 fromages irlandais et en ont révélé une richesse insoupçonnée avec sept genres bactériens sous-dominants jusqu'alors jamais trouvés dans le fromage. Wolfe et al. (2014) ont étudié les communautés bactériennes et fongiques présentes en surface de 137 fromages provenant de dix régions géographiques différentes.

Les apports de la métagénomique à l'étude des aliments fermentés ne se limitent pas à la description des micro-organismes présents au sein d'un même type de produits (**Tableau 5**). Une quantification relative des différents taxons bactériens et fongiques est également possible et permet de mettre en évidence les espèces dominantes d'un écosystème. Elle aussi de s'intéresser à leur distribution spatio-temporelle notamment à travers l'analyse de la diversité au sein d'une communauté, appelée diversité alpha, et entre les communautés (diversité bêta). D'autres études se sont intéressées aux différences de communautés existant au sein d'un même produit ou encore à l'évolution des communautés microbiennes au cours

de la fermentation ou d'étapes plus ciblées comme au cours de l'affinage ou du stockage des fromages et olives.

Par ailleurs, les approches métagénomiques permettent de s'interroger sur l'impact de différents facteurs sur les communautés microbiennes. Il peut s'agir de modification d'une matière première ou l'impact d'une étape de procédé de fabrication. Cocolin et al. (2013) ont ainsi montré que l'étape de lessivage des olives de table vertes contribuait à modifier la diversité bactérienne et impactait négativement certaines espèces. D'autres études ont mis en évidence la contribution de l'environnement de production aux communautés microbiennes retrouvées au cours de la fabrication (Bokulich and Mills, 2013). Enfin, la métagénomique peut également s'appliquer à l'identification des taxons responsables d'altérations.

Les champs d'application de la métagénomique aux aliments fermentés sont donc divers. Toutefois, l'approche n'est pas sans limite. Certes, la métagénomique permet une description bien plus exhaustive qu'auparavant ainsi que des analyses approfondies des communautés bactériennes et fongiques, mais elle reste une méthode dépendante de la PCR et de fait ne permet pas une vision globale de la communauté microbienne, tous règnes confondus, d'un produit fermenté.

**Tableau 5. Champs d'applications de la métagénomique à l'étude des communautés microbiennes**

Matrice	Gène marqueur / région (Technologie)	Application	Objectif	Référence
Fromage	16S / région V4 (Pyroséquençage)	Comparaison diversité microbienne	Comparaison de la diversité microbienne de 62 fromages	Quigley et al. (2012)
Fromage	16S / régions V1-V3 (Illumina)	Contribution de l'environnement de production	Étude de la structure des communautés microbiennes de la Tomme d'Orchie	Ceugniz et al. (2017)
Fromage	16S/ régions V4-V5 (Pyroséquençage)	Identification des flores d'altération	Identification de micro-organismes d'altération : identification de <i>Thermus</i> sp. comme responsable de la pigmentation rose de fromages	Quigley et al. (2016)
Fromage	16S / région V4 (Illumina)	Impact de l'environnement de production	Mise en évidence du "House microbiota" - Rôle de l'environnement de production dans la communauté bactérienne des fromages	Bokulich et al. (2013)
Fromage	16S / régions V1-V3 (Pyroséquençage)	Impact de l'environnement de production	Relations entre les communautés microbiennes du cœur, de la surface et de l'environnement de production	Calasso et al., (2016)
Fromage	16S / région ITS ITS/ région ITS2	Comparaison diversité microbienne	Comparaison de la diversité fongique et bactérienne en surface de fromages affinés	Wolfe et al. (2014)
Olives de table	16S /régions V3-V4 ITS/ ITS2 (Illumina Miseq)	Identification des flores d'altération	Identification des micro-organismes impliqués dans l'altération "Zapateria" (odeur de fromage)	de Castro et al. (2018)
Olives de table	16S /régions V1-V3 (Pyroséquençage)	Impact du procédé de fabrication	Impact d'une culture starter composée de lactobacilles et de levures sur la diversité microbienne et la fermentation	De Angelis et al. (2015)
Olives de table	16S /régions V1-V3(Pyroséquençage)	Ecosystème microbien intra-aliment & impact du procédé de fabrication	Comparaison de la diversité bactérienne de la saumure et des olives suite au traitement au NaOH.	Cocolin et al. (2013)
Olives de table	ITS /ITS1-5.8S-ITS2 (Pyroséquençage)	Dynamiques microbiennes	Évolution de la composition des communautés fongiques au cours de la fermentations (matières premières incluses)	Arroyo-López et al. (2016)
Olives de table	16S / régions V2-V3 (Pyroséquençage)	Comparaison diversité microbienne	Comparaison de la diversité fongique présentes sur des olives de deux variétés différentes	Medina et al. (2016)
Olives de table	16S / régions V3-V4 ITS/ITS1 (Illumina)	Impact du procédé de fabrication Dynamiques microbiennes	Impact de l'oxydation des olives sur les communautés bactériennes et fongiques et la fermentation	Medina et al. (2018)

## **6. Complémentarité des méthodes à l'étude des écosystèmes fermentés**

Les approches culture-dépendante et culture-indépendante ainsi que les techniques rattachées présentent chacune des avantages et des limites présentés en **Tableau 6**.

Les approches culture-indépendantes présentent l'inconvénient majeur de ne pas distinguer l'ADN de cellules viables et des cellules mortes. Il a en effet été démontré que l'ADN génomique de bactérie ne se dégradait pas immédiatement et pouvait persister plusieurs semaines dans certains environnements (Li et al., 2018). Ceci peut mener à des visions erronées de la diversité à un instant  $t$  dans le cadre de l'étude des dynamiques d'une communauté. Combiner une approche culture-dépendante, qui apporte des informations quantitatives sur les populations dénombrables, peut jusqu'à un certain point pallier ce problème. De plus, l'approche culture-dépendante reste essentielle car elle constitue le seul moyen de disposer de micro-organismes en collection. Cet aspect est particulièrement important du point de vue de la préservation de la biodiversité microbienne et caractériser les micro-organismes. La complémentarité des informations générées a d'ailleurs été démontrée sur divers produits fermentés.

**Tableau 6. Comparaison des avantages et limites des approches culture-dépendante et -indépendante.**

Approche	Considérations générales	Techniques	Avantage(s)	Limite(s)
<b>Culture-dépendante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Dénombrement</b> des populations viables</li> <li>• Fraction <b>cultivable</b> des communautés microbiennes</li> <li>• Au niveau de l'<b>isolat</b> uniquement</li> </ul>	Phénotypiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caractérisation morphologique rapide (orientation de l'identification)</li> <li>• Informations préliminaires sur potentiel fonctionnel (méthodes biochimiques)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Caractères variables au sein d'un genre et d'une espèce</li> <li>• Expertise : reconnaissance critères discriminants</li> <li>• Dépendance vis-à-vis de l'état physiologique de la cellule</li> <li>• Fastidieux : reproductibilité nécessite conditions standardisées (profil de migration, étapes de réalisation)</li> <li>• Identification : nécessite BD internes</li> </ul>
		Empreintes moléculaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu onéreux</li> <li>• Distinction possible au niveau infra-spécifique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification infra-spécifique limitée</li> <li>• Coût initial des instruments</li> </ul>
		Spectrométrie/spectroscopie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapidité : étape extraction réduite, nombre d'isolats traités en parallèle</li> <li>• Identification banque de données commerciales à disposition</li> <li>• Comparaison des isolats entre eux</li> </ul>	
		Séquençage de gènes ciblés	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identification "absolue" par comparaison à des BD externes</li> <li>• Identification de nouveaux micro-organismes et phylogénie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coût à l'isolat encore élevé</li> <li>• Choix du gène ciblé</li> </ul>
<b>Culture-indépendante</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ADN</b> génomique total extrait</li> <li>• Fractions "cultivables" et "non-cultivables"</li> <li>• Micro-organismes <b>vivants et morts</b></li> </ul>	Empreintes génétiques communautés  Métagénomique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vision rapide des changements de communautés (richesse) par comparaison directe des profils</li> <li>• Coût réduit</li> <li>• Diversité taxonomique : Identification à l'espèce possible ou taxon supérieur</li> <li>• Dynamiques microbiennes : abondance relative au sein d'un échantillon</li> <li>• Structure des communautés selon une variable : étude des diversités alpha et bêta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fastidieuses : nombre d'échantillons traités en parallèle, temps d'analyse</li> <li>• Pas de relation entre profil et phylogénie</li> <li>• Semi quantitatives : absence/présence fragment, peu sensibles aux taxons sous-dominants</li> <li>• Biais PCR : amplification préférentielle</li> <li>• Biais PCR : amplification préférentielle, diversité "artificielle"</li> <li>• Dépendance vis-à-vis plateformes de séquençage (temps)</li> <li>• Traitement et interprétation des données</li> <li>• Niveau identification : choix du marqueur (et de la région)</li> </ul>

Abbréviations : BD – Base de données ; PCR Polymérase chain reaction



### III. Microbiologie des fromages au lait cru

#### 1. Généralités sur la fabrication des fromages

Le fromage fait partie des produits fermentés les plus consommés dans le monde. Il existe une multitude de variétés selon le lait utilisé (vache, brebis, chèvre), la technologie mise en œuvre et les micro-organismes intervenants.

La fabrication des fromages résulte de la succession de cinq étapes majeures indispensables qu'ils soient industriels ou artisanaux (Fox et al., 2017) :

- La **préparation du lait** : le lait peut provenir d'une ou plusieurs traites, ses taux de matières grasses et protéiques peuvent être également standardisés. Enfin, selon les fromages, il peut être utilisé cru, chauffé à des températures entre 30 et 60 degrés ou pasteurisé ;
- La **coagulation du lait** désigne l'étape au cours de laquelle, le lait liquide passe sous la forme de gel solide à la suite de la coagulation des caséines du lait. On distingue la coagulation enzymatique lorsqu'elle est due à l'action de la présure, de la coagulation lactique liée à l'activité des bactéries lactiques. Dans de nombreux fromages, la coagulation est obtenue par voie enzymatique et s'accompagne d'une acidification par les bactéries, plus ou moins poussée selon le type de fromage. Ces bactéries lactiques peuvent être naturellement présentes, inoculées par *backslopping* ou provenir de ferments commerciaux (cultures starters) ;
- L'**égouttage** et le **moulage** : à l'issue de la coagulation (fraction solide) on distingue le caillé (fraction solide) du lactosérum (fraction liquide). L'égouttage correspond à l'expulsion du lactosérum emprisonné dans le caillé. Cette étape peut intervenir en amont ou en aval du moulage qui consiste à donner sa forme au fromage ;
- Le **salage** correspond à l'incorporation de sel au caillé et a pour objectif principal de parfaire l'égouttage mais contribue également à la formation de la croûte et agit comme filtre environnemental contre certains micro-organismes délétères. Il peut être réalisé « à sec » en le mélangeant directement au caillé ou en le saupoudrant sur les deux surfaces, soit par saumurage en immergeant complètement le fromage ou en frottant la surface ;

- L'**affinage** correspondant à une période de maturation dans des conditions de température et d'hygrométrie précises et peut être précédé d'une étape de séchage. L'affinage est plus ou moins long selon les fromages : il est facultatif ou réduit pour les fromages dits « frais » et varie entre quelques jours à plusieurs années. L'affinage s'accompagne de grands changements physico-chimiques ; c'est notamment durant cette période que se forme la croûte du fromage et que le produit développe ses caractéristiques sous l'action de bactéries ou de champignons, que ce soit des levures ou des champignons filamenteux. Ces micro-organismes peuvent être naturellement présents, venir de l'environnement de production ou correspondre à des cultures commerciales ajoutées.

Le fromage constitue donc progressivement au cours de sa fabrication un écosystème complexe avec deux environnements distincts avec un cœur anaérobie et une surface aérobie et des gradients plus ou moins intenses d'oxygène, de pH entre les deux. Ces disparités se caractérisent également par des diversités microbiennes différentes. Dans le cadre de cette partie, nous nous focaliserons sur les fromages au lait cru et leurs particularités.

## **2. L'origine des micro-organismes présents dans les fromages au lait cru**

Une caractéristique importante des fromages au lait cru est l'importance des flores microbiennes environnementales. En effet, si des fromages au lait cru ont recours à desensemencements de cultures acidifiantes, le traitement minimal du lait et les pratiques associées contribuent à enrichir la diversité microbienne et les caractéristiques du fromage. En plus du lait cru en lui-même, les intrants ajoutés en cours de fabrication ainsi que l'environnement peuvent être considérés comme des sources de micro-organismes.

La communauté microbienne qui s'implante dans le fromage provient de l'environnement de la traite, du matériel utilisé pour celle-ci mais aussi les cuves de stockage et de maturation du lait (Didienne et al., 2012; Vacheyrou et al., 2011). Les études portant sur la microbiologie du lait cru ont révélé une grande richesse microbienne dont les communautés sont dominées par des bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus* et *Leuconostoc* et des espèces coagulase-négative du genre *Staphylococcus*. Des bactéries à Gram négatif comme les entérobactéries, les lactobacilles et les Actinobactéries y sont aussi souvent retrouvées, bien que sous-dominantes (Callon et al., 2007; Coton et al., 2012; Gatti et al., 2014). Les niveaux

de populations des différentes espèces varient en fonction des types de lait. Toutefois, les populations bactériennes atteignent de manière générale  $10^3$ - $10^4$  UFC/mL tandis que les populations fongiques sont plus faibles voir non détectées dans le cas des champignons filamenteux.

Les sources microbiennes ne se limitent pas à la matrice principale fermentée mais incluent également les adjuvants qui interviennent dans le reste du procédé. Les pratiques de *backslopping* précédemment évoquées par ajout de lactosérum ou de lait mûri contribuent également à apporter des micro-organismes comme cela a été montré pour différents fromages italiens au lait cru (Dolci et al., 2008; Ercolini et al., 2008). Par ailleurs, les sels utilisés pour le salage en surface ou le saumurage des fromages s'est révélé être chargé en micro-organismes (Marino et al., 2017).

Certaines études ont également montré la contribution de l'environnement de production à la diversité microbienne des fromages traditionnels. Dans le cas des fromages traditionnels au lait cru pour lesquels peu ou pas de cultures d'affinage sontensemencées, les micro-organismes de la croûte proviendront essentiellement de l'environnement. Ainsi, le matériel utilisé, les surfaces sur lesquelles reposent les fromages (Mariani et al., 2011), l'atmosphère des différentes pièces de stockage (séchage, affinage) mais aussi les manipulations manuelles des fromages sont susceptibles d'apporter des micro-organismes (Mounier et al., 2006).

Ces éléments soulignent également le caractère « ferme-dépendant » de chaque fromage et contribuent à sa typicité. Chaque étape de fabrication est donc susceptible de venir enrichir les communautés microbiennes au cours de la fabrication mais aussi d'y opérer une sélection agissant comme un filtre. En conséquence, les communautés microbiennes des fromages évoluent fortement au cours de la fabrication et de l'affinage. Néanmoins, les bactéries lactiques jouent un rôle prépondérant.

### **3. Les bactéries lactiques et leur contribution**

#### **3.1. Diversité et métabolisme fermentaire**

Les bactéries lactiques (ou LAB, Lactic Acid Bacteria) constituent un groupe de bactéries responsables de la fermentation lactique, c'est-à-dire capables de produire de l'acide lactique à partir du lactose. Il s'agit d'un groupe plus fonctionnel que taxonomique puisque si elles appartiennent toutes au phylum des Firmicutes, les bactéries lactiques sont

distribuées parmi différentes familles et genres. Dans les produits laitiers, les principaux genres retrouvés sont les genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et anciennement *Lactobacillus* (récemment reclassées en 25 genres par Zheng et al. (2020)).

Les LAB peuvent être subdivisées en deux groupes selon les produits issus de la fermentation lactique. On distingue ainsi les LAB homofermentaires (i.e., genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* et 16 genres appartenant anciennement au genre *Lactobacillus*) qui ne produisent que de l'acide lactique, des bactéries hétérofermentaires (genres *Leuconostoc* et 9 genres anciennement classés comme *Lactobacillus*) qui utilisent la voie des pentoses phosphates dont les produits finaux sont l'acide lactique, l'éthanol ou l'acide acétique et le dioxyde de carbone (Gänzle, 2015).

Les bactéries lactiques interviennent tout au long de la fabrication des fromages lors de la coagulation tout comme durant l'affinage bien que les mêmes genres et espèces ne soient pas concernés.

### **3.2. Les bactéries lactiques starters**

Les bactéries lactiques responsables de la coagulation du lait en caillé sont également appelées bactéries lactiques levains ou starters (SLAB). Il s'agit essentiellement de bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* qui assurent la fermentation de la majorité du lactose en lactate. La présence et croissance de ces genres microbiens s'accompagnent également de la production d'autres acides comme l'acide citrique et autres intermédiaires métaboliques. Leur activité protéolytique contribue également à la coagulation en dégradant les caséines du lait en peptides via des protéases. Certains auteurs ont également montré que les bactéries starters contribuaient à l'affinage par phénomène de lyse, libérant ainsi de nombreuses enzymes dans le fromage et acides aminés (Lortal and Chapot-Chartier, 2005).

### **3.3. Les bactéries lactiques d'affinage**

Lors de l'affinage, l'activité des bactéries lactiques starters diminue ainsi que leur population au profit des bactéries lactiques dites non-starter (NSLAB). Ces bactéries seront particulièrement présentes dans le cœur du fromage et appartiennent à divers genres : *Lactobacillus* (divisé en 25 genres) mais aussi *Leuconostoc*, *Enterococcus* et *Pediococcus* (Chamba and Irlinger, 2004; Falentin et al., 2012; Gala et al., 2008; Mounier et al., 2009). Leur métabolisme induit l'utilisation du lactose résiduel, la métabolisation du lactate en

d'autres acides organiques comme l'acide citrique ou l'acide acétique dans le cas des bactéries lactiques hétérofermentaires. L'utilisation de ces voies a notamment été mise en évidence chez plusieurs espèces d'*Enterococcus* (*E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*) (Giraffa, 2003). Ces différentes voies métaboliques contribuent donc à l'aromatisation du fromage avec la production de nombreux précurseurs mais aussi de molécules aux arômes caractéristiques comme le diacétyl ou le butan-2,3-dione dans le cas de *Leuconostoc mesenteroides* (McSweeney and Sousa, 2000). Certaines bactéries possèdent également des peptidases qui leur permettent d'hydrolyser les peptides dérivés de la caséine, afin de disposer des acides aminés essentiels à leur croissance. Ces acides aminés peuvent également participer à l'arôme du fromage comme l'acide glutamique ou les acides aminés soufrés, ou sont des précurseurs de molécules d'arômes comme des alcools supérieurs et des acides (voies métaboliques d'Ehrlich).

Les activités lipolytiques de ces bactéries restent faibles à l'exception de certaines espèces d'*Enterococcus* dont *E. faecium* et *E. faecalis* (Giraffa, 2003).

## **4. Les levures et les champignons filamenteux**

### **4.1. Diversité fongique**

Les levures sont des micro-organismes hétérotrophes, aérobies, ubiquistes qui sont capables de se développer sur une large gamme de pH et de température. De plus, certaines espèces présentent une forte résistance au sel. Leur population est généralement faible dans le lait cru et va essentiellement se développer au niveau de la croûte lors de l'affinage et dans une moindre mesure dans le cœur du fromage. En effet, la faible disponibilité en oxygène ne permet pas leur croissance importante à l'exception des levures fermentaires telles que *Kluyveromyces marxianus* ou *Pichia fermentans* ponctuellement identifiées (Irlinger et al., 2015). Les levures les plus retrouvées dans les fromages appartiennent aux genres *Candida*, *Debaryomyces*, et *Geotrichum* suivies de *Candida*, *Trichosporon* et *Yarrowia* (Mounier et al., 2009; Wolfe et al., 2014).

Les champignons filamenteux les plus retrouvés appartiennent aux genres *Penicillium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* et *Mucor* (Hymery et al., 2014; Irlinger et al., 2015; Ropars et al., 2012). Certaines espèces sont affiliées à certains fromages comme *Fusarium domesticum* pour le Saint-Nectaire, *Mucor lanceolatus* pour la tomme de Savoie, *Penicillium roqueforti* pour le Roquefort et *Penicillium camemberti* pour le Camembert (Ropars et al., 2020).

## 4.2. Rôle et contribution des champignons à l'affinage des fromages

Les levures et champignons filamenteux participent à plusieurs aspects organoleptiques des fromages affinés.

Au niveau visuel, ils peuvent contribuer au développement de la croûte avec la colonisation de la surface par le mycélium et confèrent ainsi à certains fromages leur aspect caractéristique : *P. camemberti* et *G. candidum* pour l'aspect feutré du Camembert (Ropars, 2020) ou encore dans le cas de *P. roqueforti* à l'aspect bleuté et la couleur des veines internes de certains fromages à pâte persillée (Gillot et al., 2017). Une conséquence secondaire de cette colonisation est la métabolisation du lactate en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O puis dans un second temps la dégradation des peptides et acides aminés en ammoniac (Fröhlich-Wyder et al., 2019). Ces deux phénomènes sont essentiels et contribuent à la désacidification de la surface du fromage et permettent l'implantation d'autres bactéries aérobies à Gram positif et à Gram négatif moins acido-tolérantes que les levures.

Cette activité protéolytique des levures et champignons contribue également aux changements de texture et au développement des arômes. Contrairement à la plupart des bactéries lactiques, les champignons filamenteux comme les levures ont une activité lipolytique forte. Les enzymes responsables (estérases et lipases) agissent en parallèle des lipases endogènes du lait (Thierry et al., 2017) sur les triglycérides du lait et augmentent ainsi le contenu en acides gras. Cette activité lipolytique varie entre les espèces de par la nature des enzymes qu'elles synthétisent. Par exemple, il a été démontré que *Kluyveromyces lactis* ciblait principalement les acides gras courts (C:4, C:12) tandis que la lipase synthétisée par *G. candidum* ciblait les acides gras plus long (C:14 – C:18) (Leclercq-Perlat et al., 2007). Les acides gras sont particulièrement importants dans la composante aromatique des fromages. Leur catabolisme induit la production de différents composés volatils comme des cétones, des alcools et des esters (Mcfeeters, 2004; Thierry et al., 2017). Certains travaux sur des fromages au lait cru de chèvre et de brebis (Delgado et al., 2010; Massouras et al., 2006) ont montré que ces derniers composants augmentaient particulièrement au cours de l'affinage.

## 5. Les autres populations bactériennes

Si les bactéries lactiques sont prépondérantes en technologie fromagère, les fromages traditionnels présentent une forte diversité microbienne avec d'autres groupes microbiens tels que les Staphylocoques à coagulase négative ou des actinobactéries (Mounier et al.,

2017; Quigley et al., 2011). Des bactéries halophiles ont également été retrouvées : par exemple, *Vibrio*, *Halomonas*, *Pseudoalteromonas* (Coton et al., 2012) pour les bactéries à Gram négatif ou encore *Marinilactibacillus* pour des bactéries à Gram positif (Maoz et al., 2003)

Les actinobactéries ou bactéries corynéformes (genres *Corynebacterium*, *Glutamicibacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* et *Arthrobacter*) sont particulièrement présentes en surface de nombreux fromages affinés et participent aux propriétés organoleptiques des fromages (i.e. couleur, texture, arômes). Ces genres bactériens sont généralement sensibles aux faibles pH et leur croissance est possible suite à la désacidification de la surface par les levures puis les champignons filamenteux acido-tolérants en début d'affinage. Si le rôle de toutes les populations bactériennes en surface des fromages n'est pas connu à ce jour, des espèces appartenant aux genres *Micrococcus*, *Brevibacterium* and *Corynebacterium* seraient responsables de la pigmentation orange de certains fromages (Irlinger and Mounier, 2009). Par ailleurs, l'activité protéolytique des certaines actinobactéries a ainsi été mise en évidence contribuant à la formation de composés volatils soufrés à partir de méthionine en quantité supérieure à certaines levures (Bonnarne et al., 2001).

## **6. Les facteurs et pratiques influençant les caractéristiques des fromages traditionnels au lait cru**

Les caractéristiques des fromages découlent donc de la capacité des différents micro-organismes à exploiter de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la dégradation des sucres, du citrate, du lactate, des caséines, des acides aminés et des acides gras (**Tableau 7**).

**Tableau 7. Principales voies métaboliques impliquées dans les caractéristiques organoleptiques des fromages (sources : Bertuzzi et al., 2018; Smit et al., 2005; Thierry et al., 2017)**

Métabolisme	Voies métaboliques	Fonction	Substrat	Produits	Étape de fabrication	Groupes microbiens associés
<b>Fermentation lactique</b>	Voie des hexoses (homofermentaires) Voie des pentoses phosphates (hétérofermentaires)	Coagulation	Lactose et autres sucres	Acide lactique Acide lactique, éthanol/acétate, CO <sub>2</sub>	Coagulation Début affinage (lactose résiduel)	SLAB ( <i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ) NSLAB (Lactobacilli)
<b>Métabolisme du citrate</b>		Production d'arômes	Citrate	Diacétyl acétoïne 2,3-Butanediol	Début affinage	LAB citrate-positif (souche-dépendant) SLAB ( <i>Lactococcus</i> et <i>Leuconostoc</i> ) NSLAB ( <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Levilactobacillus brevis</i> )
<b>Métabolisme du lactate</b>		Désacidification	Lactate	CO <sub>2</sub> et H <sub>2</sub>	Affinage	Levures et champignons filamenteux
		Production d'arômes	Lactate	Acide formique, éthanol, CO <sub>2</sub>	Affinage	NSLAB
<b>Protéolyse</b>	Protéolyse caséines (protéases)	Aspect visuel / Texture	Caséines	Polypeptides et peptides	Début affinage	LAB, champignons filamenteux
	Protéolyse peptides (peptidases)	Production d'arômes	Peptides	Acides aminés libres	Affinage	LAB, levures et champignons filamenteux
<b>Catabolisme des acides aminés</b>	Voies de Ehrlich (décarboxylation, transamination, désamination)	Production d'arômes	Acides aminés aromatiques	Composés volatils (acides et alcools)	Affinage	NSLAB, levures, champignons filamenteux
		Production d'arômes	Acides aminés ramifiés	Composés volatils (acides et alcools)	Affinage	NSLAB, levures, champignons filamenteux
	Dégradation	Production d'arômes	Acides aminés soufrés	Composés volatils soufrés	Affinage	NSLAB, levures, champignons filamenteux, actinobactéries aérobies
<b>Lipolyse</b>	Activité lipolytique (lipases)	Production d'arômes	Triglycérides	Acides gras libres courts et longs	Affinage	Levures, champignons filamenteux
	Catabolisme des acides gras	Production d'arômes	Acides gras libres saturés insaturés	Composés volatils Méthylcétones, alcools supérieurs Aldéhydes, alcools, acides, esters	Affinage	Levures, champignons filamenteux
<b>Abbreviations :</b>	LAB – Bactéries lactiques – SLAB – Bactéries lactiques levains ou starter – NSLAB Bactéries lactiques non starter -					



Différents facteurs peuvent intervenir et influencer cette capacité à s'implanter.

### **6.1. Le lait**

En premier lieu, un des principaux facteurs influençant les caractéristiques du fromage est la composition du lait. Celle-ci dépend grandement de l'animal dont il est issu, tant au niveau de la quantité de protéines et d'acides gras que de leur nature (Devle et al., 2012). Par exemple, le lait de chèvre est particulièrement riche en acides gras, présente une forte concentration en fer comparé au lait de vache mais une composition en protéines plus faible que le lait de brebis. Il a été démontré que la saisonnalité ainsi que le régime alimentaire des animaux influençaient la composition du lait (Ianni et al., 2020).

### **6.2. Le sel**

Le sel est également un facteur modifiant la diversité microbienne. Bien que l'on considère les levures comme généralement halotolérantes, les différentes espèces du fromage ne le sont pas au même degré. *Debaryomces hansenii* est par exemple considérée comme plus résistante au sel que *G. candidum* (Boutrou and Guéguen, 2005). Il a été également montré que la croissance de certaines actinobactéries comme *Brevibacterium linens* était stimulée par un certain pourcentage de sel. La méthode de salage ainsi que la concentration en sel peuvent donc déterminer les espèces qui se développent en surface et les dynamiques associées.

### **6.3. Les paramètres physico-chimiques**

Le phénomène de désacidification de la surface illustre par ailleurs, l'impact du pH sur les communautés microbiennes. Si une acidification rapide est souhaitée pour assurer la coagulation et la formation du caillé, elle opère comme un filtre sur les différents micro-organismes présents initialement dans le lait.

De même, le gradient décroissant d'oxygène créé entre la surface et le cœur du fromage influe sur les espèces qui s'y développent. Certaines pratiques comme le retournement des fromages et la croissance de certains champignons filamenteux peuvent également influencer ce paramètre (Monnet et al., 2015).

La température et l'humidité conditionnent également la diversité microbienne. Dans une étude impliquant 137 fromages différents et d'origines géographiques différentes, Wolfe et al (2014) ont trouvé des corrélations fortes entre l'humidité et les espèces dominantes. Ainsi, les croûtes plus humides étaient associées aux genres *Geotrichum*, *Pseudomonas* et *Psychrobacter*, tandis que les croûtes plus sèches étaient associées à la présence des champignons filamenteux *Scopulariopsis*, *Aspergillus* et aux Actinobactéries

(*Brachybacterium*, *Corynebacterium* et *Brevibacterium*) suggérant ainsi que les paramètres d'affinage de température et d'humidité relative contribuaient également à modeler les communautés microbiennes en surface des fromages au niveau du genre.

Les caractéristiques initiales du lait mais aussi chaque étape de fabrication sont étroitement liées à des évolutions et des interventions de flores microbiennes qui vont modifier les paramètres physico-chimiques de la matrice, mais également les substrats de croissance, les précurseurs d'arômes disponibles et définir les caractéristiques organoleptiques finales du fromage particulièrement les fromages au lait cru.

## **IV. Microbiologie des olives de table**

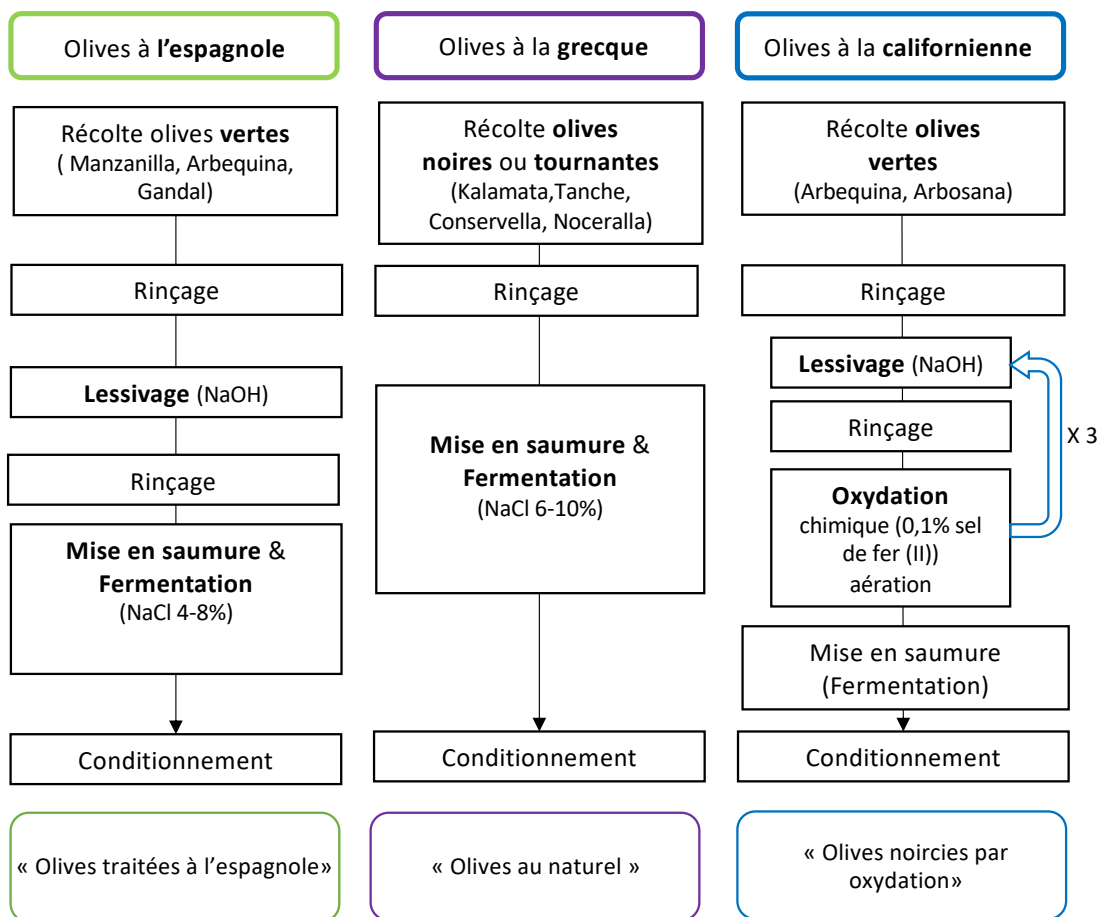
### **1. Caractéristiques des olives**

Les olives ont une importance économique et culinaire importante dans la région méditerranéenne. La région représente 95% des surfaces mondiales d'oliviers. Ces olives sont majoritairement dédiées à la production d'huile mais aussi d'olives de table. En 2019, la production mondiale d'olives atteignait plus de 2,5 millions de tonnes dont plus de 85% par les pays du bassin méditerranéen (International Olive Council, 2019).

L'olive est une drupe issue de l'olivier *Olea europaea*. Le fruit frais est particulièrement riche en huile (12-30%), en sucres (4-19%), pauvre en protéines (2%) mais riche en polyphénols dont l'oleuropéine (Zamora et al., 2001). Cette dernière molécule est responsable de l'amertume qui caractérise les fruits à la récolte. La composition biochimique de l'olive varie en fonction de la variété et de la maturité du fruit. Ainsi, les olives vertes qui correspondent au stade immature du fruit sont plus riches en oleuropéine et en sucres et plus pauvres en huile que les olives noires pleinement mures (Cheng et al., 2017). Ces différences de composition déterminent également leur méthode de fermentation. En effet, au-delà des aspects de conservation, la fermentation des olives a pour but premier de rendre le fruit mangeable en assurant complètement ou partiellement la désamérisation par dégradation de l'oleuropéine en des composés phénoliques non amers, l'hydroxytyrosol, le tyrosol et l'acide élénolique (Brenes and Castro, 1998).

### **2. Les procédés de préparations des olives de tables**

On recense trois grandes méthodes de préparation des olives : les olives vertes préparées « à l'espagnole », les olives préparées « à la californienne » et les olives « à la grecque » (Abriouel et al., 2012). Ces méthodes diffèrent principalement par le degré de maturité du fruit, la présence d'une étape préalable de lessivage et la part de fermentation (**Figure 5**). D'un point de vue commercial, la production d'olives de table vertes « à l'espagnole » est la plus importante, suivi par la méthode californienne.



**Figure 5. Schéma de préparation des olives de table selon les trois méthodes les plus couramment utilisées.** Schéma adapté de Heperkan et al. (2013) et Massilio et al. (2001)

- La méthode « **à l'espagnole** » concerne principalement les olives vertes. Les olives fraîchement cueillies, très concentrées en oleuropéine, sont rincées à l'eau puis baignées dans une solution de soude pour un temps plus ou moins long selon les producteurs (allant de 7 à 22h en fonction de la variété et de la concentration de la soude) dont la concentration varie entre 1,3 et 2,6 % en fonction de la variété. Durant cette étape de « lessivage », une grande partie de l'oleuropéine est éliminée du fruit par dégradation et diffusion (Brenes & Castro, 1998). Après un nouveau rinçage, les olives sont mises en saumure (6%) où la fermentation naturelle va avoir lieu sous l'action des micro-organismes autochtones. La fermentation dure entre 3 et 6 mois.
- La méthode « **à la californienne** » est également le plus souvent utilisée avec des olives vertes. La préparation inclut également une première étape de lessivage à la soude mais aussi une étape d'oxydation grâce à laquelle elles prennent leur teinte

noire. Cette oxydation peut être assurée par exposition à l'air ou par voie chimique (gluconate de fer). Les olives oxydées peuvent facultativement être mises en saumure. La phase de fermentation en saumure étant particulièrement réduite et sa production majoritairement industrialisée, cette méthode ne sera pas traitée dans la suite de cette partie bibliographique.

- La méthode « **à la grecque** » désigne les olives naturellement fermentées. Cette méthode est principalement utilisée pour la préparation d'olives noires, cueillies à pleine maturité ou d'olives violettes dites « tournantes » récoltées quelques temps avant d'atteindre leur maturité. Pour ce type d'olives, les fruits sont rincés puis directement immergés en saumure (entre 6 et 10%) pour fermentation. Puisqu'aucune étape de désamérisation n'est effectuée au préalable, le processus de fermentation est généralement plus long que pour les autres méthodes (de 6 mois à 1,5 ans).

Pour les méthodes « à la grecque » et « à l'espagnole », de nombreuses variantes existent en fonction des régions et des traditions locales. Ces différences vont surtout concerner la variété d'olive utilisée, leur forme, le pourcentage de soude et la composition de la saumure (pourcentage de sels, ajout d'acides...). Quelques exemples sont ainsi proposés en **Tableau 8**.

**Tableau 8. Exemples de procédés spécifiques de préparation d'olives de table**

Spécialité	Origine	Méthode	Maturité (variétés)	Étapes spécifiques	Référence
Olives à la sicilienne	Sicile	grecque	Vertes (Lechinno, Hojiblanca, Manzanilla)	Les olives sont récoltées vertes et mises dans un bain d'eau puis mises en saumure où la fermentation a lieu	Abriouel et al., (2012)
Olives confites/déshydratées	Grèce, Espagne, France, Maroc	grecque	Noires	Les olives sont fermentées en alternant olives et couches de sel sec en jarres hermétiques	Fernandez et al. (1997)
Olives "craquées"	Grèce	espagnole	Vertes (Manzanilla, Aloreña)	Les olives fraîches sont d'abord écrasées grossièrement, rincées puis mises en saumure. Le processus accélère la fermentation en favorisant la pénétration du sel jusqu'au noyau.	Alves et al. (2012)
Olives à la Picoline	Sud de la France	espagnole	Vertes (Luques, Picoline)	Lessivage puis fermentation en deux phases : 1ere mise en saumure à 5-6% de sel pendant 48h suivie d'une deuxième mise en saumure à 7% supplémentée en acides (pH 4,5) pendant 8-10j	Kiai and Hafidi (2014)
Olives de Kalamata	Grèce	grecque	Noires (Kalamata)	Variété d'olive spécifique ; fermentation en saumure et stockage en saumure supplémenté en vinaigre de vin	Kazou et al., (2020)
Olives de Nyons	Sud de la France	grecque	Noires (Tanche)	Variété d'olive spécifique ; fermentation dans une saumure à 10% pendant plus de un an	-

### 3. Les groupes microbiens impliqués dans la fermentation des olives

De nombreuses études se sont intéressées à la microbiologie des olives de table et ont montré que les bactéries lactiques et les levures sont les deux populations microbiennes les plus importantes pour la fermentation des olives (Arroyo-López et al., 2012; Heperkan, 2013). Que ce soit pour les olives de table noires ou vertes, une très grande diversité a été retrouvée au sein des deux groupes microbiens.

#### 3.1. Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques retrouvées dans les olives fermentées sont essentiellement des espèces homofermentaires. Les principales espèces appartiennent au genre *Lactiplantibacillus* (espèces anciennement assimilées au groupe *Lactobacillus plantarum*) : *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lactiplantibacillus paraplantarum*. D'autres genres bactériens hétérofermentaires et homofermentaires ont été impliqués dans des fermentations d'olives, avec une fréquence moindre, comme *Leuconostoc mesenteroides* et plus rarement *Pediococcus* (**Tableau 9**). Dans la plupart des fermentations d'olives, les bactéries lactiques sont responsables de l'acidification de la saumure via la production d'acide lactique par dégradation du glucose et du fructose présents dans les olives fraîches (Randazzo et al., 2010). Cette acidification est essentielle pour inhiber la croissance d'espèces indésirables d'altération et ainsi préserver les olives. Les bactéries lactiques contribuent également au développement des arômes par la production d'autres acides organiques via des voies métaboliques secondaires comme le métabolisme du citrate. Ces acides peuvent de plus constituer des intermédiaires et précurseurs disponibles pour les autres micro-organismes dont les levures.

**Tableau 9. Bactéries lactiques fréquemment identifiées au cours de la fermentation des olives**

Micro-organisme	Olive et type de préparation (variété)	Références
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (ex- <i>Lactobacillus plantarum</i> )	Olives noires à la grecque (Arbequina)	Hurtado et al. (2009)
	Olives noires à la grecque (Conservolea)	Bleve et al. (2015)
	Olives vertes à la grecque (Geracese and Nocellara Etnea)	Randazzo et al. (2012)
	Olives vertes à l'espagnole	Doulgeraki et al. (2013)
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> (ex- <i>Lactobacillus paraplantarum</i> )	Olives vertes à la grecque (Conservolea et Halkidiki)	Argyri et al. (2014)
<i>Loigolactobacillus carynoformis</i> (ex- <i>Lactobacillus coryniformis</i> )	Olives vertes à la grecque	Randazzo et al. (2012)
	Olives vertes à l'espagnole	Aponte et al. (2012)
<i>Levilactobacillus brevis</i> (ex- <i>Lactobacillus brevis</i> )	Olives vertes à la grecque	Randazzo et al. (2012)
	Olives noires à la grecque (Conservolea et Kalamata) Olives vertes à la grecque (Conservolea)	Doulgeraki et al. (2013) Panagou et al. (2008)
<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	Olives vertes à l'espagnole (Nocellara del Belice)	Aponte et al. (2012)
	Olives noires à la grecque (Arbequina)	Hurtado et al. (2009)
	Olives noires à la grecque (Kalamata)	Bleve et al. (2015)
	Olives vertes à la grecque (Tonda di Cagliani)	Comunian et al. (2017)
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Olives vertes à la grecque	Randazzo et al. (2012)
<i>Lactococcus lactis</i>	Olives vertes à l'espagnole (Bella di Cerignola)	De Bellis et al. (2010)
<i>Leuconostoc citreum</i>	Olives vertes à la grecque	Randazzo et al. (2012)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Olives noires à la grecque (Conservolea)	Doulgeraki et al. (2013)
	Olives noires de Kalamata (Kalamata)	Bleve et al. (2015)
<i>Pediococcus parvulus</i>	Olives vertes à la grecque (Geracese et Aloreña)	Abriouel et al. (2012)
	Olives vertes à la grecque (Tonda di Cagliani)	Randazzo et al. (2012) Comunian et al. (2017)
<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Olives vertes à l'espagnole (Manzanilla)	Lucena-Padrós et al. (2014) Lucena-Padrós and Ruiz-Barba (2019)
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Olives vertes à la grecque	Randazzo et al. (2012)
<i>Enterococcus</i> sp.	Olives vertes à l'espagnole	de Castro et al. (2002)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Olives vertes à l'espagnole (Bella di Cerignola)	De Bellis et al. (2010)
<i>Enterococcus italicus</i>	Olives vertes à l'espagnole (Bella di Cerignola)	De Bellis et al. (2010)

### 3.2. Les levures

Les levures sont des micro-organismes ubiquistes naturellement présents dans de nombreux environnements et notamment sur les fruits et végétaux. Leur capacité à croître à des pH faibles et pour certaines à de fortes concentrations en sel explique leur présence dans les fermentations des olives.

Les genres *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* sont parmi les genres les plus retrouvés dans les olives de table suivis de *Wickerhamomyces*, *Zygorhizomyces* et *Issatchenkia*. Parmi les trois premiers genres, une forte diversité spécifique a été observée (**Tableau 10**).



**Tableau 10. Levures fréquemment impliquées dans la fermentation des olives (adapté et complété à partir de Heperkan et al., 2013)**

Genre	espèce	Olive et type de préparation (variété)	Références
<i>Pichia</i>	<i>P. galeiformis</i>	Olives noires à la californienne	Arroyo-López et al. (2006)
		Olives vertes broyées	Rodríguez-Gómez et al. (2017)
		Olives vertes à la grecque (Alorena)	Abriouel et al., (2011)
	<i>P. membranifaciens</i>	Olives noires à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
Olives vertes à la grecque		Nisiotou et al. (2010)	
<i>P. kluyveri</i>	<i>P. kluyveri</i>	Olives noires à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
		Olives vertes à la grecque	Coton et al. (2006)
<i>P. guillermondii</i>	<i>P. guillermondii</i>	Olives vertes à la grecque	Aponte et al. (2010)
		Olives vertes à la grecque	Aponte et al. (2010)
<i>Citeromyces</i>	<i>C. maitritensis</i>	Olives vertes craquées	Alves et al. (2012)
	<i>C. nyonsensis</i>	Olives noires à la grecque	Coton et al. (2006)
<i>Candida</i>	<i>C. boidinii</i>	Olives noires à la californienne	Arroyo-López et al. (2006)
		Olives noires à la grecque (Tanche)	Coton et al. (2006)
		Olives noires à la grecque (Arbequina)	Hurtado et al. (2008)
		Olives vertes craquées	Alves et al. (2012)
		Olives vertes à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
	<i>C. diddensiae</i>	<i>C. diddensiae</i>	Olives vertes à la grecque (Alorena)
Olives vertes broyées			Alves et al. (2012)
<i>C. olivae</i>	<i>C. olivae</i>	Olives vertes à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
		Olives noires à la grecque	Nisiotou et al., 2010
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	Olives vertes à l'espagnole	Pereira et al. (2015)
		Olives vertes à l'espagnole	Pereira et al. (2015)
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. etchelsii</i>	Olives noires à la grecque	Coton et al. (2006)
		Olives vertes à l'espagnole	Bautista-Gallego et al. (2011)
<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>	Olives noires à la grecque	Nisiotou et al. (2010)
		Olives noires à la grecque	Nisiotou et al. (2010)
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Olives vertes craquées	Arroyo-López et al. (2006)
		Olives vertes à la grecque	Alves et al. (2012)
<i>Zygorhizula</i>	<i>Z. mrakii</i>	Olives vertes à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
		Olives vertes à la grecque (Alorena)	Arroyo-Lopez (2016)
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. anomalus</i>	Olives vertes craquées	Alves et al. (2012)
		Olives vertes à la grecque	Arroyo-Lopez (2016)
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. anomalus</i>	Olives noires à la grecque	Coton et al. (2006)
		Olives vertes à la grecque	Nisiotou et al. (2010)
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>W. anomalus</i>	Olives noires à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)
		Olives vertes à la grecque	Bautista-Gallego et al. (2011)

Les levures participent à différents aspects de la fermentation. Elles peuvent influencer la croissance de certaines espèces microbiennes, soit en agissant sur les conditions environnementales, soit en agissant directement sur les micro-organismes. Certaines levures sont capables *via* l'action de  $\beta$ -glucosidases de dégrader l'oleuropéine et de faciliter l'implantation des bactéries lactiques (Ruiz-Barba et al., 1993). Certaines souches appartenant aux espèces *Wickerhamomyces anomalus* (anciennement nommée *Pichia*

*anomala*) et *Pichia membranifaciens* synthétisent des protéines “killer” actives sur d’autres micro-organismes (Hernandez et al., 2007).

Les levures interviendraient également dans l’évolution des propriétés organoleptiques des olives (Arroyo-López et al., 2008). Elles participent à l’acidification par la production de certains acides organiques comme les acides acétique, succinique et formique (Montaño et al., 2003). Peu d’études se sont focalisées sur le rôle direct des levures dans la production de composés volatils particuliers, toutefois la caractérisation d’isolats issus de différentes fermentations ont révélé de fortes activités lipolytiques notamment chez *P. membranifaciens*, *Pichia galeiformis* et *Candida boidinii* (Hernandez et al., 2007; Rodríguez-Gómez et al., 2010). Selon certains auteurs, les levures contribueraient ainsi à augmenter le contenu en acides gras libres et également en acides aminés, précurseurs de nombreux esters et alcools secondaires (Bleve et al., 2015).

La présence de certaines levures a néanmoins été également assimilée à des altérations. Par exemple, la présence et la croissance excessive de levures fermentaires telles que *W. anomalus* et *Saccharomyces cerevisiae* est responsable du développement de poches de CO<sub>2</sub> sous la cuticule de l’olive ou dans la chair (Vaughn et al., 1972). D’autres espèces sont capables de dégrader l’acide lactique et diminuant de fait le pH ce qui peut favoriser le développement de flores d’altération (Aponte et al., 2012).

### **3.3. Les autres flores microbiennes secondaires**

D’autres flores microbiennes ont été fréquemment rapportées dans des fermentations d’olives. Ainsi, les bactéries à Gram négatif et entérobactéries sont très présentes en début de fermentation. Certains champignons filamenteux appartenant aux genres *Penicillium*, *Cladosporium* ou *Mucor* sont également retrouvés (Bavaro et al., 2017). La présence et une trop forte croissance de ces groupes microbiens ne sont néanmoins pas souhaitables et disparaissent généralement dans les premières semaines de la fermentation en raison des fortes concentrations en sel et de l’acidification par les bactéries et levures.

## **4. Les facteurs influençant la fermentation et la diversité microbienne associée**

Comme illustré dans le **Tableau 9** et le **Tableau 10**, si des espèces sont communes entre fermentations, il est à noter que les *consortia* microbiens sont variables entre les

différentes variétés d'olives de table. Ces différences peuvent être liées aux caractéristiques des olives mais également au processus de production.

La composition chimique des fruits frais est dépendante du cultivar et de la saison (Montaño et al., 2003). Concernant les flores microbiennes, une étude récente a également mis en évidence des différences de communautés microbiennes entre des olives d'un même cultivar mais récoltées sur des aires géographiques différentes suggérant un impact des conditions climatiques ou des pratiques agricoles (Argyri et al., 2020). En revanche, à ce jour, peu de données sont disponibles sur l'impact de l'environnement de production comme source de micro-organismes.

Les olives sont toujours en majorité produites par des méthodes traditionnelles reposant sur des fermentations spontanées mais avec des procédés très divers. Ces paramètres différents sont donc autant de facteurs susceptibles de modifier la diversité microbienne lors la fermentation. L'étape de lessivage peut notamment entraîner une perte des sucres de l'olive (Medina-Pradas and Arroyo-López, 2015) et modifie le pH. En conséquence, la fermentation débute en conditions alcalines plus ou moins favorables aux différents groupes microbiens (Medina et al., 2010). Cocolin et al. (2013) ont ainsi montré que les olives naturellement fermentées Aloreña de Madagña traitées à la soude et non traitées présentaient des communautés bactériennes différentes. Le traitement à la soude avait ainsi engendré une baisse des bactéries halophiles et une perte de la diversité intraspécifique de *Lactiplantibacillus plantarum*.

De même, le pourcentage de sel (entre 4 et 10% selon les préparations) et le taux d'oléuropéine peuvent avoir des effets inhibiteurs sur certaines flores microbiennes (Heperkan, 2013; Tassou et al., 2002). Abriouel et al., (2011) ont également montré que la température avait un effet sur la diversité microbienne, de même que la cuve de fermentation. L'importance d'un groupe microbien par rapport à l'autre peut varier en fonction d'une méthode de préparation à une autre et au cours de la fermentation. Ainsi, les bactéries lactiques sont particulièrement retrouvées en fermentation à l'espagnole tandis que les levures sont prépondérantes chez les olives noires naturellement fermentées (Arroyo-López et al., 2012).

Les dynamiques microbiennes au cours de la fermentation seront donc déterminées par la capacité d'adaptation des micro-organismes à l'environnement qui, lui, conditionne leur capacité à exprimer certaines activités métaboliques.

# Problématique et objectifs des travaux de thèse

Les aliments fermentés traditionnels ou artisanaux représentent une part importante du patrimoine et de la culture de chaque région et sont associés à un savoir-faire souvent ancien. Ces pratiques ancestrales suscitent actuellement un regain d'intérêt, en raison de la demande actuelle des consommateurs pour des aliments «naturels» par opposition aux productions industrielles. Les aliments fermentés traditionnels bénéficient ainsi d'une image positive avec des propriétés gustatives et nutritionnelles recherchées.

Ces caractéristiques uniques sont liées aux communautés microbiennes qu'ils renferment. Dans une grande partie des cas, leur fabrication met en jeu des fermentations naturelles, c'est-à-dire des fermentations sans intervention de cultures microbiennes ajoutées.

Comme présenté lors de cette introduction, de nombreuses études se sont donc attachées à caractériser les populations microbiennes associées à ces aliments fermentés et ont montré qu'ils renfermaient une grande diversité microbienne. Cette richesse est très variable selon les aliments fermentés et au sein d'un même type d'aliment. En effet, si les groupes microbiens impliqués sont semblables, à savoir bactéries lactiques et levures, et que certaines espèces sont communément retrouvées, les communautés microbiennes sont complexes et différent par leur assemblage et les *consortia* impliqués. Chaque aliment traditionnel peut donc être caractérisé par une flore microbienne qui lui est propre. Étudier les aliments fermentés artisanaux différents permet donc d'augmenter les connaissances liées à la diversité taxonomique des communautés microbiennes autochtones et leurs fonctionnalités. De plus, il s'agit également de préserver cette biodiversité et les micro-organismes autochtones dont les fonctions métaboliques peuvent être d'intérêt.

Une caractérisation de la diversité microbienne qui constitue un aliment fermenté est également importante pour le producteur, dans la mesure où certains de ces micro-organismes assurent le bon déroulement de la fermentation tant du point de vue de la qualité organoleptique que de la qualité sanitaire du produit final. Il s'agit donc de savoir quels sont les micro-organismes moteurs de la fermentation et ceux présentant des risques. Une

meilleure description des spécificités de chaque produit artisanal peut également aider à promouvoir leur consommation et protéger la filière locale de production.

L'étude bibliographique réalisée a montré que les données disponibles à ce jour se concentraient surtout sur des analyses du produit en fin de fermentation. Or, les matières premières utilisées mais aussi chaque étape de fabrication, sont susceptibles d'influencer les communautés microbiennes. L'analyse du produit final ne rend pas nécessairement compte de la succession des acteurs de la fermentation. Il est donc important de considérer les dynamiques au cours de l'élaboration du produit tant au niveau des évolutions microbiennes que biochimiques.

Dans le cas des fabrications artisanales, la dimension environnementale est particulièrement importante. Celles-ci sont en effet moins contrôlées et constituent des écosystèmes ouverts. De fait, l'environnement de production est susceptible d'influencer les communautés microbiennes par les facteurs environnementaux qu'il impose mais aussi comme source de micro-organismes bénéfiques ou potentiellement délétères.

Si des études ont été menées sur chacune de ces composantes (microbienne, biochimique et environnementale) pour le fromage et, dans une moindre mesure pour les olives, la grande majorité se focalisait sur un aspect. Or, pour un même aliment fermenté, la grande variabilité de procédés et de matières premières rend les comparaisons entre études limitées. En d'autres termes, les phénomènes biochimiques et métaboliques associés à ces produits sont la résultante des liens entre micro-organismes et matières premières, avec l'environnement de production et des populations microbiennes entre elles. Il apparaît donc pertinent pour étudier les communautés microbiennes d'un aliment fermenté de prendre tous ces différents aspects en considération pour permettre une meilleure gestion des ressources microbiennes impliquées dans la fabrication d'un aliment fermenté.

Ces travaux de thèse ont pour but d'étudier les communautés bactériennes et fongiques impliquées dans la production de deux produits fermentés labellisés Appellation d'Origine Protégée et issus de fermentations naturelles : le Pélardon, un fromage de chèvre au lait cru, et les olives noires de Nyons. Pour chaque produit, les études ont été réalisées en étroit

partenariat avec un producteur local afin de jauger au mieux de différentes composantes évoquées ci-dessus.

Plus précisément, pour chaque produit, les questionnements scientifiques étaient les suivants :

- **Quelles sont les communautés, bactériennes et fongiques, présentes et comment évoluent-elles au cours de la production ?**
- **Dans quelle mesure le procédé de fabrication et l'environnement influencent ces communautés ?**
- **Comment évoluent les caractéristiques biochimiques du produit au cours de la fermentation et quels sont les micro-organismes y contribuant ?**
- **Comment exploiter les micro-organismes autochtones bénéfiques au profit du producteur ?**



---

# RÉSULTATS

---





---

# **Chapitre I - Étude de la diversité microbienne du Pélardon**

---



## **I. Résumé des travaux**

### **▪ Présentation du produit**

*Une description détaillée des caractéristiques du Pélardon et de sa fabrication sont disponibles en **partie II** de ce chapitre.*

Le Pélardon est un fromage traditionnel au lait cru de chèvre, labellisé AOP depuis 2000 et produit de façon artisanale. Il est uniquement produit dans le sud de la France dans la région montagneuse des Cévennes. Il s'agit d'un petit fromage (60 g) rond qui se caractérise par une pâte crémeuse et une croûte naturelle beige, blanche parfois bleue selon les producteurs. Les notes aromatiques qui y sont associées sont des notes maltées, de beurre et végétales.

Le Pélardon est un aliment intéressant à étudier d'un point de vue microbiologique et ceci par de nombreux aspects :

- il est uniquement préparé avec du lait cru de chèvre ;
- sa production interdit le recours à des ferments commerciaux et l'inoculation est assurée par *backslopping* à partir du lactosérum d'une précédente fabrication ;
- il est uniquement produit de manière artisanale et à une exception près, par des producteurs-éleveurs.

Les flores naturellement présentes dans l'environnement et les matières premières sont donc susceptibles de jouer un rôle prépondérant dans les caractéristiques du Pélardon.

Pour cette étude, nous avons travaillé avec un producteur-éleveur de chèvre basée dans le Gard, qui a activement participé à la mise en place de cette AOP et dont la production a été considérée comme représentative du savoir-faire associé au fromage.

### **▪ Objectif de l'étude et stratégie expérimentale**

Cet travail avait pour objectif d'étudier les communautés microbiennes du Pélardon au cours de sa fabrication et de l'affinage et d'en appréhender les acteurs clés. La stratégie implémentée s'articulait autour de trois axes de recherche.

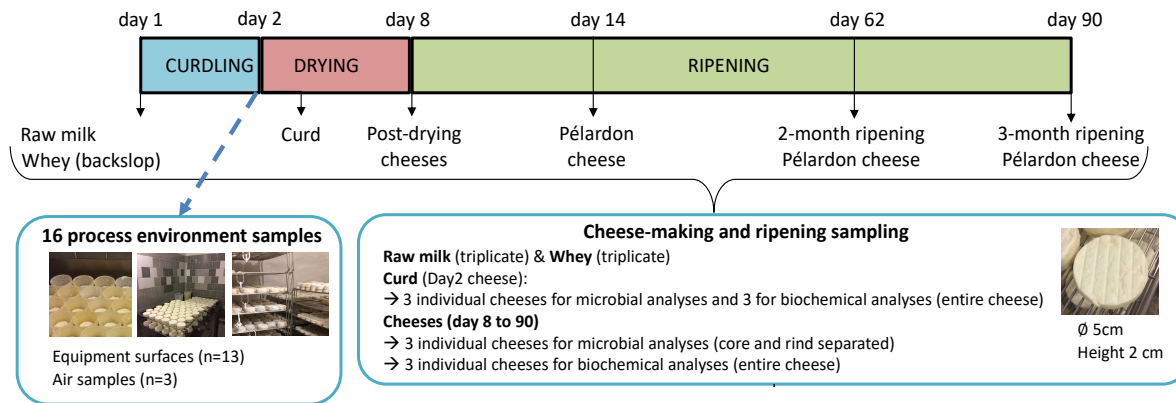
Dans un premier temps, les dynamiques de communautés bactériennes et fongiques ont été caractérisées par une approche polyphasique incluant une phase culture-dépendante et une phase culture-indépendante. L'approche culture-dépendante reposait sur l'utilisation de 8 milieux de culture différents afin d'une part, d'estimer les niveaux de populations microbiennes viables, et d'autre part, d'accéder à travers l'isolement et leur identification à la diversité taxonomique. Pour ce faire, une approche combinée de déréglication par MALDI-TOF et de séquençage a été appliquée à 2877 isolats. L'approche culture-indépendante a été réalisée par analyse métagénétique ciblant la région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S et la région ITS2 pour les communautés bactériennes et fongiques, respectivement. Les conditions d'extraction d'ADN et d'amplification avaient été validées en amont lors d'une étude préliminaire (**annexe 2**).

Dans une seconde partie, les dynamiques d'espèces révélées ont été corrélées (Pearson) aux changements biochimiques, à savoir l'évolution des sucres et acides organiques quantifiés par HPLC ainsi que l'évolution du volatilome par headspace-GC-MS, afin d'estimer la contribution de chaque espèce au profil aromatique au cours de la fabrication et de l'affinage.

Le troisième axe visait à mettre en évidence d'éventuels vecteurs microbiens dans l'environnement de fabrication et notamment l'origine des principaux acteurs microbiens de la fabrication précédemment identifiés. Des prélèvements ont ainsi été réalisés au sein des locaux de la fromagerie et dans les matières premières. Le liste des prélèvements est disponible en **annexe 1** de ce chapitre. Ces échantillons d'environnement ont été analysés selon les approches culture-dépendante et -indépendante précédemment décrites.

## ▪ Échantillonnage

Comme évoqué en introduction bibliographique, les communautés microbiennes sont influencées par de nombreux facteurs. Il s'agissait donc dans un premier temps d'établir le plan d'échantillonnage au cours de la fabrication et de cibler les étapes de fabrication reflétant au mieux les changements au sein des communautés microbiennes. Pour ce faire, une visite au sein de la fromagerie a été réalisée et le producteur-partenaire a été interviewé afin de connaître les caractéristiques attendues du Pélardon et les étapes importantes de sa production. Les principales informations relatives aux caractéristiques du Pélardon et une description détaillée du procédé de fabrication sont disponibles en **partie 1** de cette étude.



**Figure 6. Échantillonnage réalisé pour l'étude du Pélardon**

Sur la base du schéma de fabrication, 5 points de prélèvements ont été identifiés comme pertinents pour l'étude des dynamiques des communautés microbiennes en plus des matières premières, à savoir le lait cru (J1) et le lactosérum utilisé pour le *backslopping*: le caillé acidifié (J2) compte-tenu des changements physico-chimiques opérants durant la coagulation, le fromage post-séchage (J8) qui résulte de l'addition de sel en surface et marque le début de formation de la croûte du Pélardon, et le cœur et la coûte correspondant à trois stades de l'affinage. Pendant l'affinage, les caractéristiques organoleptiques des Pélardons évoluent fortement et la durée d'affinage est variable. Selon le cahier des charges AOP, la durée minimale est fixée à une semaine mais peut aller jusqu'à plusieurs mois. En conséquence, trois stades d'affinage, une semaine (J14), 2 mois (J62) et 3 mois (J90) ont été sélectionnés (**Figure 6**).

Comme évoqué précédemment, cette visite sur site au sein de la fromagerie a également permis de mener une campagne de prélèvements dans l'environnement de fabrication dans le cadre de la recherche de vecteurs microbiens. Au cours de cette campagne réalisée au jour 2 (J2) de la fabrication étudiée, seize échantillons ont ainsi été collectés à partir de différentes zones parmi lesquels se trouvaient : les intrants tel que le sel utilisé pour l'étape de salage, les surfaces des différents contenants et les supports utilisés au cours de la fabrication tels que les bacs d'acidification, les grilles de séchage et d'affinage.

**Ces travaux ont fait l'objet de l'article 1 (soumis à IJFM) présenté en partie II du présent chapitre. Les principaux résultats sont rapportés ci-après.**

- Dynamiques des communautés microbiennes par approche polyphasique

Dans la première partie du travail, les dynamiques bactériennes et fongiques à six étapes différentes ont été étudiées par approche polyphasique. La diversité augmentait au cours du processus.

Dans le lait cru, de faibles populations microbiennes et fongiques ( $1 \log_{10}$  CFU/g) ont été mises en évidence par approche culture-dépendante. Les communautés bactériennes étaient essentiellement dominées par des staphylocoques à coagulase négative et les bactéries lactiques étaient peu représentées.

L'acidification (J2) a été concomitante à une augmentation des populations de lactocoques ( $8 \log_{10}$  UFC/g) et fongiques ( $5 \log_{10}$  UFC/g) dans le caillé, avec une prédominance de *Lactococcus lactis* pour les bactéries et *Geotrichum candidum* pour les champignons.

*L. lactis* s'est maintenue comme espèce dominante au cours du séchage (J8) avec toutefois une augmentation de l'abondance d'autres espèces telles que *Leuconostoc mesenteroides* et *Lacticaseibacillus casei/paracasei* dans le cœur du fromage. La croûte des fromages post-séchage était toujours dominée par *G. candidum*.

Les résultats aux différents stades d'affinage (J14, J60 et J90) ont été en revanche marqués par de fortes divergences entre les deux approches d'analyse (culture-dépendante et culture-indépendante), menant à des visions très différentes des communautés microbiennes, que ce soit en surface ou au cœur du Pélardon. Ainsi, cinq genres parmi lesquels *Lactobacillus* et *Enterococcus*, n'ont été détectés que par l'analyse culture-dépendante tandis que six autres genres (i.e *Brachybacterium*, *Acinetobacter*) n'ont été mis en évidence qu'à travers l'approche culture-indépendante. Ces genres correspondaient à des populations sous-dominantes.. En ce qui concerne les espèces du genre *Enterococcus*, on peut imputer cette divergence de résultat au fait qu'il y a une forte différence de niveau de populations entre ces entérocoques et la population dominante ( $10^3$  UFC/g pour les entérocoques contre  $10^8$  UFC/g pour les populations lactiques en surface), ce qui rend impossible leur détection par la méthode culture-indépendante utilisée. En revanche, il n'en est pas de même pour *Lacticaseibacillus casei/paracasei*. Cette espèce représentait jusqu'à près de la totalité des flores lactiques cultivables en cœur et en surface et n'a pourtant pas été détectée par l'analyse métagénomique. A l'inverse, sur la base des analyses métagénomiques, *L. lactis* restait dominante tout au long de l'affinage et représentait 30 à 90 % des communautés microbiennes en surface et près de la totalité des communautés bactériennes au cœur, tandis qu'elle n'était plus détectée sur aucun des milieux utilisés par approche-culture dépendante dès le premier stade d'affinage étudié (J14). Le phénomène de lyse des flores d'acidification au cours de l'affinage est un phénomène assez documenté et ainsi,

la dominance de *L. lactis* pourrait être liée à une amplification d'ADN de cellules mortes ou d'ADN résiduel. Le passage des *L. lactis* à l'état Viable Non Cultivable (VNC) ne peut être exclu et expliquerait l'absence totale d'isolats sur les milieux de culture.

En analyses complémentaires, l'amplification correcte des *L. paracasei* avec les amorces utilisées en métagénétique a été vérifiée sur des isolats correspondants à différents stades d'affinage et la bactérie a également été quantifiée par PCR quantitative. Les résultats ont révélé des populations à hauteur de  $10^6$  et  $10^7$  copies/g en surface et en cœur respectivement au dernier stade d'affinage, éliminant ainsi tout biais lié à un problème d'amplification ou d'extraction d'ADN. Plusieurs hypothèses ont été envisagées et discutées pour expliquer cette divergence.

Compte-tenu de ces résultats et particulièrement des analyses complémentaires réalisées, les dynamiques révélées par analyse métagénétique semblaient peu représentatives de la diversité observée par approche culture-dépendante. Aussi, seules les dynamiques microbiennes obtenues par analyse culture-dépendante ont été utilisées pour le reste de l'étude.

- Analyse de corrélation et contribution des espèces de communautés microbiennes aux composés aromatiques du Pélardon

Parmi les espèces bactériennes et fongiques révélées aux différents stades de la fabrication et d'affinage du Pélardon, toutes ne sont pas susceptibles de contribuer de la même façon aux caractéristiques finales du fromage. Afin de discerner les espèces impliquées, une analyse de corrélation entre les abondances des différentes espèces et l'évolution des composés biochimiques au cours de la fabrication a été réalisée.

Les analyses biochimiques ont ciblé trois classes de composés : les sucres (n=2), les acides organiques (n=5) impliqués dans le métabolisme des sucres et les composés volatils (62 composés identifiés, tous stades de fabrication confondus) qui participent à la composante aromatique des fromages.

Les changements majeurs au niveau des sucres et acides concernaient l'acide lactique et l'acide citrique. Le lactose retrouvé en concentration abondante dans le lait cru était, comme attendu, pratiquement consommé à l'issue de l'acidification. Cette déplétion était concomitante à l'augmentation de la concentration en acide lactique jusqu'au stade post-séchage. Par la suite, la concentration en acide lactique a progressivement diminué jusqu'à être non détectée dès le premier stade d'affinage (J14). L'acide citrique a été détecté tardivement, à partir de deux mois d'affinage (J62) et s'est maintenu à une concentration stable de 0,5 mg / g de fromage jusqu'au dernier stade d'affinage considéré. Concernant le volatilome, les différents stades de fabrication



étaient clairement distinguables par leur profil de volatils et les composés identifiés séparés en quatre groupes selon leur abondance maximale respective.

L'analyse de corrélation de Pearson menée à partir de ces données biochimiques et des données microbiennes (analyse culture-dépendante) ont fait ressortir quatre espèces bactériennes (*L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. paracasei* et *Enterococcus faecalis*) et trois espèces fongiques (*G. candidum*, *Penicillium commune* et *S. brevicaulis*) au cours de la fabrication et de l'affinage. *L. lactis* a été, comme escompté, identifiée comme responsable de l'acidification en raison de sa forte corrélation à l'acide lactique mais également à l'acétoïne. *G. candidum* et *L. mesenteroides*, principalement dominants durant l'étape de séchage, étaient corrélés à des composés volatils issus du catabolisme des acides aminés (acide 3-méthylbutanoïque, acide 2-méthylpropanoïque, 2-phényléthanol). Les plus fortes corrélations avec les cétones et les esters, correspondant aux composés les plus abondants aux stades avancés d'affinage ont été observés pour *S. brevicaulis* et *L. paracasei* et dans une moindre mesure *P. commune* et *E. faecalis*.

▪ Vecteurs microbiens et sources de micro-organismes au sein de l'environnement de fabrication

Les potentielles sources de micro-organismes ont été étudiées à travers l'analyse d'échantillons collectés dans l'environnement de production. Les échantillons regroupaient des matières premières (lactosérum et sel), des prélèvements de surfaces du matériel de production et des contaminants aériens des trois salles de production (fabrication, chambre de séchage et cave d'affinage).

Les résultats ont montré que le lactosérum utilisé pour le *backslopping* contribuait fortement à l'apport des bactéries d'acidification (*L. lactis*) mais apportait également la flore initiale d'affinage. *G. candidum* était en effet la seule espèce fongique identifiée dans le lactosérum avec des populations à hauteur de 5,5 log<sub>10</sub> UFC/mL. Elle dominait à l'issue de l'acidification au cœur et en surface du fromage et ceci, jusqu'aux deux premiers mois d'affinage. Le champignon a néanmoins été retrouvé dans l'ensemble des prélèvements d'environnement comme la flore fongique dominante. Aussi, pour étudier les éventuels réservoirs microbiens, une approche plus qualitative que quantitative a été employée (**Supplementary Fig. S6**). Une forte diversité a été retrouvée dans les prélèvements de surface avec 28 et 35 espèces identifiées par approche culture-dépendante et -indépendante, respectivement. Les résultats ont également souligné l'impact de l'environnement dans la composition des communautés microbiennes de surface, puisque de nombreuses bactéries appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Brevibacterium* et *Glutamicibacter* ont été notamment retrouvées sur les surfaces des claies

propres en salle de fabrication et les claies en chambre de séchage et d'affinage. Ces espèces étaient par ailleurs absentes des matières premières. La conclusion était similaire concernant les espèces de champignons filamenteux dominantes en surface du Pélardon (*S. brevicaulis*, *Penicillium* spp.). Elles étaient omniprésentes dans les atmosphères et sur le matériel des chambres de stockage et séchage.

Il faut néanmoins souligner qu'aucune espèce appartenant aux genres *Lacticaseibacillus* (ex-*Lactobacillus*) ou *Enterococcus* n'a été retrouvée dans aucun des prélèvements d'environnement ou de matières premières malgré leur présence significative au cœur et en surface des Pélardons affinés. Ceci peut potentiellement s'expliquer par le manque de sélectivité du milieu d'isolement ou une présence à trop faible niveau. Ce qui souligne le fait que d'autres sources de micro-organismes restent à identifier.

En conclusion, cette étude a mis en évidence les communautés microbiennes associées au Pélardon et les espèces associées aux différents stades de fabrication. Le Pélardon se caractérise par une forte diversité bactérienne marquée par une succession d'espèces différentes à chaque stade. En comparaison, la diversité fongique associée au Pélardon s'est avérée assez faible et repose essentiellement sur *Geotrichum candidum*. Ce résultat peut s'expliquer par la forte prépondérance de l'espèce dans le lactosérum inoculé par *backslopping* en amont de l'acidification. Grâce à l'analyse de corrélation entre d'une part, les composés issus du métabolisme des sucres et les composés d'arômes et d'autre part, la liste des espèces présentes, des informations ont pu être apportées quant aux espèces contribuant le plus aux changements biochimiques observés au cours de la fabrication et particulièrement au cours de l'affinage.

D'un point de vue méthodologique, l'approche culture-dépendante combinant MALDI-TOF et séquençage s'est avérée efficace pour révéler la diversité taxonomique et les dynamiques microbiennes. Les conclusions qui en ont découlé étaient dans le cas présent comparables aux données obtenues par analyse métagénétique jusqu'à un certain stade : si les deux méthodes s'accordaient sur les communautés microbiennes au cours de la fabrication du fromage, les conclusions divergeaient quant à l'affinage. Si plusieurs hypothèses ont été évoquées, des analyses complémentaires seraient nécessaires pour les valider / invalider. Ce dernier point illustre par ailleurs la nécessité d'une double approche dans l'étude des communautés microbiennes.

## II. Présentation du Pélardon

*Le document ci-après a été rédigé dans le cadre du projet PROMEDFOODS. La collecte de ces informations avait pour but de mieux comprendre les caractéristiques associées au produit et les aspects liés à sa production afin d'identifier les points d'intérêt en termes de vecteurs microbiens.*

### Description of the product

#### Pélardon characteristics

Pélardon also known as « Pélardon des Cévennes » is a French raw goat's milk rind cheese.

It was granted Controlled Designation of Origin in 2000, today replaced by the European Protected Designation of Origin (PDO). The request was initiated by the producers themselves to protect the typicity of the product but also the cheesemakers after some abuses occurred related to its production.

Characteristics of Pélardon are precisely established and the PDO syndicate assesses cheesemakers' productions every year to verify compliance with the criteria (**Tableau 11**).



**Figure 7. Pélardon cheese typical aspect**

**Tableau 11. Characteristics of the Pélardon cheese according to the PDO syndicate and its producers**

Characteristic	Targeted descriptors
Weight	Superior to 60 g
Dimensions	Diameter between 60 and 70 mm ; height between 22 and 27 mm
Composition	Fat content superior to 45 % ; dry matter content 40%
Visual aspect and colours	Thin white, yellow rind ; sometimes blue molds on the surface ; white core
Texture	Homogenous and creamy but not flowing inside
Flavours, smell	Vegetal (hay, floral, wood, nut) and lactic (buttery but not rancid) aromas ; yeasty flavour but not spicy

## Production area

Pélardon is exclusively produced in two southern mountainous areas of France: the Cévennes and the Causses. This area of production covers part of the departments of Lozère, Guard, Hérault and Aude (**Figure 8**). There, the landscape is characterized by hilly lands and valleys where pastoralism is historically important. According to the local producers, the typicity of Pélardon as a traditional product relies on these practices as it impacts the feeding of the goats and thus the milk characteristics. Respect of pastoralism is a central requirement of the PDO requirements and Cheesemakers have to furnish a detailed map of the lands where the goats are kept and feed.

As a consequence, Pélardon's production is mostly performed by cheesemakers with their own farms and rearing. Currently there is only one cooperative based in Lozère other than farms producing Pélardon.

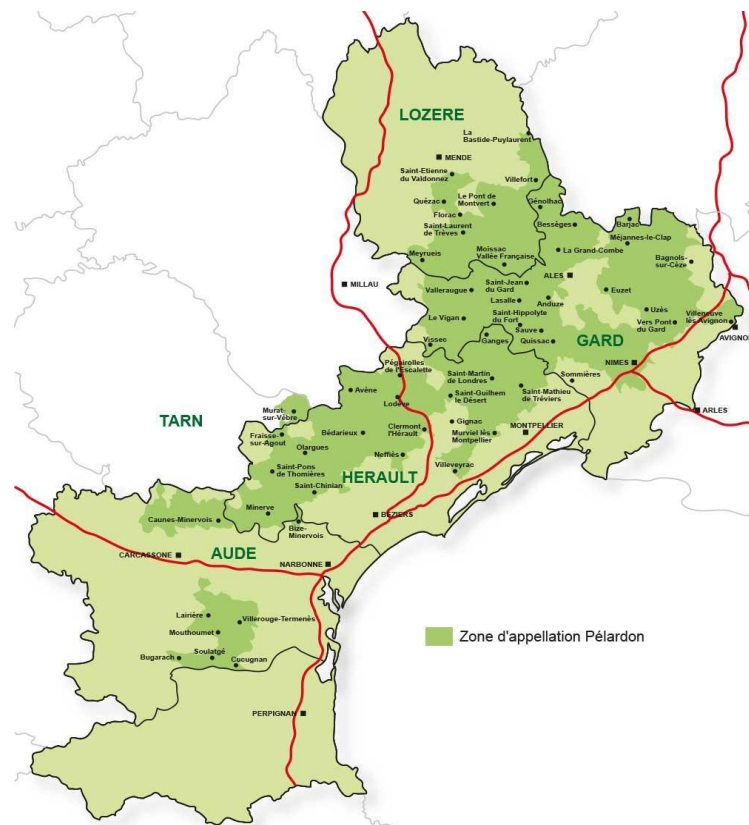


Figure 8. Production area of PDO Pélardon cheese

## Consumption & place in the local culture

With a strong traditional background, Pélardon is mostly known in the different regions where it is produced and sold locally directly at the farm, on markets (64.5%) to families and to restaurants and shops. Export at a national level is restricted to the Paris area. Although

Pélardon cheese is consumed year round, although a peak is registered during the spring and summer periods. This can be related to the production period as it follows the lactation cycle of the goats. Indeed, the goat's dry-off usually happens in November and the production remains interrupted until March. During that time, the consumption declines as the use of frozen curd is forbidden by the PDO requirements.

Like the majority of cheeses, Pélardon is eaten every day and during every meal and as an appetizer. It is mostly consumed raw or warm in salads. Some customers may prefer it because goat milk is known for being poorer in fats than cow milk but its appreciation globally relies on its creamy and soft taste as described above.

### **Local Partner for the study**

The local Partner is a GAEC (collective farming group) located in the Cévennes area. Our partner has decided to remain anonymous. Nevertheless, due to our partner's involvement in Pélardon cheese promotion and help building the PDO requirements, his know-how and process can be considered representative of the traditional Pélardon cheese-making process.

## **Cheese-making process**

### **Production pattern and PDO requirements**

Pélardon manufacture is submitted to strict requirements in relation with its PDO status with strongly established steps and parameters such as percentage of rennet, drying and maturation conditions (**Figure 9**).

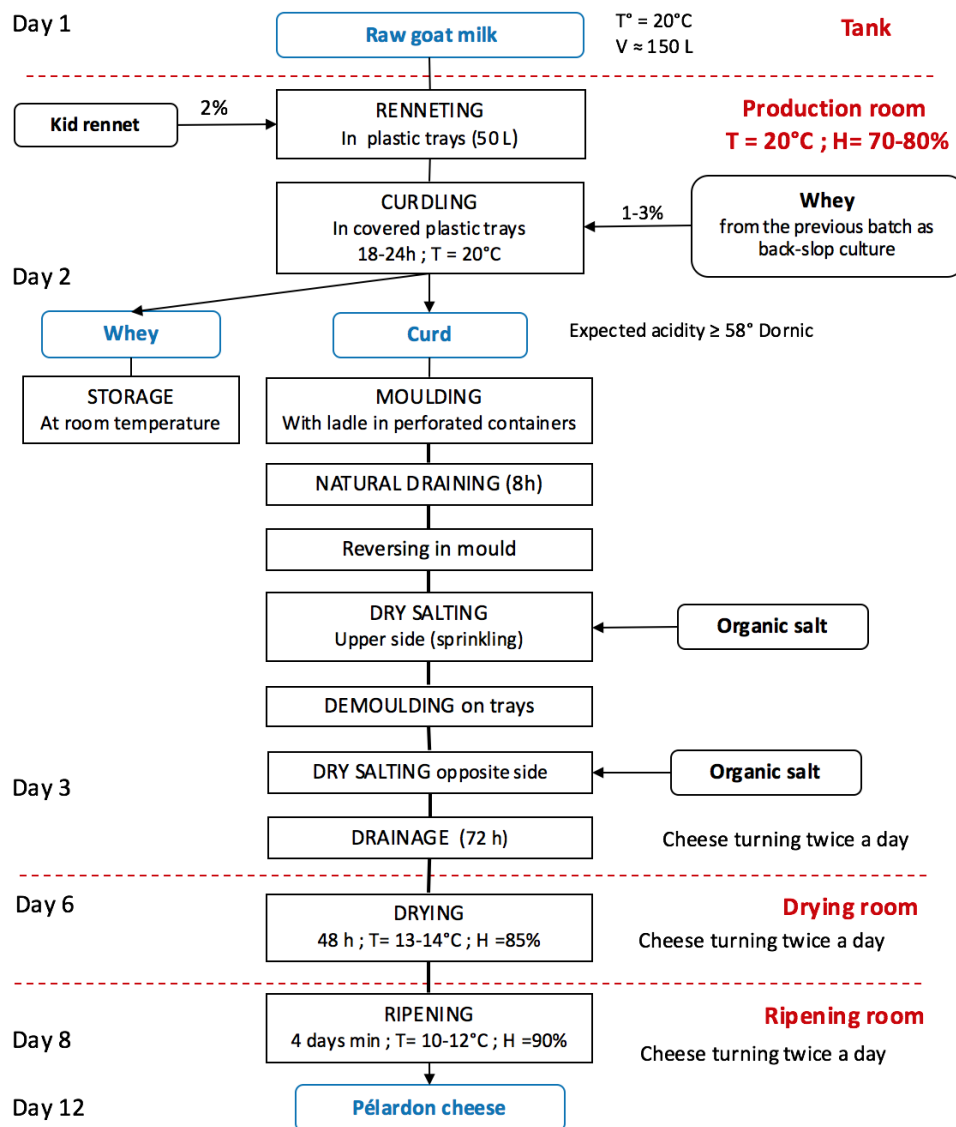


Figure 9. Pélardon cheese making process diagram

Regarding the impact of the raw materials on the final product, raw milk composition is responsible for seasonal variability of the product: in spring, Pélardon cheese is creamier and a stronger aroma of chestnut is observed. In the summer, Pélardon cheese has the strongest aromas. Such difference can be explained by the goat's feeding which is highly dependent on the vegetation available in the pastures. Microorganisms that are responsible for curdling essentially come from the backslopping step using the whey of the previous batch. Any other method is forbidden except in two cases: at the start of the production in spring and when the whey microbial quality does not allow efficient coagulation. In these cases, the use of frozen whey (with half boiled goat's milk) or the whey from another cheesemaker are tolerated. The first solution is the one our local producer relies on.

Rind development is influenced by the two dry-salting steps before draining and drying. The addition of the salt is performed by manual sprinkling and is thus dependent on the worker.

During all the steps, but especially the final ones, the cheesemaker's know-how determines the final texture and rind development of the Pélardon by adjusting drying and ripening durations as well as the position of the cheeses in the drying and maturation rooms. Moreover, the production environment is also a key element as it influences the development of molds on the surface. For instance, according to our local partner, Pélardon cheese does not always have blue molds on the rind and it highly depends on the natural microorganisms encountered in the cheesemaker's maturation room.

### **Quality aspects & past encountered defects**

As a raw milk cheese, Pélardon is subject to microbiological criteria before its commercialization (EU regulation n° 1441/2007): two safety criteria “*Salmonella: absence in 25g*” and “*Listeria monocytogenes: absence in 25 g*” and one process hygiene criteria “*coagulase positive Staphylococci: m = 104 CFU/g, M = 105 CFU/g*”. Compliance with these criteria is ensured through quality analyses twice a year performed by the company Qualisud. Raw milk microbial quality is also determined regularly. The facilities dispose of a HACCP plan and workers are trained to follow good hygiene practices.

According to our local partner, quality defects rarely happen. The most frequent problem encountered is poor development of the rind of the cheese (3% of the production in 2017) supposedly due to the wrong temperature being used for ripening. In the past, the producer faced two bacterial quality defects involving too high *Leuconostoc* and *Pseudomonas* populations and resulted in unacceptable curd texture and yellow spots appearing on the surface of the cheese, respectively. During ripening, fungal contamination once appeared as cat hairs and was characteristic of *Mucor* sp. on the cheese surface.

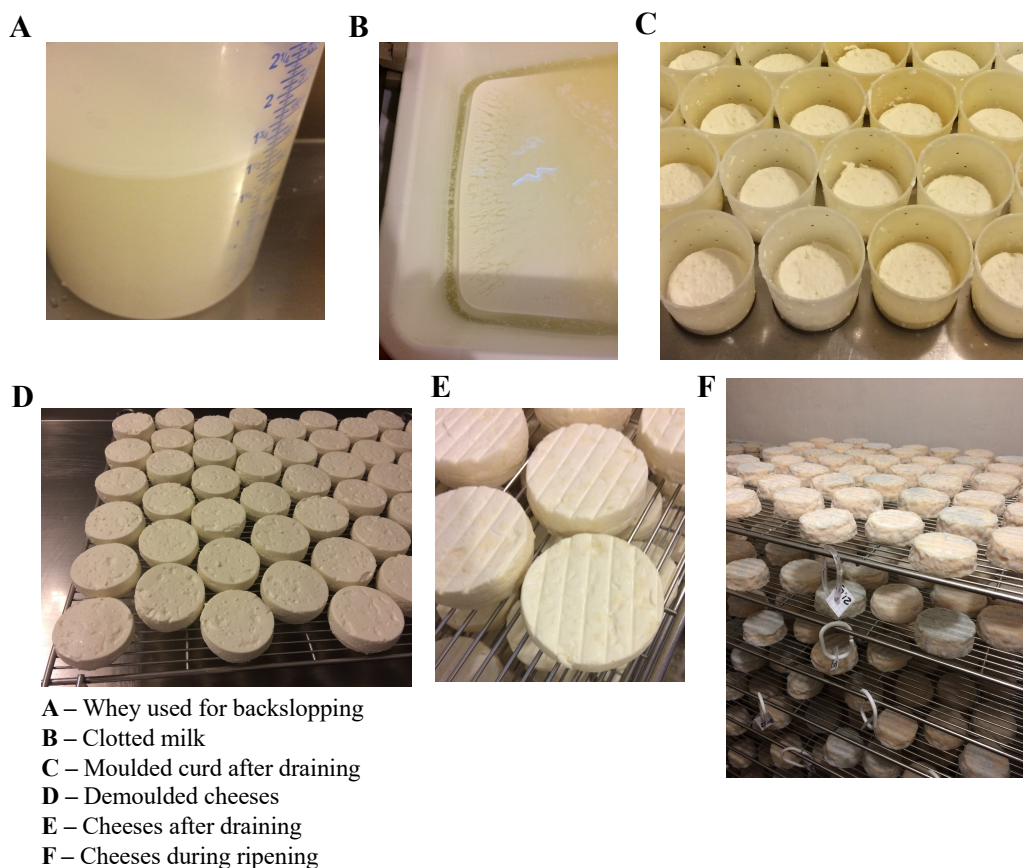
### **Conclusion**

Pélardon cheese making is rooted in the culture and tradition of the Cévennes region. Visiting the cheese dairy and following the entire production process allowed us to identify the relevant sampling points and the potential microbial sources or reservoirs.

## What are the relevant sampling points to monitor microbial communities ?

Besides raw milk which is the starting point, three steps were identified as relevant to study microbial community changes during cheese-making (**Figure 10**):

- **Post-acidification** curd (day 2) seems to be a mandatory sampling point considering the physico-chemical changes leading to curd formation and also reflects the impact on whey on the process ;
- **Post-drying** cheeses at day 8 of cheese-making are the result of major changes with the addition of salt on the surface, the changes of environmental conditions and concomitant with the beginning of the rind formation ;
- **Ripening** of Pélardon cheese can last from one week (minimal ripening time according to PDO requirements) up to several months according to our local partner customers habits. As a result, different ripening stages should be sampled including these two extreme stages, especially since the aspect of Pélardon cheese highly evolves during ripening.



**Figure 10. Pélardon cheese production steps**



### **III. Article soumis à International Journal of Food Microbiology**

**Penland M.**, Falentin H., Parayre S., Pawtowski A., Maillard M., Thierry A., Mounier J., Coton M. and Deutsch S. (2020). Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *Submitted to International Journal of Food Microbiology.*

1 **Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma**  
2 **compounds during cheese-making and ripening**

3 Marine Penland<sup>1,2</sup>, Hélène Falentin<sup>1</sup>, Sandrine Parayre<sup>1</sup>, Audrey Pawtowski<sup>2</sup>, Marie-  
4 Bernadette Maillard<sup>1</sup>, Anne Thierry<sup>1</sup>, Jérôme Mounier<sup>2</sup>, Monika Coton<sup>2</sup> & Stéphanie-Marie  
5 Deutsch<sup>1</sup>

6 <sup>1</sup> STLO, INRAE, Institut Agro, 35042, RENNES, FRANCE

7 <sup>2</sup> Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280  
8 Plouzané, France.

9

10 **\*Corresponding author:** Hélène Falentin

11 E-mail: [helene.falentin@inrae.fr](mailto:helene.falentin@inrae.fr)

12

## 13 **Abstract**

14 Pélardon is an artisanal French raw goat's milk cheese, produced using natural whey as a  
15 backslopping method. The aim of this study was to identify key microbial players involved in  
16 the acidification and aroma production of this Protected Designation of Origin cheese.  
17 Microbial diversity of samples, collected from the raw milk to 3-months cheese ripening, was  
18 determined by culture-dependent (MALDI-TOF analysis of 2877 isolates) and -independent  
19 (ITS2 and 16S metabarcoding) approaches and linked to changes in biochemical profiles  
20 (volatile compounds and acids). In parallel, potential dominant autochthonous microorganism  
21 reservoirs were also investigated by sampling the cheese-factory environment. Complex and  
22 increasing microbial diversity was observed by both approaches during ripening although major  
23 discrepancies were observed regarding *Lactococcus lactis* and *Lacticaseibacillus paracasei*  
24 fate. By correlating microbial shifts to biochemical changes, *Lactococcus lactis* was identified  
25 as the main acidifying bacterium, while *L. mesenteroides* and *Geotrichum candidum* were  
26 prevalent and associated with amino acids catabolism after the acidification step. The three  
27 species were dominant in the whey (backslop). In contrast, *L. paracasei*, *Enterococcus faecalis*,  
28 *Penicillium commune* and *Scopulariopsis brevicaulis*, which dominated during ripening, likely  
29 originated from the cheese-making environment. All these four species were positively  
30 correlated to major volatile compounds responsible for goaty and earthy Pélardon cheese  
31 aroma. Overall, this work highlighted the power of MALDI-TOF and molecular techniques  
32 combined with volatilome analyses to dynamically follow and identify microbial communities  
33 during cheese-making and successively identify the key-players involved in aroma production  
34 and contributing to the typicity of Pélardon cheese.

35 **Keywords: microbial dynamics; MALDI-TOF; GC-MS; metabarcoding; backslopping**

36

## 37 **1. Introduction**

38 Artisanal cheeses are highly appreciated worldwide because of their typical sensory  
39 attributes such as intense and complex flavors compared to industrial cheeses (Montel et al.  
40 2014; Van Hoorde, Vandamme and Huys 2008). They are often made from raw milk and rely  
41 on spontaneous fermentation, which implies that indigenous microorganisms (bacteria and  
42 fungi) naturally present in raw materials also contribute to the fermentation in addition to  
43 defined cultures sometimes added for acidification or ripening. In this context, the origin of  
44 these microorganisms has been investigated and milk is considered as a main microbial  
45 reservoir. However, traditional cheese-making practices such as manual salting, renneting and  
46 backslopping (i.e. the use of a small portion of milk or whey from a previous successful  
47 fermentation) have also been identified as microbial sources (Ercolini et al. 2008; Montel et al.  
48 2014). Furthermore, some studies highlighted the impact of the production environment on the  
49 microbial communities involved in the fermentation process of some artisanal cheeses, in  
50 particular the milking environment equipment such as vats and trays (Calasso et al., 2016;  
51 Carpino et al., 2016), the cheese-making and ripening environment (equipments and surfaces).  
52 All these potential reservoirs enrich the microbial diversity of artisanal cheeses, which therefore  
53 harbor a complex microbiota (Delcenserie et al., 2014).

54 Cultural methods are classically used to characterize microbial diversity in fermented foods.  
55 They rely on diverse and more or less selective media to enumerate and isolate microorganisms,  
56 which constitute both the advantages and limits of the approach. While enumeration and  
57 isolation are useful to understand population shifts and preserve microbial diversity for further  
58 use, it only reveals the viable and cultivable fraction of the microbial communities and is  
59 particularly fastidious and time-consuming. In addition, the depth of the analysis depends on  
60 the number and selectivity of the media used. In the last decade, culture-independent  
61 approaches, based on DNA analyses, have been widely used to describe microbial communities

62 in cheese as they have the advantage to provide an overview of the microorganisms found in  
63 an ecosystem, cultivable or not. Different PCR-based techniques have been applied such as  
64 PCR-DDGE (Dolci et al., 2008) or more recently high-throughput sequencing techniques such  
65 as metabarcoding (De Filippis et al., 2018; Kergourlay et al., 2015). Using this approach,  
66 studies were conducted to characterize the bacterial communities of artisanal Irish cheeses  
67 based on their geographic production area (Quigley et al., 2012) or to determine the microbiota  
68 associated with specific cheese types (Dugat-Bony et al., 2015) or cheese rinds (Wolfe et al.,  
69 2014). Such methods revealed complex microbiota that were previously overlooked by cultural  
70 methods. However, most studies focused on microbial diversity and compared the microbial  
71 communities encountered in different cheese varieties thus rendering a static view of the  
72 microbial diversity rather than investigating the changes in the microbial community during  
73 cheese-making and ripening periods.

74 Cheese-making and ripening are complex phenomena during which the cheese develops its  
75 aroma and other sensory characteristics. Many successive or simultaneous enzymatic reactions  
76 occur throughout the process, which include lactose fermentation process, proteolysis and  
77 amino acid catabolism, and lipolysis. These reactions were shown to directly or indirectly  
78 involve bacteria and/or fungi depending on cheese type (Bertuzzi et al., 2018; Delgado et al.,  
79 2011). As a consequence, investigating the microbial dynamics and their correlation with the  
80 cheese aroma profile might help to better apprehend the key-players and their respective role  
81 throughout the process.

82 Pélardon cheese is a Protected Designation of Origin (PDO) raw goat milk artisanal cheese.  
83 It is mostly produced in the mountainous Cevennes and Corbières areas and in Southern France  
84 and is characterized by a soft creamy texture with a thin wrinkled white and blue mold rind. It  
85 is solely produced using an artisanal process by small farm-style cheesemakers. Pélardon

86 production requirements forbid the use of commercial starters but authorize the use of whey  
87 from a previous batch as a backslopping inoculum.

88 The objective of this study was thus to understand the microbial dynamics associated with  
89 Pélardon cheese and how they could be linked with the cheese aroma characteristics. For this  
90 purpose, we first (i) described fungal and bacterial dynamics during Pélardon cheese-making  
91 and ripening by both culture-dependent and -independent approaches, (ii) investigated potential  
92 microbial sources in the process environment and (iii) quantified sugars, organic acids and  
93 aroma compounds throughout the entire process. Finally, we assessed how microbial diversity  
94 and dynamics influence the overall cheese aroma characteristics.

95

## 96 **2. Material and methods**

### 97 **2.1. Pélardon cheese sampling strategy**

#### 98 **2.1.1. Pélardon cheese-making and sample collection**

99 Samples were collected from a local cheese-maker from the Southern France (Gard) in the  
100 Cevennes area. Cheeses were prepared with the traditional process described by PDO  
101 requirements and in the same conditions as standard manufacturing. Briefly, raw goat milk from  
102 two successive milkings was supplemented with 2 % kid rennet (chymosin: 180 mg/L) and 2  
103 % whey from the previous production batch. No starter cultures were added. Acidification was  
104 carried out for 18 to 24 h until the acidity reached 58 ° Dornic at 20°C with controlled relative  
105 humidity (RH=80 %). Curd was manually moulded with a ladle into individual jars and drained  
106 naturally at room temperature (20°C) for 24 h before salting by manually sprinkling salt on the  
107 surface. After demoulding, fresh cheeses were drained for 48 h more prior to being placed in  
108 the drying room (T°=14°C; RH = 85 %) for 48 h. Finally, ripening was carried out in a cellar,  
109 at 12°C (RH = 90 %) for a minimum period of four days and up to three months.

110 Samples came from the same production batch (April 7, 2018) and sampling was done at seven  
111 steps during the cheese making process: raw materials (raw milk and whey used for  
112 backslopping inoculum), cheese samples after curdling (day 2), after salting and drying (day  
113 8), after two weeks (day 14), two months (day 62) and three months ripening (day 90).  
114 Altogether, the sampling steps provided 33 samples corresponding to the biological replicates  
115 collected throughout cheese-making and ripening. Whole cheeses were used for each analysis  
116 point. Samples were subjected to microbial enumeration, isolation and identification of bacteria  
117 and fungi, metabarcoding analyses and biochemical analyses to quantify sugars, acids and  
118 volatile compounds. General sampling strategy and experiments are summarized in Fig. 1 and  
119 primers used in this study in Supplementary Table S1.

#### 120 **2.1.2. Production environment sample collection**

121 Sixteen samples were taken at day 2 from different areas in the production and ripening  
122 facilities in order to track potential environmental microbial sources. Airborne microorganisms  
123 from the main production, drying and ripening rooms were collected using an air sampler  
124 (Sampl'air Lite, AES) operated at flow rate of 100 L/min for 10 min while ten surfaces were  
125 also analysed by streaking swabs moistened with Tryptone Salt (TS) diluent (sodium chloride  
126 8.5 g/L ; tryptone 1 g/L) over a 31.5 cm<sup>2</sup> area as well as three intrans (running water samples  
127 and salt) and stored at 4°C until analysis. All samples were analysed within 24 h and further  
128 subjected to microbial enumeration, bacterial and fungal isolations, identifications and  
129 metabarcoding analyses (except air samples).

#### 130 **2.2. Microbial counts during cheese-making process and in environmental samples**

131 For raw materials and cheese samples, microbial populations of interest were monitored at  
132 each sampling point. For cheese samples following the drying step (day 8), core and rind were  
133 analyzed separately. In each case, 10 g of cheese were mixed with 90 mL of 2 % trisodium

134 citrate buffer pre-heated to 42°C and then blended with a stomacher for 3 min at high speed.  
135 Serial dilutions were then prepared in TS diluent and plated on different media. The following  
136 microbial populations were enumerated: mesophilic aerobic bacteria on milk plate count agar  
137 (MPCA) (30°C, 72 h), mesophilic halotolerant bacterial populations on MPCA supplemented  
138 with 5 % NaCl (30°C, 72 h), enterococci on Kenner fecal agar supplemented with 1% (w/v)  
139 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (KF) (37°C, 48 h), presumptive lactococci on M17 (30°C,  
140 48 h), presumptive anaerobic lactobacilli on de Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 5.4 (30°C, 48  
141 h, anaerobiosis), presumptive aerobic lactobacilli on MRS pH 5.4 (30°C, 48 h, aerobiosis), total  
142 fungal populations on Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) agar (25°C, 5 days) and  
143 halotolerant fungi on YGC supplemented with 5 % NaCl (25°C, 5 days). All media targeting  
144 bacterial populations were supplemented with 0.1 % natamycin to inhibit fungal growth, except  
145 for KF medium.

146 For environment samples, enumerations were performed on three media: PCA (30°C, 72 h) for  
147 mesophilic aerobic microorganisms, MRS (37°C, 48h, anaerobiosis) for lactic acid bacteria and  
148 YGC (25°C, 5 days) for fungi after initial serial dilutions in TS diluent. Air samples were  
149 directly collected by impacting 1 m<sup>3</sup> of air on two media: PCA (30°C, 72 h) for mesophilic  
150 aerobic microorganisms and YGC (25°C, 5 days) for fungi. For those samples, analyses were  
151 performed on one replicate.

## 152 **2.3. Isolation and identification of microorganisms**

### 153 **2.3.1. Collection of microbial isolates**

154 For each biological replicate of raw materials (raw milk and whey used for backslopping)  
155 and cheese samples (core and rind analyzed separately from day 8 onwards), microorganisms  
156 were isolated from five media: bacteria from MPCA + natamycin, M17, MRS pH 5.4  
157 (anaerobiosis) and KF media and fungi from YGC medium. Twenty representative isolates (if



158 possible) were randomly selected from each medium from the Petri dish showing the highest  
159 morphological diversity. Regarding environmental samples, 15 isolates (if possible) were  
160 selected from PCA and YGC media.

### 161 2.3.2. Isolate dereplication using MALDI-TOF MS analysis and identification by 162 sequencing

163 A dereplication step using MALDI-TOF mass spectroscopy was performed for all bacterial  
164 and fungal isolates to identify clones prior to species level molecular identifications. Analyses  
165 were performed on a VITEK MS instrument (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) equipped  
166 with the Launchpad V2.8.4 acquisition software. Bacterial and fungal isolates were processed  
167 following the manufacturer's instructions. For filamentous fungi isolates, extraction and plate  
168 preparation were performed as described by Quéro et al. (2019) as well as spectra acquisition.  
169 Then, mass spectra of each isolate were first compared against the bioMérieux bacterial or  
170 fungal industrial-clinical VITEK MS databases (V3.2.0 for bacteria and new update of the  
171 VITEK MS database for fungi developed in the laboratory together with bioMérieux) for  
172 presumptive identifications (internal research tool). Then, the spectra of isolates identified as  
173 belonging to the same species were compared against one another to build clusters based on  
174 their similarities using SARAMIS software (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A threshold  
175 of 65 % similarity was applied for bacteria and of 50 % for fungi, as described by Lindgren et  
176 al. (2018). Representative isolates (isolates with the lowest similarity within a species cluster)  
177 were then chosen within each cluster and for each presumptive species. For each presumptive  
178 species, the choice of representative isolates was based on the heterogeneity between their  
179 spectra and when discrepancies were observed between MALDI-TOF identification and  
180 position within the cluster. An example is given for *Staphylococcus* genus (Supplementary figure  
181 S1).

182 Species-level molecular identifications for filamentous fungi were done after amplification and  
183 sequencing of either the internal transcribed spacer (ITS) region using ITS4/ITS5 primers or  
184 the partial  $\beta$ -tubulin gene using Bt2a/Bt2b primers (Glass and Donaldson, 1995) depending on  
185 the presumptive genus (i.e. *Penicillium*, *Aspergillus*) provided by MALDI-TOF MS analysis.  
186 Yeasts were identified by targeting the D1-D2 domain using NL1/NL4 primers (Kurtzman and  
187 Robnett, 1998). Finally, bacteria were identified by sequencing the complete 16S rRNA gene  
188 after amplification with fD1 and rP2 primers (Weisburg et al., 1991). Sequencing was  
189 performed using the same primers as those used for PCR amplifications. Sequences were  
190 assembled into contigs using Geneious software (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012)  
191 and compared with the GenBank databases using the “Basic Local Alignment Search Tool”  
192 (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and “SILVA Incremental Aligner” (SINA)  
193 (<https://www.arb-silva.de/aligner/>). The obtained genus or species level identifications were  
194 then confronted with MALDI-TOF identifications and dendrogram analyses. When both  
195 identifications were consistent inside a given cluster, the identification was expanded to all the  
196 isolates within the cluster. When the identification was inconsistent, isolates were excluded.

## 197 2.4. Metabarcoding analysis

### 198 2.4.1. Raw materials, cheese and environment sample preparation

199 Metabarcoding analysis was performed on raw milk (triplicates), whey (triplicates), curd (3  
200 curds), cheeses at day 8, 14, 62 and 90 and 13 environmental samples. The same raw material  
201 and cheese samples (core and rind separately), diluted in citrate buffer, were used as described  
202 previously for culture-dependent analyses (see 2.2). Aliquots of 1 mL were centrifuged (9000  
203 g, 15 min, 4°C) then supernatants were removed and the cell pellets stored at -20°C until DNA  
204 extraction. Regarding environmental samples, pellets were obtained from liquid samples by

205 centrifuging 1 mL (9000 g, 15 min, 4°C), whereas for surface samples, swabs were placed in 1  
206 mL of TS diluent prior to centrifugation (9000 g, 15 min, 4°C) to obtain cell pellets.

#### 207 **2.4.2. Total DNA extraction from cheese and environment samples**

208 Total DNA extractions were performed using the DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen,  
209 Germany) with a supplementary initial enzymatic lysis. First, cell pellets were thawed at room  
210 temperature then resuspended in 400 µL of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM at pH 8.0, EDTA 2  
211 mM, Triton X-100 1.2 %) supplemented with lysozyme (20 mg/mL) and mutanolysin (5 U/µL),  
212 then Rnase (25 µg/mL; Qiagen, Germany) and lyticase (0.5 U/µL; Sigma-Aldrich, Germany)  
213 were added. Samples were incubated at 37°C for 2.5 h followed by mechanical lysis with 300  
214 µL of 0.1mm zirconium beads per tube. Samples were homogenized for 2x 40 s with a 30 s  
215 break and this was repeated twice with a 1 min break on ice using a Precellys Evolution  
216 homogeneizer (Bertin technologies, Germany). A proteinase K (20 mg/mL) treatment was  
217 finally applied for 1 h at 56°C. The remaining extraction and purification steps were performed  
218 according to the manufacturer's instructions. Extracted DNA quality and quantity were verified  
219 using a Nanodrop spectrophotometer and samples were stored at -20°C until further analysis.

#### 220 **2.4.3. Quantitative PCR of *Lacticaseibacillus paracasei***

221 The number of *Lacticaseibacillus paracasei* (ex-*Lactobacillus paracasei*) in total DNA  
222 extracts from day 14, 62 and 90 were determined using quantitative PCR targeting the  
223 monocopy *tuf* gene, as described by Achilleos and Berthier (2013). To build the standard curve,  
224 DNA was extracted from pure cultures from 1 mL of an overnight culture of *L. paracasei*  
225 CIRM-BIA 1517. Serial dilutions of standard DNA were prepared and submitted to the same  
226 amplification conditions. The curve was then created by plotting qPCR Ct values against the  
227 gene copy numbers previously determined and the copy number of *L. paracasei* was calculated  
228 for each cheese sample by comparing the Ct of the sample with that of the standard curve.

229       **2.4.4. Amplification and sequencing parameters**

230       To study bacterial and fungal diversity in both cheese and environmental samples, PCR  
231 were performed as follows. For bacteria, V3-V4 region of the 16S rRNA gene was targeted  
232 using S-D-Bact-0341-b-S-17 and S-D-Bact-0785-a-A-21 primers (Klindworth et al., 2013). For  
233 fungi, ITS3f/ITS4\_Kyo1 primers (Toju et al., 2012) were used, targeting the ITS2 region. ITS2  
234 and V3-V4 amplifications and sequencing steps were performed in the same run at Genome  
235 Quebec sequencing platform (MacGill University, Canada) using Illumina Miseq PE300  
236 technology generating 2x300 bp reads and a total of 8.2 Gb of data for both amplicon types  
237 derived from the DNA extracts.

238       **2.4.5. Bioinformatic and phylogenetic analysis**

239       Sequences were pre-processed for quality and length using the following parameters:  
240 amplicon size between 370 and 490 bp for V3-V4 contigs and 90-500 bp for ITS2 contigs,  
241 mismatch rate was set at 0.1 for both data types. Sequencing data were then analyzed using the  
242 FROGS pipelines as developed by Escudié et al. (2018) under Galaxy (Afgan et al., 2018).  
243 Briefly, raw paired-end reads were assembled and sequences were clustered using the Swarm  
244 algorithm (Mahé et al., 2015) with an aggregation distance of 3 into Operational Taxonomic  
245 Units (OTUs). Sequences underwent some filtering steps: chimeras were detected using Uparse  
246 (Edgar, 2013) and ‘de novo parameter’ and removed, then sequences with a relative abundance  
247 below  $5 \times 10^{-5}$  or present in only one sample were excluded. Finally, the affiliation step was  
248 performed using SILVA database (v132 pintail 100) and UNITE (v7.1) for 16S and ITS2 data,  
249 respectively. When 16S sequences were multi-affiliated by FROGS because the targeted V3-  
250 V4 region was unable to discriminate species, the resulting possible species level assignments  
251 were implemented into the final OTU table.

252       **2.4.6. Biodiversity and statistical analyses**

253 Processing and statistical analyses of microbial communities were performed using  
254 Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) under R software. Data were normalized  
255 based on the sample that had the lowest number of sequences. Alpha-diversity indexes  
256 taxonomic composition and abundance distribution were then determined for each sample and  
257 compared.

## 258 **2.5. Biochemical analyses of cheese samples**

### 259 **2.5.1. pH measurement**

260 pH of the whey and day 2 cheeses was measured using a WTW 3100 pH meter (Weilheim,  
261 Germany) equipped with a puncture electrode (LoT406-M6-DXK GmbH, Mettler Toledo,  
262 Urdorf, Switzerland) and temperature probe (WTW 325/HC) by direct insertion. For cheese  
263 samples from day 8, 14, 62 and 90, pH was measured in core and rind separately. All  
264 measurements were performed on cheese triplicates.

### 265 **2.5.2. Quantification of sugars and organic acids by HPLC**

266 Two sugars and four organic acids were quantified in samples at six sampling points by  
267 high-performance liquid chromatography (HPLC). Compound extraction was performed as  
268 follows: all samples except whey were first blended in sterile distilled water (1:5) using a  
269 Stomacher (Merck Eurolab, Strasbourg, France) and incubated at 40°C for 1 h. The obtained  
270 dilutions were then centrifugated (3000 g, 30 min, 4°C) and filtered on a Whatmann 40  
271 membrane. The filtrates were then diluted (3:4) with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to reach a final concentration of  
272 0.05 M. Samples were then frozen overnight at -20°C and, after thawing, centrifuged (8000 g,  
273 20 min, 4°C). For each sample, supernatant was finally recovered and filtered using 0.45 µm  
274 PTFE membrane into a 2 mL-vial and stocked at -20°C until analysis.

275 HPLC analyses were performed using the conditions described by Leyva Salas et al. (2019).  
276 Compounds were identified and quantified by comparing retention times and peak area of

277 standard solutions injected at different concentrations (ranging from 0.05 to 1 mg/mL). All  
278 samples were analyzed in the same run. When necessary, supernatants were diluted with 0.05  
279 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and re-injected.

### 280 **2.5.3. Volatile compounds profile analyses by headspace-GC-MS**

281 Volatile profiles were obtained for six sampling points including whey and cheeses (from  
282 days 2, 8, 14, 62 and 90) using headspace (HS) gas chromatography-mass spectrometry (GC-  
283 MS). Compound extraction was performed using a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap  
284 automatic headspace sampler with trap enrichment on 2.5 g of mixed cheese placed in 22 mL  
285 vials. Analyses were performed according to methods previously described by Harlé et al.,  
286 (2020). Prior to compounds identification, data were processed using PerkinElmer Turbomass  
287 software, version 5.4.2.1617 and by converting the raw data to time- and mass-aligned  
288 chromatographic peaks areas using the open source XCMS package implemented with the R  
289 statistical language (Smith et al., 2006). Parameters were set as follows: width at half  
290 maximum=5, group bandwidth=3. Volatile compound identification was achieved by  
291 comparing the retention index and mass spectral values (1) from the NIST 2008 Mass Spectral  
292 Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, USA) and (2) when possible with those  
293 of authentic standards (Sigma Aldrich, France) analysed in the same system and (3) those  
294 reported in the literature. Finally, volatile profile changes between samples were investigated  
295 by comparing relative abundance of the identified compounds using ANOVA analyses with R  
296 software. Data were then normalized by centering and scaling the abundances. Hierarchical  
297 clustering and correlation of the data was then performed using Ward's minimum variance  
298 linkage and Euclidean distance method under R software.

### 299 **2.6. Statistical analyses of microbial and biochemical data**

300 Data from both culture-dependent and -independent analyses were implemented into a  
301 Principal Component analysis (PCA). Prior to the analysis, culture-dependent identified  
302 variables were reduced to one medium per species as many species were identified on more  
303 than one medium. The medium with the highest specificity and abundance of each species was  
304 kept and the abundance values multiplied by the corresponding microbial population counts.  
305 Pearson correlation coefficients between microbial species (culture-dependent approach) and  
306 biochemical compounds were then calculated and represented on a heatmap. Significance levels  
307 of correlations between microbial genera and biochemical compounds were then determined.  
308 All analyses were performed with R software using FactomineR, Hmisc, and ggplot2 packages  
309 (Lê et al., 2008; Wickham, 2016).

### 310 **3. Results**

311 **3.1. Culture-dependent analyses to determine the succession of microbial species during**  
312 **cheese-making and ripening**

#### 313 **3.1.1. Microbial population monitoring**

314 Eight populations of interest were monitored during cheese-making and ripening. Microbial  
315 counts obtained for raw materials and cheese core and rind samples are presented in Fig. 2.A,  
316 2.B and 2.C, respectively. Raw milk harbored low mesophilic bacterial populations ( $3.4 \log_{10}$   
317 CFU/mL) and fungal populations ( $2 \log_{10}$  CFU/mL). Higher bacterial counts by up to  $5 \log_{10}$   
318 CFU/mL were observed in the whey used for backslopping than in raw milk except for  
319 enterococci and presumptive aerobic lactobacilli. Indeed, presumptive aerobic lactobacilli were  
320 encountered at low levels in raw milk (around  $2 \log_{10}$  CFU/mL) and undetected in whey, while  
321 enterococci counts were higher in raw milk ( $2.3 \log_{10}$  CFU/mL) compared to whey ( $2 \log_{10}$   
322 CFU/mL). In day 2 curds, presumptive lactococci and anaerobic lactobacilli dominated (up to  
323  $9.2 \log_{10}$  CFU/g), while enterococci and presumptive aerobic lactobacilli remained undetected.

324 Fungal growth occurred during milk acidification and renneting step with populations reaching  
325  $4.6 \log_{10}$  CFU/g at day 2.  
326 From the post-drying stage (day 8) onwards, differences were observed between core and rind  
327 populations. Aerobic bacterial populations remained relatively stable in rinds while a decrease  
328 by  $1.2 \log_{10}$  was observed in cores and up to  $3 \log_{10}$  for halotolerant bacteria. A similar trend  
329 was observed for presumptive lactococci and anaerobic lactobacilli populations in cores which  
330 decreased by  $\sim 1.8 \log_{10}$  during drying (day 8) and, then remained stable ( $\sim 6 \log_{10}$  CFU/g) up  
331 to 90 days. Inversely, both presumptive aerobic lactobacilli and enterococci populations  
332 significantly increased during the cheese-making and ripening in both core and rinds to reach  
333  $6 \log_{10}$  CFU/g for lactobacilli and  $5 \log_{10}$  CFU/g for enterococci over the course of ripening.  
334 Fungal populations were consistently  $2 \log_{10}$  higher on rinds and also increased during the  
335 drying step then remained at high levels until the end of ripening ( $7.91 \log_{10}$  CFU/g). In contrast,  
336 they remained fairly constant in core samples, around  $5.5 \log_{10}$  CFU/g. An increase in  
337 halotolerant fungal populations was also observed in rinds between day 8 and day 14 while no  
338 such effect was observed in the core.

### 339 **3.1.2. Identification of viable microbial communities by MALDI-TOF and sequencing**

340 A total of 2001 bacterial and 563 fungal isolates were collected from the raw materials and  
341 cheese-making samples and 143 bacterial and 160 fungal isolates from environmental samples.  
342 Isolates were first subjected to a dereplication step using MALDI-TOF analysis to select  
343 representative isolates for further molecular identifications. Overall, good-quality spectra were  
344 acquired for 88 % bacterial isolates ( $n=1876$ ) and 99 % fungal ( $n= 727$ ) isolates. These spectra  
345 were thus used to build similarity dendrograms and grouped into clusters based on their  
346 similarity and presumptive identifications. In total, 146 representative bacterial and 38 fungal  
347 isolates were identified by sequencing. Based on MALDI-TOF spectra clustering, presumptive  
348 identifications and sequencing data, 1769 bacterial and 683 fungal isolates, respectively



349 representing 82 % and 93 % of the initial collection, were successfully identified and included  
350 in the final analysis. Noteworthy, the presumptive identifications done by MALDI-TOF  
351 analyses were confirmed by species-level molecular identification for 78 % and 86 % of the  
352 sequenced isolates for bacteria and fungi, respectively. Results based on all these data are  
353 presented in Fig. 3.

354 Regarding raw materials, only few lactic acid bacteria species (LAB) were identified in raw  
355 milk whereas high species diversity was observed for staphylococci among the isolated aerobic  
356 bacteria with three species only identified in these samples namely *Staphylococcus arlettae*,  
357 *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* . In contrast, in whey used for  
358 backslopping and in curd (day 2), *Lactococcus lactis* was the dominant bacterial species  
359 followed by *Leuconostoc mesenteroides*. Among aerobic bacteria and presumptive lactococci,  
360 *L. lactis* abundance was highest at day 2 and progressively decreased throughout ripening  
361 (aerobic bacteria) and was no longer detected neither in core nor rind at three months of  
362 ripening. A similar trend was observed for *L. mesenteroides* as its relative abundance was  
363 highest at day 8 in cores (aerobic bacteria and presumptive lactococci) and progressively  
364 decreased until day 90, and was no longer detectable in rinds after day 14. These observations  
365 were concomitant with the progressive growth of *Lacticaseibacillus paracasei/casei* from day  
366 8 to the end of ripening and it was the most abundant bacterial species in cores at 62 and 90  
367 days of ripening (aerobic bacteria and presumptive anaerobic lactobacilli). During ripening, the  
368 growth of several actinobacteria was observed such as *Glutamicibacter* spp., *Arthrobacter* spp.  
369 and *Brevibacterium* spp.; they represented up to half of the isolates among aerobic bacteria in  
370 rinds. Although their populations levels were lower than the most dominant bacterial groups,  
371 interesting dynamics were observed among enterococci and staphylococci. Regarding  
372 enterococci, their diversity increased in rinds during ripening, with only *Enterococcus durans*  
373 identified during the post-drying step (day 8) and three other species namely *E. faecalis*, *E.*

374 *faecium* and *E. hirae* identified at days 62 and 90. Staphylococci species diversity also increased  
375 during ripening and numerous species were identified such as *Staphylococcus xylosus*,  
376 *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* and *Staphylococcus fleurettii*, which were  
377 not previously isolated in raw material or curds (day 2).

378 Regarding fungal communities, the isolates collected from raw milk could not be identified  
379 while whey was dominated by *Geotrichum candidum*. This yeast-like fungus remained  
380 dominant until day 14. After curdling (day 2), despite different population levels, no striking  
381 differences between core and rind composition were observed in cheese samples. Fungal  
382 diversity then increased from day 14 in the rinds and from day 62 in cores. In particular,  
383 *Penicillium commune* and *Scopulariopsis brevicaulis* relative abundances increased and *S.*  
384 *brevicaulis* even became dominant in both core and rind at days 62 and 90. Other yeast species  
385 such as *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* were also encountered in the same  
386 samples but at lower abundances.

387 **3.2. Culture-independent analyses to determine the succession of microbial species during**  
388 **cheese-making and ripening**

389 **3.2.1. Microbial dynamics determined using 16S rRNA gene and ITS2 metabarcoding**  
390 **analyses**

391 V3-V4 16S rRNA gene sequencing analysis resulted after quality filtering in a total of 3  
392 537 077 contigs with an average length of 467 nucleotides. Sequences were subsequently  
393 clustered into 43 OTUs after chimera and singleton removal. Concerning metabarcoding  
394 analysis of the ITS2 region, a total of 6 945 569 quality-filtered contigs (average length of 245  
395 nucleotides) were obtained. After chimera and singleton removal, sequences were clustered into  
396 15 OTUs. After normalization, 67 540 and 54 622 sequences per sample were kept for V3-V4  
397 and ITS2 data analysis, respectively. Rarefaction curves are available in Supplementary Fig.  
398 S2.

399 For both bacterial and fungal communities, alpha-diversity indexes were calculated from OTU  
400 data to investigate the impact of three factors: cheese-making and ripening stage, sample type  
401 and the two factors associated (see Supplementary Fig. S3). For bacterial communities, the  
402 richness and Chao1 indexes (defined as OTU number in samples and estimated richness  
403 respectively) showed respectively significant differences between sample type and stage  
404 ( $p < 0.001$ ) as well as Shannon evenness index ( $p < 0.01$ ). Bacterial diversity significantly  
405 increased during cheese-making and ripening, especially in rinds. Regarding fungal  
406 communities, diversity increased throughout ripening. Significant differences regarding  
407 richness indexes were however observed between cores and rinds and overall values were lower  
408 ( $p < 0.001$ ) in cores. For both communities, low Shannon and Simpson indexes ( $p > 0.05$ ) were  
409 observed compared to Chao1 index. As Shannon and Simpson indexes consider relative  
410 abundances, results suggested that bacterial and fungal populations were dominated by a few  
411 abundant taxa.

412 The succession of bacterial communities during Pélardon cheese-making and ripening are  
413 illustrated in Fig. 4. All samples considered, a total of three phyla (Firmicutes 94 %,  
414 Actinobacteria 5.6 % and Proteobacteria 0.4 % of total reads), five orders, 10 families, 12  
415 genera and 21 species were identified. Overall, regardless of sample type or stage, the most  
416 abundant genera were *Lactococcus* (88.9 % of all sequences) followed *Glutamicibacter* (3.8 %)  
417 *Leuconostoc* and *Brevibacterium* (1% each). Other genera were encountered at an abundance  
418 below 1 %. Raw milk samples were characterized by a low number of reads (below 200 reads  
419 per samples) and thus not formally included in this analysis. In the whey used for backslopping,  
420 the most abundant genus was *Lactococcus*, with two identified species (*L. lactis*, *L.*  
421 *raffinolactis*) and one OTU that could not be identified at the species-level. These three OTUs  
422 represented up to 99.5 % of sequences. At day 2, after acidification, curd samples were  
423 dominated by *L. lactis* and it remained dominant during the following stages in both core and

424 rind samples although its abundance progressively decreased in rinds concomitantly with the  
425 appearance of other genera and species, especially belonging to staphylococci (i.e. *S. succinus*  
426 and *S. saprophyticus*) and actinobacteria. For these groups, high variations in relative  
427 abundances were observed among replicates in the late stages of ripening (days 62 and 90).  
428 Indeed, *Brevibacterium* spp. abundances ranged from 2.8 to 7.6 %, *Glutamicibacter* spp. from  
429 4.4 to 47 % and those of *Brachybacterium* spp. from 0.8 to 11 %.

430 Regarding fungal communities, 15 species belonging to 11 genera, nine families and two phyla  
431 were identified in raw materials and cheeses (see Supplementary Fig. S4). *G. candidum* was  
432 the most abundant species with a relative abundance of 99.5 % in all cases, regardless of the  
433 sample type or stage. However, fungal diversity increased at the beginning of the ripening  
434 period (day 14) as shown by the presence of *Penicillium* species, and in late ripening stages  
435 (days 62 and 90) with the presence of *S. brevicaulis* in rinds. However, no differences in the  
436 relative abundances between core and rind were observed for these species at the end of  
437 ripening. Several other fungal species were punctually identified e.g. *Cladosporium* was only  
438 found in whey and raw milk.

### 439 **3.2.2. *Lacticaseibacillus paracasei* quantification during ripening**

440 Because of some discrepancies between culture-dependent and independent analyses  
441 regarding the relative abundance of *L. paracasei* at days 14, 62 and 90, its presence was further  
442 investigated by qPCR, using TufLcpara specific primers. In these conditions, qPCR efficiency  
443 was 94 %. Based on the standard curve, *tuf* gene copy number of *L. paracasei* per gram of  
444 cheese was determined and used as a proxy of *L. paracasei* cells per gram of cheese. We  
445 observed that *tuf* gene copy numbers per gram of cheese were 33-fold (cheese core) and 3-fold  
446 (cheese rind) higher at day 62 than at day 14, indicating that *L. paracasei* population increased  
447 over ripening time (Table 1). It then remained stable until day 90. Noteworthy, at day 62 and  
448 90, the *L. paracasei* population was 10-fold higher in the cheese core than in the rind.

449       **3.3. Study of potential environmental microbial sources using culture-dependent and -**  
450               independent approaches

451       To investigate the potential sources of microorganisms in shaping Pélardon cheese  
452       microbial communities, sampling was done inside the farmhouse. Detailed sample information  
453       and viable microbial counts are shown in Table 2. All samples were analyzed using culture-  
454       dependent (Fig. 5) and -independent approaches (Supplementary Fig. S5), except air samples  
455       which were only assessed by the culture-dependent approach. Low microbial counts for  
456       mesophilic aerobic bacteria, fungi and LAB were encountered especially for surface samples  
457       ( $< 4 \log_{10}$  CFU/cm<sup>2</sup> or m<sup>3</sup>) and these results were correlated with low amplification by culture-  
458       independent analysis. Concerning the main bacterial species identified in cheese, *L.*  
459       *mesenteroides* was identified on cheese trays used in the drying room (PS5) by culture-  
460       dependent analyses and surfaces from the cheese-making room (PS2, PS4 and PS9) by the  
461       culture-independent approaches. *L. lactis* was only isolated from a tray in the drying room  
462       (PS5), while it was also identified at low relative abundance (8 %) on a clean tray used for  
463       curdling (PS9) by the culture-independent approach. *Staphylococcus* species were among the  
464       most frequently isolated species on trays used for ripening (PS6) and in the cheese-making  
465       room (PS7) by both approaches (see Supplementary Fig. S6 for a detailed comparison). The  
466       same species were also found in the air of the drying and ripening rooms. Bacterial genera  
467       identified in Pélardon cheese rinds such as *Glutamicibacter* and *Brevibacterium* were also  
468       isolated from surface samples collected from the cheese-making, drying and ripening rooms at  
469       high abundances. Noteworthy, enterococci and lactobacilli were not isolated nor detected in  
470       environmental samples. For fungi, air sample analysis showed that *G. candidum* was present at  
471       high abundances in the air of the cheese-making, drying and ripening rooms. *P. commune* and  
472       *S. brevicaulis* were also present but at lower abundances. These three species were also  
473       identified on the surface of the trays in the different rooms using culture-independent analysis.

#### 474 **3.4. pH, sugar and non-volatile organic acid changes**

475 pH measurements were similar in the whey used for backslopping and in day 2 curd (~4.3  
476 units) and continuously increased ( $p < 0.001$ ) throughout ripening until day 62 to reach 6.07 and  
477 6.73 pH units in cores and in rinds, respectively. pH values were systematically and  
478 significantly higher in rinds as compared to cores except on day 90 (Table 3).

479 The main sugars (lactose, galactose) and organic acids (acetic, citric, lactic acids) were  
480 quantified in whey used for backslopping and during the different stages of Pélardon cheese-  
481 making and ripening. Lactose, galactose as well as acetic and lactic acids showed a similar trend  
482 throughout the process. Their highest concentrations were in curd after acidification (day 2)  
483 and progressively decreased: lactose and acetate were detected until day 62 whereas galactose  
484 and lactic acid were no longer detected as early as day 14 (early ripening). In contrast, citric  
485 and 3-phenyllactic acid concentrations were below the detection level during acidification (day  
486 2) and increased during drying (for 3-phenyllactic acid) and ripening (both acids).

#### 487 **3.5. Changes in volatile profiles during cheese-making and ripening**

488 Using headspace GC-MS, 54 volatile compounds belonging to six main families were  
489 detected and identified in Pélardon cheese samples during cheese-making and ripening.  
490 Compound names, identification criteria and their respective abundances are listed in the  
491 Supplementary Table S2.

492 To better understand these changes and the main compounds involved, a one-way ANOVA  
493 analysis followed by Tukey's highest significant difference test were performed on abundance  
494 data. Out of the 54 volatile compounds, 47 were detected at a significantly different abundance  
495 at, at least, one stage ( $p < 0.05$ ). To confirm these trends, a correlation analysis was then  
496 performed on the volatile abundances and the results are presented using a heatmap with sample  
497 clustering. Overall, the identified compounds could be linked to specific cheese-making or  
498 ripening stages based on their high abundances and four main groups of compounds could be

499 differentiated (Fig. 6). A first group (group I) gathered six compounds present in high  
500 abundances in curd (day 2) and whey samples, i.e. acetic acid, 3-hydroxybutan-2-one, 2-  
501 methylthiolan-3-one, pentane-2,3-dione, butane-2,3-dione and hexanal. The post-drying (day  
502 8) and early ripening (day 14) stages were associated with compounds of group II  
503 corresponding to branched-chain and aromatic compounds (i.e. 3-methylbutanoic acid, 2-  
504 phenylacetaldehyde). Finally, in the late ripening stages (day 62 and 90), 33 compounds were  
505 quantified at their highest abundances, mainly belonging to methylketones, secondary alcohols  
506 and free fatty acids and could be separated in two groups (III and IV). Group III gathered  
507 compounds identified in particularly high abundances at day 62 and day 90 among which were  
508 seven free fatty acids (butanoic, hexanoic, pentanoic, heptanoic octanoic, nonanoic and  
509 decanoic acids), five ketones (non-8-en-2-one, octan-3-one, pentan-2-one, heptan-2-one,  
510 hexan-2-one, and nonan-2-one) and one alcohol (heptan-2-ol). Group IV mostly gathered  
511 compounds with high abundances in day 90 cheeses and noteworthy, it included the four esters  
512 as well as ketones and secondary alcohols.

### 513 3.6. Correlation between microbial communities and changes in biochemical profiles 514 during cheese-making and ripening

515 A principal component analysis was conducted with all microbial and biochemical data to  
516 correlate temporal changes in microbial communities with biochemical profiles  
517 (Supplementary Fig. S7). Dimensions 1 and 3, which explained 34.2 % and 11.6 % of the  
518 variance respectively, provided the best separation of samples according to the cheese-making  
519 and ripening times. Day 2 and whey samples were grouped together and associated with the  
520 *Lactococcus* genus, identified by both culture-dependent and -independent approaches (three  
521 OTUs), and two sugars (lactose and galactose) as well as six other compounds including acetic  
522 acid, lactic acid and 3-hydroxybutanone. Rind samples from day 8 and day 14 were linked to  
523 2-phenylacetaldehyde. During ripening (day 62), rinds were associated with a high pH and six

524 volatile compounds as well as three species, *S. xyloso*, *L. casei/paracasei*, and *P. commune*,  
525 identified by culture-dependent approach. At the end of ripening (day 90), multiple species  
526 identified by both culture-dependent analyses (*E. faecalis*, *S. equorum*, *S. brevicaulis*,  
527 *Brevibacterium* spp.) and metabarcoding (*L. lactis*\_62, *Lactococcus* sp.\_78, *Brachybacterium*  
528 sp\_56 and *Brachybacterium* sp.\_8) were correlated to 13 compounds mainly free fatty acids,  
529 methyl ketones and esters.

530 To get a better insight into the potential links between aroma compounds and microorganisms,  
531 a Pearson correlation analysis was performed based on culture-dependent data, organic acid  
532 and volatile data. Pair-wise correlation coefficients and corresponding p-value were thus  
533 calculated (Fig. 7). Focusing on the strongest correlations ( $|r| > 0.8$  and  $p < 0.001$ ), four  
534 microbial groups stood out. *L. lactis* and *G. candidum* were strongly and positively correlated  
535 with lactose, acetic acid, lactic acid, and 3-hydroxybutan-2-one. *L. mesenteroides*, whose  
536 correlation profile was relatively similar to that of *L. lactis*, was strongly and positively  
537 correlated to 3-methylpropanoic, 3-methylbutanoic acids and 2-phenylacetaldehyde; highest  
538 abundances of these compounds being at day 8. *S. xyloso*, *S. equorum* and *E. hira*e were also  
539 positively correlated with 11 compounds, mainly ketones, carboxylic acids and alcohols. *P.*  
540 *commune*, *L. casei/paracasei*, *E. faecalis* and *S. brevicaulis* were positively correlated with the  
541 same 11 compounds but also showed high correlations to 11 others compounds, namely octan-  
542 3-one, oct-1-en-3-ol, 2-ethylhexanoic acid, octanoic acid, 2-hydroxypentan-3-one, 3-  
543 methylheptan-2-one, nonanal, decan-2-one, nonanoic acid, methylsulfonylmethane and ethyl  
544 butanoate. Among these species, *S. brevicaulis* showed a slightly different correlation profile  
545 as strong and positive correlations were also observed for ethyl hexanoate, ethyl acetate and 1-  
546 hydroxypropan-2-one. High correlations for those compounds were otherwise observed only  
547 with *E. faecium*. Finally, strong positive correlations were also punctually observed.

#### 548 4. Discussion



549 In this study, microbial community dynamics during PDO Pélardon cheese-making and  
550 ripening were unraveled for the first time by culture-dependent and -independent approaches  
551 and linked to the cheese aroma profile.

552 The experimental set-up aimed at combining extensive culture-dependent and culture-  
553 independent approaches to precisely and efficiently study the microbial communities associated  
554 to Pélardon cheese, raw materials and the cheese-making environment. Cultural methods and  
555 isolate identifications rely on tedious work and time-consuming techniques that often limit the  
556 analysis scale in terms of sample number and collected isolates. In the present study, we used  
557 MALDI-TOF MS as a high-throughput technique combined with molecular sequencing to  
558 describe cheese microbial communities at a species-level, based on a recently described  
559 microbial culturomics strategy (Lagier et al., 2015; Sarhan et al., 2019). Although MALDI-  
560 TOF identifications have been recently used in food-related microbial diversity studies (Nacef  
561 et al., 2017; Peruzy et al., 2019), this is the first time, to our best knowledge, that this method  
562 is used to study both bacterial and fungal dynamics in a fermented product. It allowed us to  
563 analyze a large collection of autochthonous isolates (n = 2877) from different media targeting  
564 dominant and sub-dominant populations. Taking into account both culture-dependent and  
565 independent data, 29 genera were identified during Pélardon cheese-making, 12 of which were  
566 identified by both approaches (Supplementary Fig. S8). Among those, *Lactococcus* and  
567 *Leuconostoc* for bacteria and *Geotrichum* for fungi were identified by both approaches as the  
568 most dominant during curdling while during ripening and in rinds, *Brevibacterium*,  
569 *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Penicillium* and *Scopulariopsis* were found but in different  
570 proportion according to the method. Interestingly, enterococci were only identified by the  
571 culture-dependent approach with increasing species diversity during ripening; a result that was  
572 completely overlooked by the culture-independent approach. Culture-independent approach

573 however, further identified five genera, mainly highlighting the subdominant halophilic  
574 bacteria (i.e. *Brachybacterium*, *Salinococcus*, *Marinhabitans*) on the Pélardon cheese surface.

575 Our dynamic study of Pélardon microbial diversity revealed inconsistencies regarding  
576 microbial dominances during ripening between approaches. Indeed, culture-dependent results  
577 revealed that *L. lactis*, after dominating during acidification, decreased during ripening. In  
578 contrast, metabarcoding results suggested that *L. lactis* remained dominant in core during the  
579 entire ripening. Moreover, most surprisingly, no *Lacticaseibacillus* OTUs were detected in any  
580 samples by the culture-independent approach, while it was shown to increase and dominate  
581 during ripening by the culture-dependent approach. To eliminate any potential discrepancies  
582 due to technical errors qPCR tests targeting *L. paracasei* were performed on ripening samples  
583 to confirm culture-dependent data. *L. paracasei* was detected at high levels during ripening in  
584 both cores and rinds. These results have thus led us to assume that the dominance of *L. lactis*  
585 DNA from both live and dead cells following curdling masked any lactobacilli DNA in the  
586 studied samples using the culture-independent approach. Indeed, autolysis of starter bacteria,  
587 such as *L. lactis* in our study, during cheese ripening is a well-known phenomenon although  
588 the involved mechanisms are not well established (Lazzi et al., 2016; Treimo et al., 2006). It is  
589 also possible that *L. lactis* cells were in a Viable But Not Cultivable state (VBNC). Bacteria in  
590 VBNC state has been discussed in the general context of cheese production (Edalatian et al.,  
591 2012) and to a lesser extent for cheese starter cultures (Falentin et al. 2012; Ruggirello, Dolci  
592 and Cocolin 2014), however their active metabolic contribution have yet to be determined.  
593 Similar hypotheses could be done to explain the differences in the proportions of *G. candidum*,  
594 *Penicillium* spp. and *S. brevicaulis* at each ripening stage analyzed by the two approaches.  
595 Discrepancies between culture-dependent and culture-independent results have been repeatedly  
596 reported regardless of the culture-independent method used (Coton et al., 2017; Delbès et al.,  
597 2007) and our study led to a different “picture” of the microbial communities present during

598 ripening. Based on the literature findings reported above and on our observations, the 3-step  
599 culture-dependent approach we implemented in this study provided the most thorough overview  
600 of the microbial community dynamics during Pélardon cheese-making although metabarcoding  
601 highlighted the presence of some specific micro-organisms. Moreover, similar microbial  
602 analyses were performed on another batch six months before and the same dominant species  
603 were found and discrepancies between the two approaches also observed (data not shown). We  
604 thus decided to mainly consider the culture-dependent results for correlation analysis.

605         As previously mentioned, Pélardon cheese is produced without any starter. Thus, the  
606 plausible origin of the microorganisms identified during cheese-making and ripening was  
607 investigated in the raw materials and cheese-making environment. Raw milk microbiota was  
608 dominated by coagulase negative Staphylococci as previously reported by Tormo et al. (2011)  
609 although most of the identified species did not persisted after acidification. However, results  
610 highlighted the contribution of whey as a major source of starter LAB, mainly *L. lactis* and in  
611 a lesser extent *L. mesenteroides*. This finding is consistent with other cheese technologies using  
612 backslopping such as Rocamadour or Parmigiano Regiano, in which the main acidifying  
613 bacteria are also brought by the whey (Coloretti et al., 2016; Demarigny et al., 2006). However,  
614 in the case of Pélardon cheese, the whey also acted as a source of fungal populations involved  
615 in ripening as it contained high populations of *G. candidum*. Besides, *G. candidum* and the other  
616 most dominant fungal species were also found all over the cheese-factory. In addition, some  
617 species identified on Pélardon cheeses, especially *Glutamicibacter* and *Staphylococcus* species,  
618 were also found on several surfaces but not in raw materials. Our results thus strongly suggested  
619 that the working environment likely contributes to the enrichment of the surface microbiota of  
620 these cheeses during ripening. Overall, it would be of interest in the future to investigate to  
621 what extent the microbiota revealed here is shared between other Pélardon producers and if the  
622 specific microorganisms we identified as part of the core microbiota can be considered as a

623 “house microbiota” as previously described by Bokulich and Mills (2013) for two artisanal  
624 washed-rinds cheeses.

625 Cheese aroma compound composition is particularly relevant for artisanal cheeses as it  
626 strongly contributes to their typicity and influences the consumer’s preference. In this study, a  
627 correlation between the identified bacteria and fungi, the main fermentation products and aroma  
628 compounds was established. Our results revealed dynamics importance of both communities  
629 early-on in the cheese-making process. Indeed, whey used as an inoculum was dominated by  
630 *L. lactis*, the main acidifying microorganism, along with *L. mesenteroides* and none of the other  
631 species identified in raw milk persisted in curd. These two species were well correlated to the  
632 major lactose fermentation products such as lactic acid and acetic acid but also to hexanal and  
633 3-hydroxybutan-2-one (acetoin) compounds associated with buttery and fresh aromas. Lactic  
634 and acetic acids rapidly decreased during drying suggesting their utilization, which is consistent  
635 with the significant pH increase. *L. mesenteroides* was also correlated to high abundances of  
636 leucine and valine degradation products such as 3-methylbutanoic and 2-methylpropanoic acid  
637 (Delgado et al., 2011), which abundances were highest at day 8. This would suggest that *L.*  
638 *mesenteroides* is also actively involved during the post-acidification stage which is often related  
639 to proteolysis activities (McSweeney and Sousa, 2000). *G. candidum* was highly associated  
640 with the drying and early ripening stages and is most likely responsible for the observed  
641 deacidification phenomenon. Moreover, lactic acid catabolism by *G. candidum* is well-  
642 established in cheeses such as Camembert and Brie (Boutrou and Guéguen, 2005). Its  
643 deamination activity has also been reported and linked to the production of 2-  
644 phenylacetaldehyde and 2-phenylethnaol from phenylalanine, compounds that we found to  
645 considerably increase in Pélardon cheese during drying (day 8) and early ripening (day 14)  
646 stages. Interestingly, both compounds, found at high abundances at the same stages, are known  
647 to bring floral and sweet aromas to the product (Majcher et al., 2014). Prolonged ripening for

648 up to three months seems to be linked to the dominance of two non-starter lactic acid bacteria,  
649 *L. paracasei* and *E. faecalis*, and two filamentous fungi, *P. commune* and *S. brevicaulis*, and  
650 associated with most of the identified volatile compounds. The strongest positive correlations  
651 were observed with some ketones, which originate from free fatty acid catabolism by different  
652 microorganisms in particular fungi and have low odor thresholds with strong “earthy” and  
653 “cheesy” notes. Interestingly, *S. brevicaulis* was previously identified in cow milk ripened  
654 cheeses (Schornsteiner et al., 2014) and natural ripened cheeses as a core microorganism (Wolfe  
655 et al., 2014). This species has also been associated with high proteolytic activity (Bothast et al.,  
656 1975) and considered as a cheese spoiler when it predominates. Pélardon late ripening stages  
657 were also characterized by high abundances of free fatty acids, which can be released by either  
658 microbial or milk lipases (Collins et al., 2003). Their concentrations have similarly been shown  
659 to increase with aging in other goat cheeses (Delgado et al., 2011) and hexanoic and decanoic  
660 acids, also designated as caprylic and caproic acids, respectively, have previously been reported  
661 as aroma markers of goat cheese. In contrast, day 14 cheeses, which corresponds to the minimal  
662 ripening time required for the PDO Pélardon denomination, were not correlated with high  
663 abundances of specific compounds. Thus, the typical aroma of Pélardon cheese probably results  
664 from a balance between compounds, associated with fresh buttery and floral aromas, and as the  
665 ripening progresses by compounds that bring increased strong, earthy and goaty aromas,  
666 potentially attenuated by esters associated with fruity aromas.

667 Overall, these results highlight the dynamics of Pélardon cheese microbial community.  
668 Through correlation analysis we identified the key-players of Pélardon cheese microbial  
669 communities. However, more in-depth studies are necessary to first validate and secondly  
670 further explore their functional role. By implementing a culture-dependent approach, we were  
671 able to constitute a large collection of autochthonous isolates, hence working on individual  
672 species or reconstructed consortia could help to better characterize their metabolic potential,

673 decipher interactions between the key-players and further demonstrate their contribution to  
674 Pélardon cheese aroma typicality.

675

## 676 **Funding**

677 This work, which was conducted in the framework of the ProMedFoods project ‘Promotion of  
678 local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of microbial  
679 resources’, was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the following funding agencies:  
680 ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece), MIPAF (Italy), INIA (Spain)  
681 and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received funding from the European  
682 Union’s Seventh Framework Programme for research, technological development and  
683 demonstration under grant agreement [618127].

## 684 **Declaration of competing interest**

685 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal  
686 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## 687 **Acknowledgements**

688 We would like to thank our cheesemaker partner for accepting to be part of our project, for  
689 welcoming us at their cheese-making facilities and providing the samples. We would like to  
690 thank Geraldine Pascal and Olivier Rué for their technical support and advice for the FROGS  
691 bioinformatic pipelines. Finally, we are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility  
692 (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi:  
693 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

## 694 **Data and microbial resources availability**

695 Sequence data generated in this study are publicly available on the European Bioinformatics  
696 Institute database ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) under accession numbers PRJEB37923 (bacterial 16S  
697 rRNA sequencing run data) and PRJEB37922 (fungal ITS2 sequencing run  
698 data). Representative isolates will be deposited in culture collections: UBOCC for fungi and  
699 CIRM-BIA for bacteria and accessible on demand.

## 700 References

- 701 Achilleos, C., Berthier, F., 2013. Quantitative PCR for the specific quantification of  
702 *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis*  
703 in cheese samples. *Food microbiology* 36, 286–95.  
704 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.024>
- 705 Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J.,  
706 Clements, D., Coraor, N., Grüning, B.A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann,  
707 S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A.,  
708 Blankenberg, D., 2018. The Galaxy platform for accessible, reproducible and  
709 collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544.  
710 <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- 711 Bertuzzi, A.S., Walsh, A.M., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., Crispie, F., McSweeney, P.L.H.,  
712 Kilcawley, K.N., Rea, M.C., 2018. Omics-Based Insights into Flavor Development  
713 and Microbial Succession within Surface-Ripened Cheese. *mSystems* 3.  
714 <https://doi.org/10.1128/mSystems.00211-17>
- 715 Bokulich, N.A., Mills, D., 2013. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial  
716 Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and environmental*  
717 *microbiology* 79. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-13>
- 718 Bothast, R.J., Lancaster, E.B., Hesseltine, C.W., 1975. *Scopulariopsis brevicaulis*: Effect of  
719 pH and substrate on growth. *European J. Appl Microbiol.* 1, 55–66.  
720 <https://doi.org/10.1007/BF01880620>
- 721 Boutrou, R., Guéguen, M., 2005. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology.  
722 *Int. J. Food Microbiol.* 102, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028>
- 723 Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis,  
724 M., Gobbetti, M., 2016. Relationships among house, rind and core microbiotas during  
725 manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology*  
726 54, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.008>
- 727 Carpino, S., Randazzo, C., Pino, A., Russo, N., Rapisarda, T., Belvedere, G., Caggia, C.,  
728 2016. Influence of PDO Ragusano cheese biofilm microbiota on flavour compounds  
729 formation. *Food Microbiology* 61. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.006>
- 730 Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid  
731 catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal* 13,  
732 841–866. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00109-2](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00109-2)
- 733 Coloretto, F., Chiavari, C., Nocetti, M., Reverberi, P., Bortolazzo, E., Musi, V., Grazia, L.,  
734 2016. Whey starter addition during maturation of evening milk: effects on some  
735 characteristics of cheese milk and Parmigiano–Reggiano cheese. *Dairy Sci. &*  
736 *Technol.* 96, 185–197. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0257-y>
- 737 Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L.,

738 Fall, A., Daube, G., Coton, E., 2017. Unraveling microbial ecology of industrial-scale  
739 Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS*  
740 *Microbiol Ecol* 93. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

741 De Filippis, F., Parente, E., Ercolini, D., 2018. Recent Past, Present, and Future of the Food  
742 Microbiome. *Annu Rev Food Sci Technol* 9, 589–608.  
743 <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030117-012312>

744 Delbès, C., Ali-Mandjee, L., Montel, M.-C., 2007. Monitoring bacterial communities in raw  
745 milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based  
746 analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1882–1891.  
747 <https://doi.org/10.1128/AEM.01716-06>

748 Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey,  
749 D., Korsak, N., Daube, G., 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected  
750 designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of*  
751 *Dairy Science* 97, 6046–6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225>

752 Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R., 2011. Formation of the aroma of a  
753 raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chem* 129,  
754 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.096>

755 Demarigny, Y., Sabatier, C., Laurent, N., Prestoz, S., Rigobello, V., Blachier, M.-J., 2006.  
756 Microbial diversity in natural whey starters used to make traditional Rocamadour goat  
757 cheese and possible relationships with its bitterness. *Italian Journal of Food Science*  
758 18, 261–276.

759 Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2008. Microbiological  
760 characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic  
761 acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 392–399.  
762 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.006>

763 Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F.,  
764 Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer,  
765 F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P.,  
766 2015. Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-  
767 Omics Analyses. *PLOS ONE* 10, e0124360.  
768 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>

769 Edalatian, M.R., Najafi, M.B.H., Mortazavi, S.A., Alegría, Á., Nassiri, M.R., Bassami, M.R.,  
770 Mayo, B., 2012. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and  
771 Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches.  
772 *Dairy Science & Technol.* 92, 75–90. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0045-2>

773 Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads.  
774 *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

775 Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., Coppola, S., 2008. Microbial diversity in  
776 Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese.  
777 *International Journal of Food Microbiology* 124, 164–170.  
778 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.007>

779 Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S.,  
780 Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., 2018. FROGS: Find, Rapidly, OTUs  
781 with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.  
782 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

783 Falentin, H., Henaff, N., Le Bivic, P., Deutsch, S.-M., Parayre, S., Richoux, R., Sohier, D.,  
784 Thierry, A., Lortal, S., Postollec, F., 2012. Reverse transcription quantitative PCR  
785 revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the  
786 end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol.* 29, 132–140.  
787 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.09.009>



788 Glass, N.L., Donaldson, G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the  
789 PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ*  
790 *Microbiol* 61, 1323–1330.

791 Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B.,  
792 Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A., 2020. Diversity of the metabolic profiles of a  
793 broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiology* 89,  
794 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>

795 Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S.,  
796 Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P.,  
797 Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software  
798 platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–  
799 1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

800 Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., Champomier Vergès, M.-C., 2015. Metagenomic  
801 insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J. Food Microbiol.*  
802 213, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010>

803 Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O.,  
804 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and  
805 next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1.  
806 <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

807 Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts  
808 from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences.  
809 *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>

810 Lagier, J.C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P.E., La Scola, B., Raoult, D., 2015. The  
811 rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human  
812 gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 237–264.  
813 <https://doi.org/10.1128/cmr.00014-14>

814 Lazzi, C., Povolò, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M., 2016. Can the  
815 development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile  
816 fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology* 233,  
817 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.009>

818 Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis.  
819 *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>

820 Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.-B., Valence, F., Coton, E., Thierry, A., 2019.  
821 Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal  
822 bioprotective cultures in dairy products. *Food Chemistry* 301, 125260.  
823 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>

824 Lindgren, Å., Karami, N., Karlsson, R., Åhrén, C., Welker, M., Moore, E.R.B., Stadler, L.S.,  
825 2018. Development of a rapid MALDI-TOF MS based epidemiological screening  
826 method using MRSA as a model organism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 57–  
827 68. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3101-x>

828 Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., Dunthorn, M., 2015. Swarm v2: highly-  
829 scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3, e1420.  
830 <https://doi.org/10.7717/peerj.1420>

831 Majcher, M.A., Myszka, K., Kubiak, J., Jeleń, H.H., 2014. Identification of key odorants of  
832 fried cottage cheese and contribution of *Galactomyces geotrichum* MK017 to the  
833 formation of 2-phenylethanol and related rose-like aroma compounds. *International*  
834 *Dairy Journal* 39, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.008>

835 McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive  
836 Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217.  
837 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- 838 McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour  
839 compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293–324.  
840 <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- 841 Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N.,  
842 Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated  
843 benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–154.  
844 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- 845 Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., Flahaut, C., 2017. MALDI-TOF mass  
846 spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French  
847 cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology, Special Issue:*  
848 *CBL 20th edition: New challenges for research and industry* 247, 2–8.  
849 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005>
- 850 Peruziy, M.F., Murru, N., Yu, Z., Kerkhof, P.-J., Neola, B., Joossens, M., Proroga, Y.T.R.,  
851 Houf, K., 2019. Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar  
852 meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal*  
853 *of Food Microbiology* 301, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.005>
- 854 Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A., Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., Cellière, B.,  
855 Polsinelli, S., Monnin, V., van Belkum, A., Vasseur, V., Nodet, P., Mounier, J., 2019.  
856 Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage  
857 fungi. *Food Microbiol.* 81, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>
- 858 Quigley, L., O’Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2012.  
859 High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not  
860 Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5717–  
861 5723. <https://doi.org/10.1128/AEM.00918-12>
- 862 Ruggirello, M., Cocolin, L., Dolci, P., 2016. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during  
863 late ripening in cheese models. *Food Microbiol.* 59, 112–118.  
864 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.001>
- 865 Ruggirello, M., Dolci, P., Cocolin, L., 2014. Detection and viability of *Lactococcus lactis*  
866 throughout cheese ripening. *PLoS ONE* 9, e114280.  
867 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114280>
- 868 Sarhan, M.S., Hamza, M.A., Youssef, H.H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Nemr, R.,  
869 Daanaa, H.-S.A., Mourad, E.F., Morsi, A.T., Abdelfadeel, M.R., Abbas, M.T., Fayez,  
870 M., Ruppel, S., Hegazi, N.A., 2019. Culturomics of the plant prokaryotic microbiome  
871 and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research,*  
872 *Special Issue on Plant Microbiome* 19, 15–27.  
873 <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>
- 874 Schornsteiner, E., Mann, E., Bereuter, O., Wagner, M., Schmitz-Esser, S., 2014. Cultivation-  
875 independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese  
876 rinds. *International Journal of Food Microbiology* 180, 88–97.  
877 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.010>
- 878 Smith, C.A., Want, E.J., O’Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: processing  
879 mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment,  
880 matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787.  
881 <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- 882 Toju, H., Tanabe, A.S., Yamamoto, S., Sato, H., 2012. High-Coverage ITS Primers for the  
883 DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental  
884 Samples. *PLOS ONE* 7, e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- 885 Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Lekhal, D. a. H., Roques, C., 2011. Relationship between  
886 the production conditions of goat’s milk and the microbial profiles of milk.  
887 *International Journal of Dairy Science* 6, 13–28.

888 Treimo, J., Vegarud, G., Langsrud, T., Rudi, K., 2006. Use of DNA quantification to measure  
889 growth and autolysis of *Lactococcus* and *Propionibacterium* spp. in mixed  
890 populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6174–6182.  
891 <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-06>

892 Van Hoorde, K., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Molecular identification and typing of lactic  
893 acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dairy*  
894 *Science & Technology* 88, 445–455.

895 Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA  
896 amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703.  
897 <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

898 Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed, Use R! Springer  
899 International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>

900 Wolfe, B.E., Button, J.E., Santarelli, M., Dutton, R.J., 2014. Cheese Rind Communities  
901 Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity.  
902 *Cell* 158, 422–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>  
903

**Table 1. *Lacticaseibacillus paracasei* quantification by qPCR during cheese ripening.** Results are expressed as number of copies per gram of cheese based on mean values and standard deviation of triplicate analyses. Means with different letters in the last column are significantly different (Tukey's test  $p < 0.05$ ).

Sampling time	Sample type	Ct value	<i>tuf</i> gene copy number/g of cheese
day 14	core	27.63 ± 0.71	1.81x10 <sup>6</sup> ± 8.07x10 <sup>5</sup> <sup>a</sup>
day 62	core	22.35 ± 0.95	6.08x10 <sup>7</sup> ± 3.80x10 <sup>7</sup> <sup>b</sup>
	rind	25.66 ± 0.77	5.46x10 <sup>6</sup> ± 2.07x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>
day 90	core	21.81 ± 0.90	7.63x10 <sup>7</sup> ± 3.06x10 <sup>7</sup> <sup>b</sup>
	rind	25.05 ± 0.54	9.09x10 <sup>6</sup> ± 3.04x10 <sup>6</sup> <sup>a</sup>

---

Ct Cycle threshold

**Table 2. Microbial counts in environmental samples of the cheese factory**

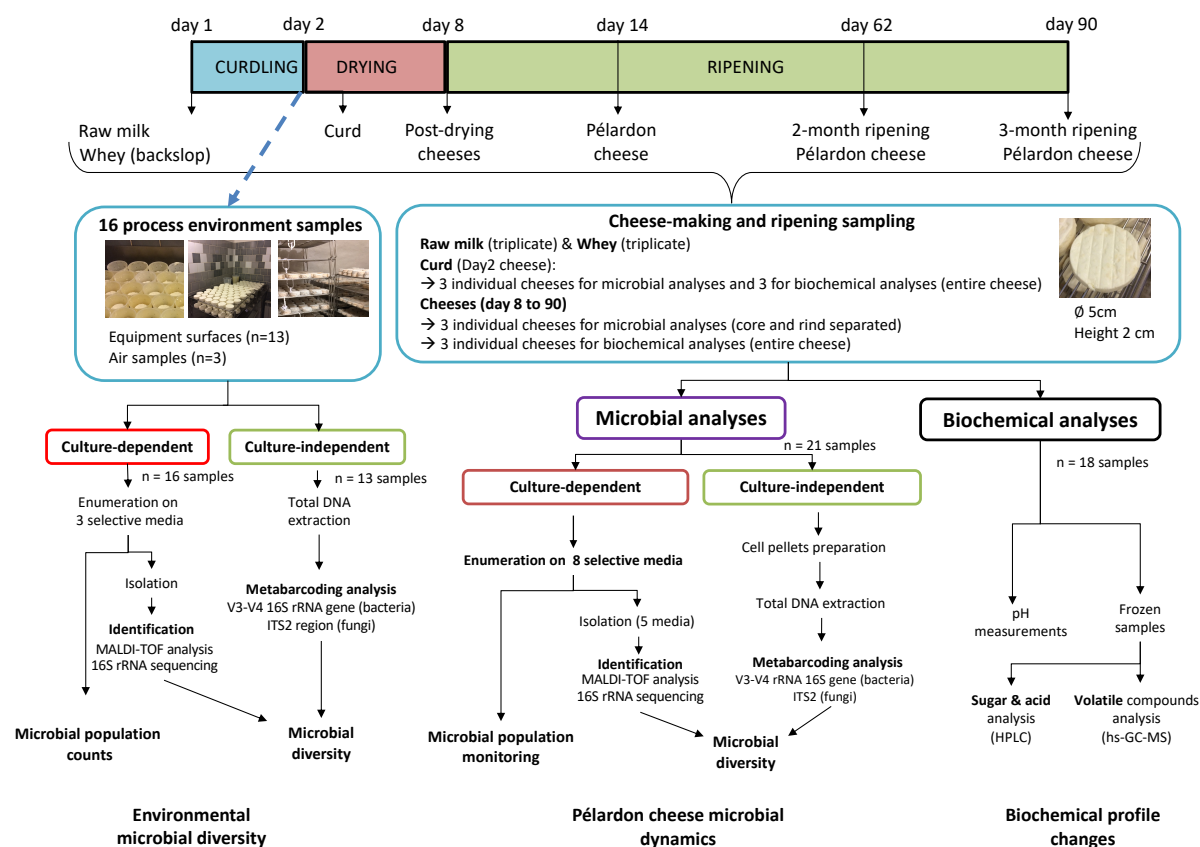
Sample code	Sample type	Microbial counts		
		Mesophilic aerobic bacteria	Fungi	Presumptive LAB <sup>a</sup>
<b>Surface</b>				
<b>(log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>)</b>				
PS1	Cleaned plastic trays surface used for renneting A	2.95	3.62	-
PS2	Cleaned inox bench used for cheese draining	3.26	3.04	-
PS3	Cleaned plastic mould A	-	-	-
PS4	Cleaned tray stored in the cheese-making room	3.15	3.46	-
PS5	Cheese tray in the drying room	5.96	6.22	6.00
PS6	Cheese tray in the ripening room	6.48	6.23	5.26
PS7	Wall tiles in the making room	4.84	2.00	-
PS8	Cleaned plastic mould B	-	-	-
PS9	Cleaned plastic trays surface used for renneting B	3.38	3.80	2.30
PS10	Milk arrival pipe in the cheesemaking room	-	-	-
<b>Intrants</b>				
<b>(log<sub>10</sub> CFU/mL)</b>				
PL1	Tap water arriving in the cheesemaking room	-	-	-
PL2	Tap water arriving in the cleaning area	2.77	-	-
PL3	Salt used for cheese dry salting	-	-	-
<b>Air</b>				
<b>(log<sub>10</sub> CFU/m<sup>3</sup>)</b>				
PAF	Main cheese-making room	>3	2.38	NP
PAS	Drying room	>3	2.34	NP
PAA	Ripening room	>3	2.45	NP

a LAB : Lactic acid bacteria ; - : Population below detection level ; NP : enumeration Not Performed

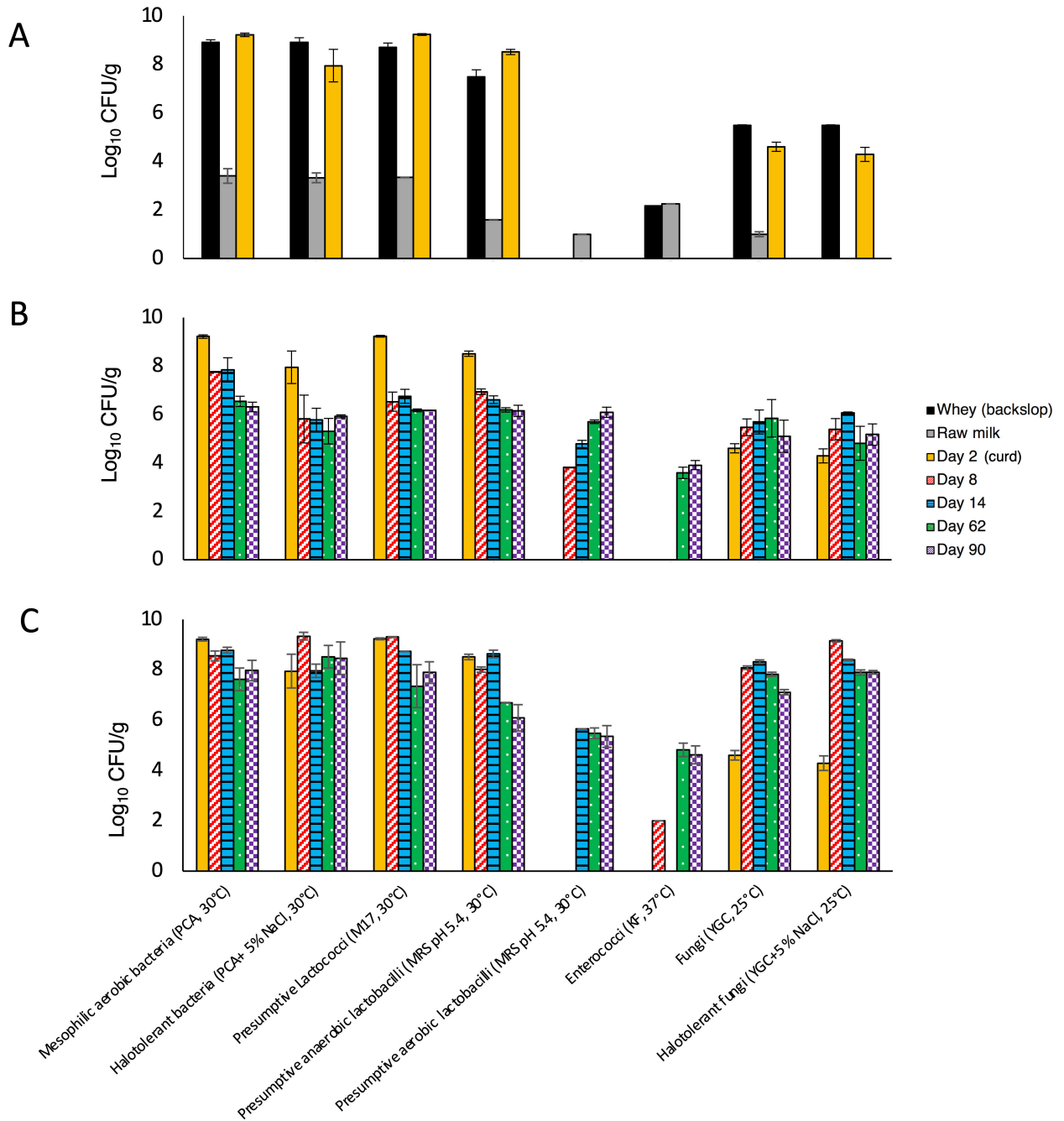
**Table 3. Changes in pH values, sugar and organic acid concentrations (mg/g of cheese) during cheesemaking and ripening.** Mean values and standard deviations are given based on triplicate cheeses. Means with different letters within pH values or within a row for acids and sugars are significantly different (Tukey's test  $p < 0.05$ )

	<b>pvalue</b>	<b>Whey</b>	<b>Day 2</b>	<b>Day 8</b>	<b>Day 14</b>	<b>Day 62</b>	<b>Day 90</b>
<b><i>pH (Units)</i></b>	<b>3.42E<sup>-20</sup></b>						
pH in core		4.33 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.31 ± 0.07 <sup>a</sup>	4.62 ± 0.08 <sup>b</sup>	5.02 ± 0.15 <sup>c</sup>	6.07 ± 0.03 <sup>e</sup>	6.56 ± 0.02 <sup>f</sup>
pH in rind		/	/	4.82 ± 0.06 <sup>bc</sup>	5.62 ± 0.05 <sup>d</sup>	6.73 ± 0.09 <sup>f</sup>	6.69 ± 0.05 <sup>f</sup>
<b><i>Acids and sugars (mg/g of cheese)</i></b>							
Lactose	<b>7.3E<sup>-17</sup></b>	23.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	19.96 ± 0.59 <sup>b</sup>	10.11 ± 0.32 <sup>c</sup>	0.87 ± 0.73 <sup>d</sup>	ND	ND
Galactose	<b>2.36E<sup>-10</sup></b>	0.12 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.14 ± 0 <sup>b</sup>	0.01 ± 0.01 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
Lactic acid	<b>6.14E<sup>-13</sup></b>	5.77 ± 0 <sup>a</sup>	7.3 ± 0.32 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.37 <sup>c</sup>	ND	ND	ND
Acetic acid	<b>2.86E<sup>-10</sup></b>	0.29 ± 0 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.08 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.02 <sup>c</sup>	ND	ND
3-Phenyllactic acid	<b>4.91E<sup>-10</sup></b>	0.01 ± 0 <sup>a</sup>	0.01 ± 0 <sup>b</sup>	0.05 ± 0 <sup>bc</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.07 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.06 ± 0 <sup>d</sup>
Citric acid	<b>2.13E<sup>-04</sup></b>	ND	ND	ND	ND	0.61 ± 0.33 <sup>a</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>a</sup>

ND below quantification and detection limit

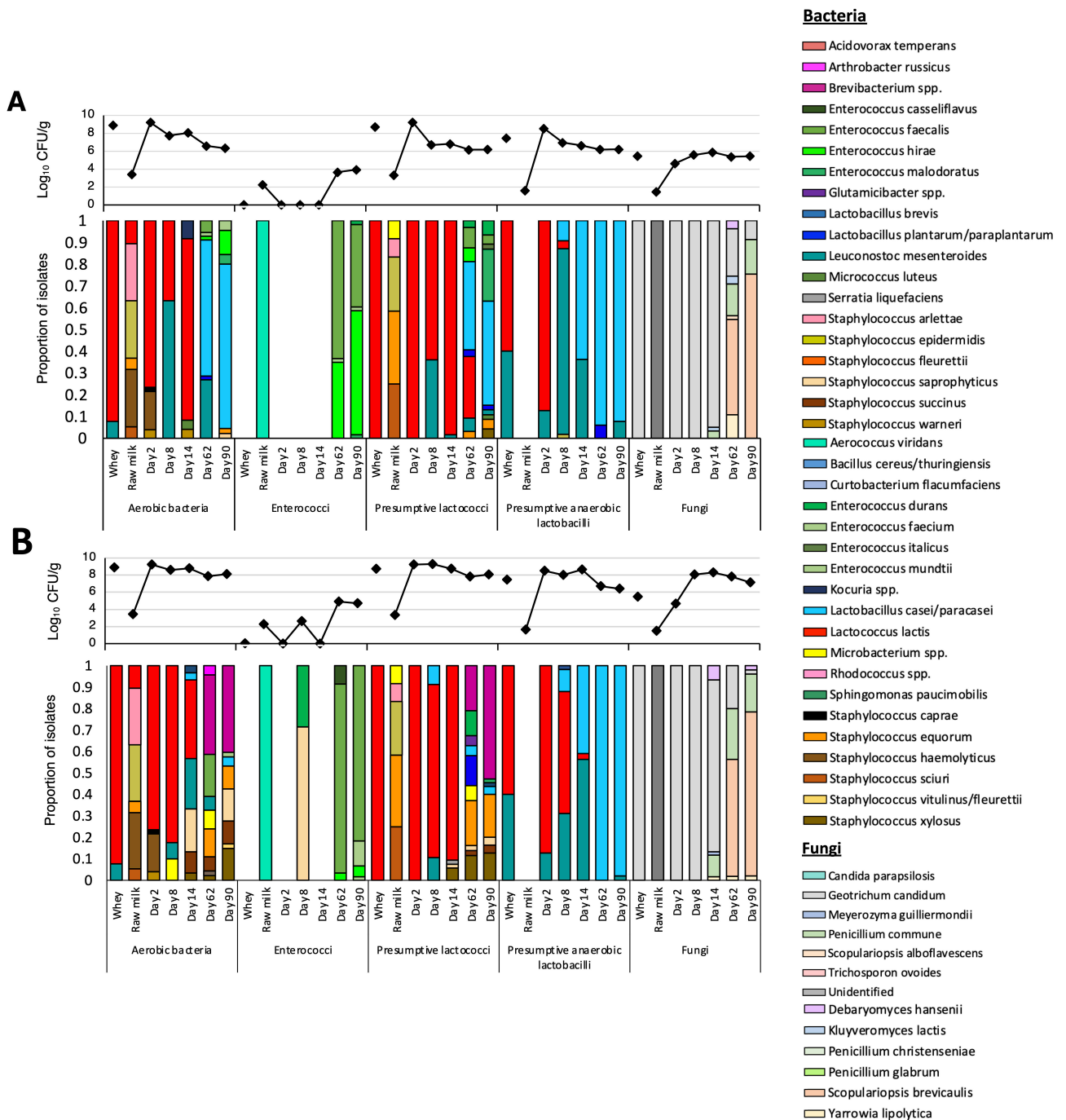


**Fig. 1. Sampling strategy and experimental design used in this study for the analysis of an artisanal goat's milk cheese: Pélardon**

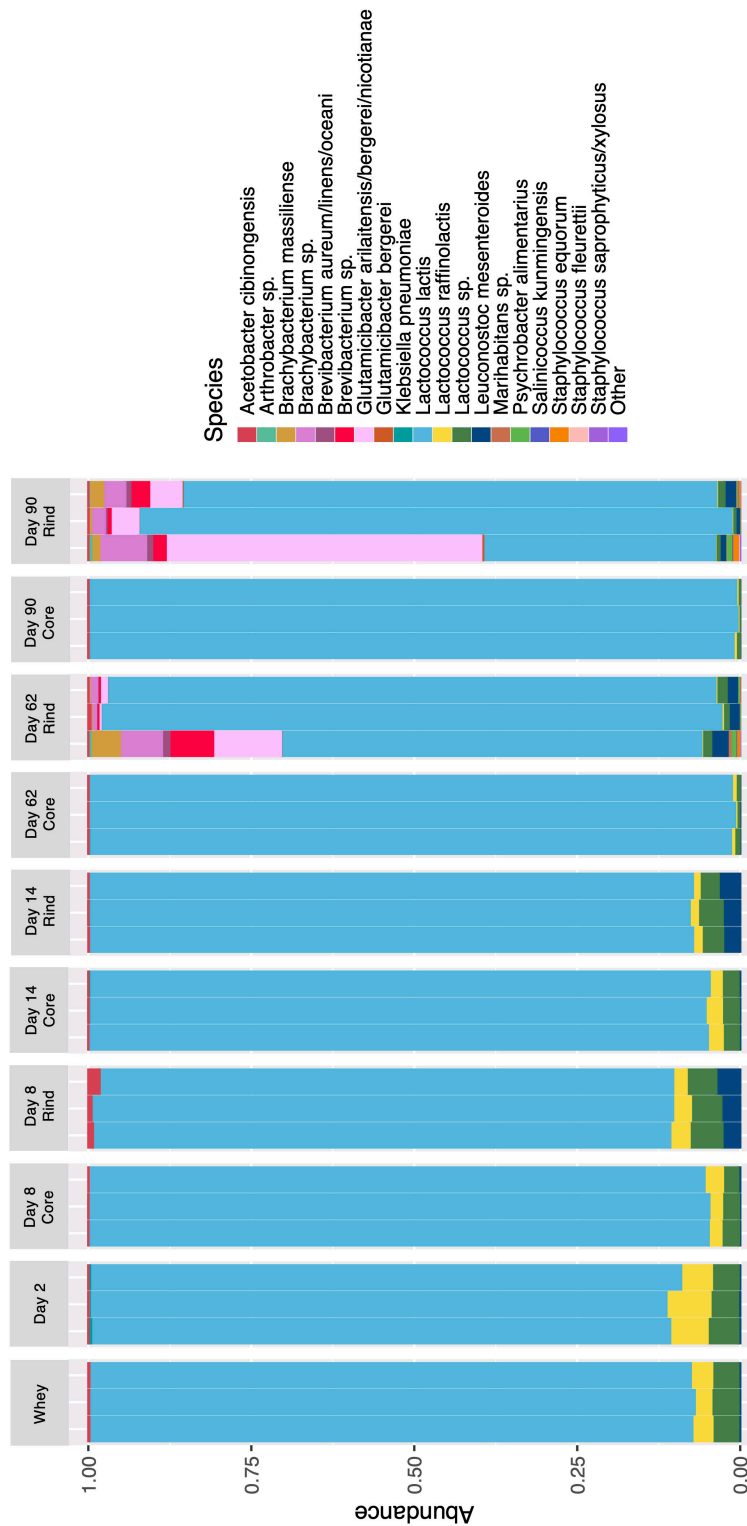


**Fig. 2. Microbial population counts estimated by culture-dependent method during the cheese-making and ripening of Pélardon goat cheese: (A) in raw materials and curd, (B) in cheese core and (C) in cheese rind. Mean values and standard deviations are given based on triplicates. Cultivation conditions for each population are indicated between brackets. In order to facilitate the comprehension, the curd (day 2) is represented on A, B and C.**

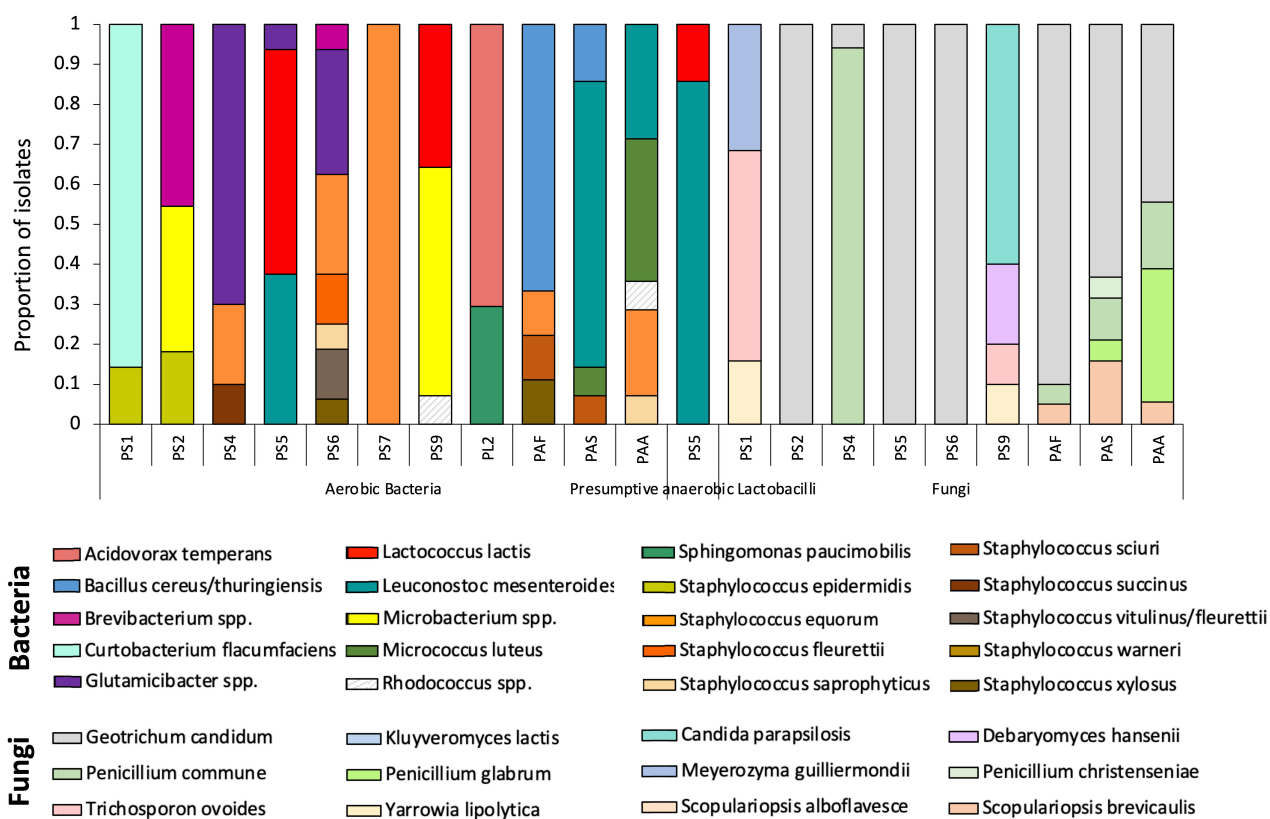




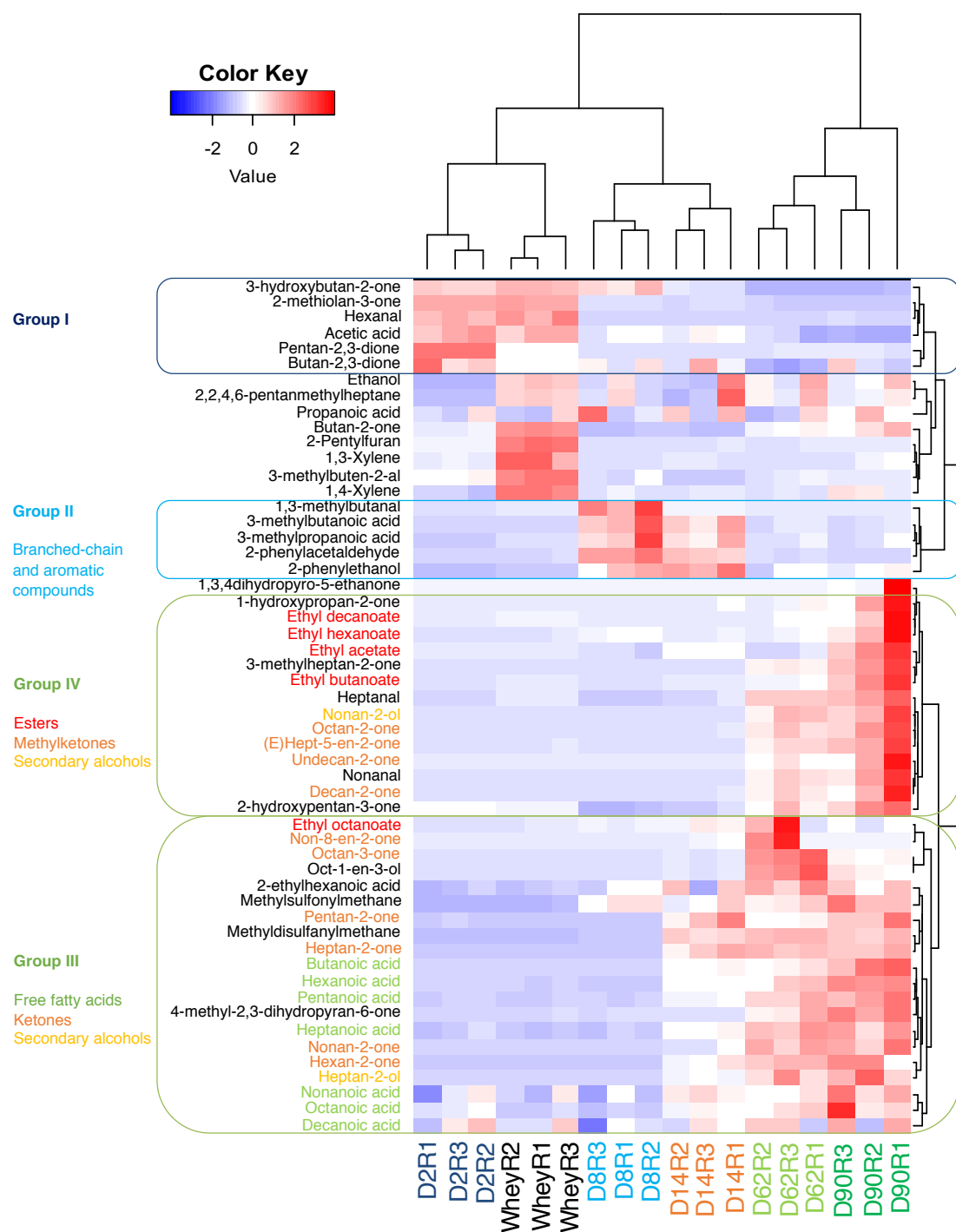
**Fig. 3. Microbial communities diversity revealed by culture-dependent method during Pélardon cheese-making and ripening in the core (A) and in the rind (B).** Dot plots show microbial population counts as detailed on Fig. 2 (average values of 3 replicates) whereas bar plots represent species composition based on isolates identification obtained via MALDI-TOF analysis followed by sequencing of 16S rRNA gene (bacteria) or ITS/beta-tubulin region (fungi). The isolate proportion represents the number of isolates identified as a species divided by the number of isolates all three replicates. In order to facilitate the comprehension, raw milk, whey used for backslopping and day 2 (curd) are represented on A and B.



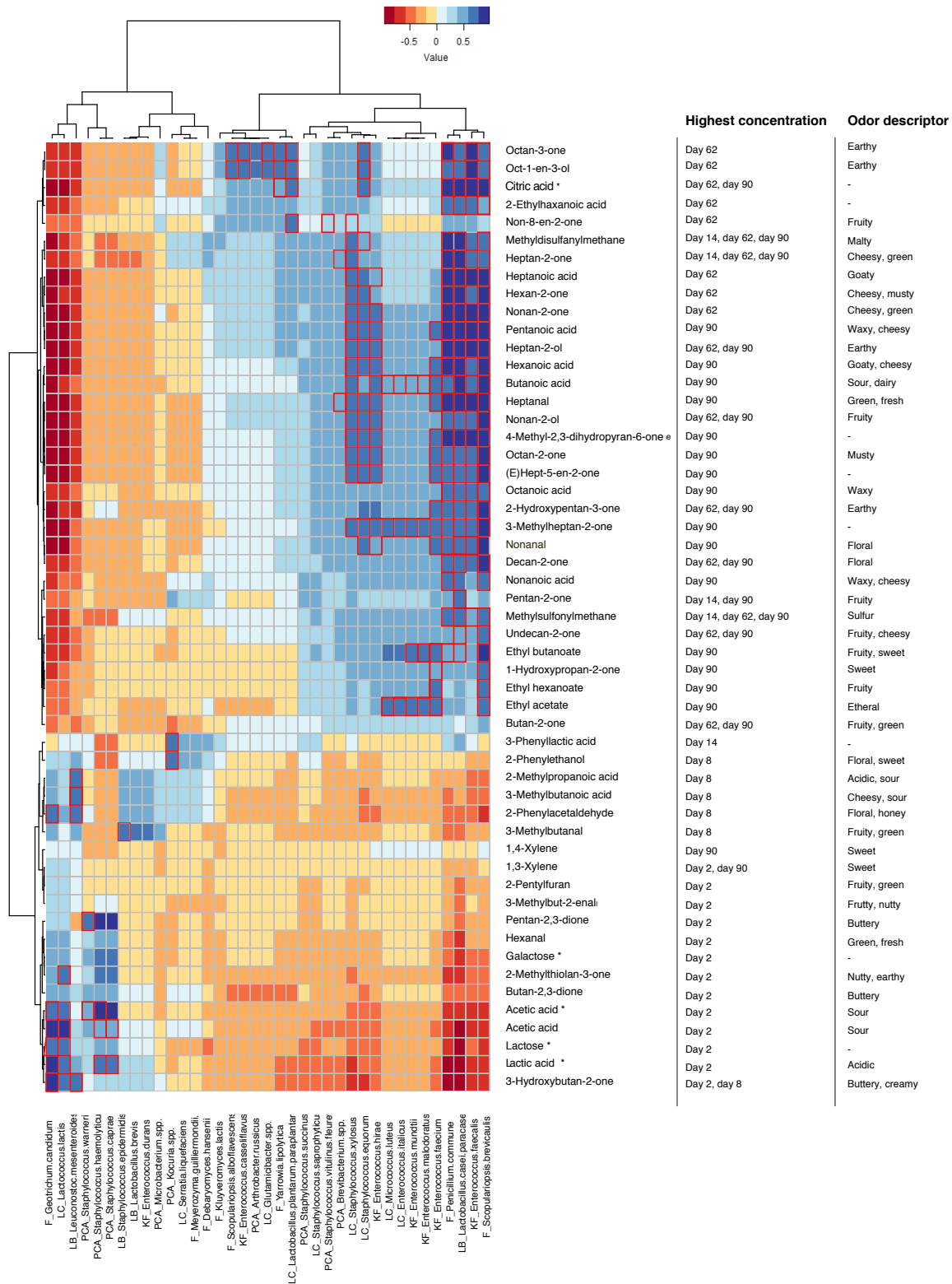
**Fig. 4. Bacterial community composition during Pélardon cheese-making and ripening determined by a culture-independent approach.** Data were obtained by metabarcoding analysis targeting the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Results are expressed as normalized counts.



**Fig. 5. Microbial diversity encountered in the environment of the cheese-factory determined using a culture-dependent approach.** Microbial composition based on isolates identification obtained via MALDI-TOF MS analysis followed by sequencing of 16S rRNA gene (bacteria) or ITS/beta-tubulin region (fungi). PS refers to surface samples, PL to intrants samples while PAF, PAS, PAA refer to air samples from cheese-making, drying and ripening rooms respectively. For detailed information of the samples see Table 2.

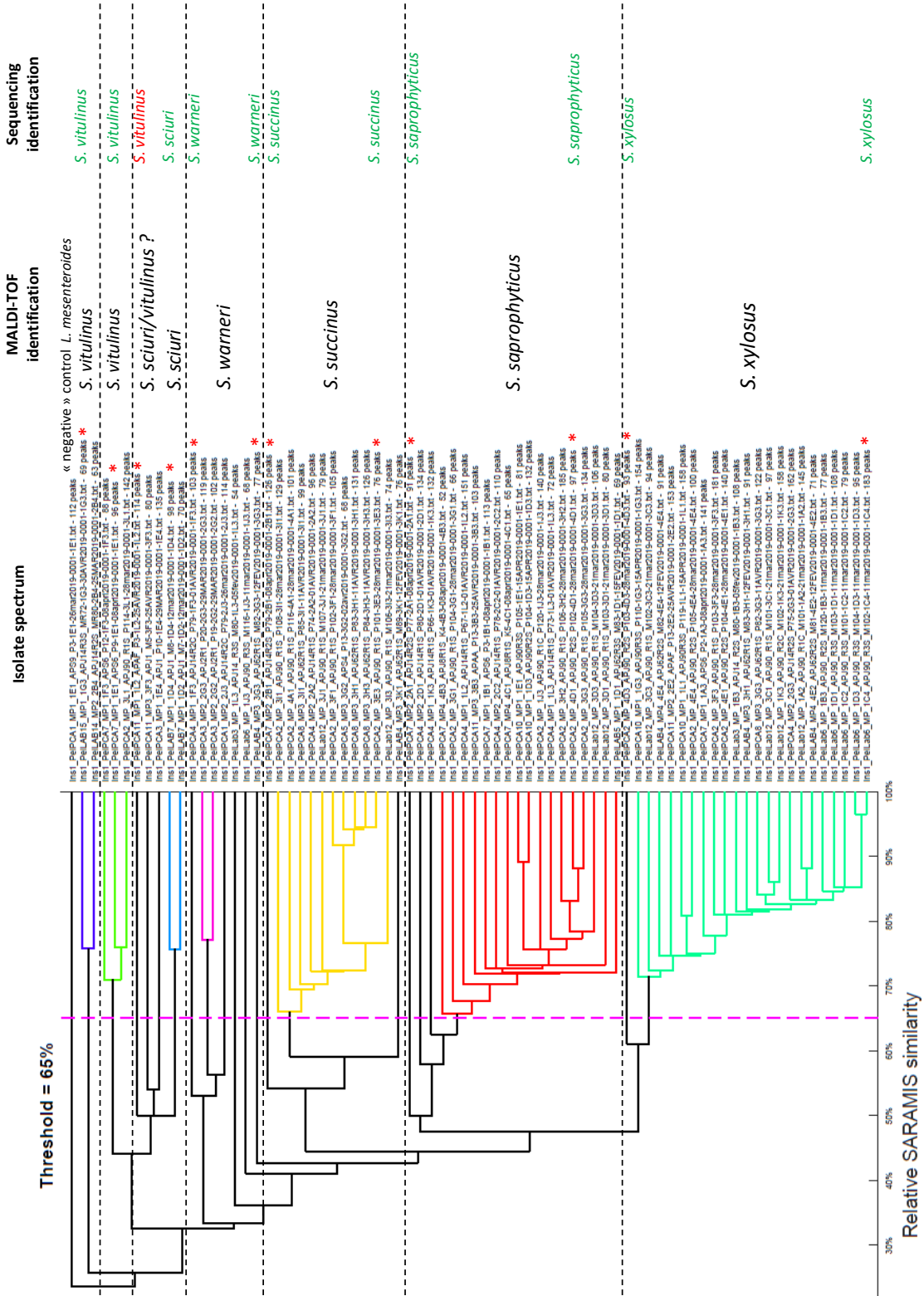


**Fig. 6. Normalized heatmap showing volatile compounds changes determined by HS-GC-MS in Pélardon cheese samples during cheese-making and ripening.** Clustering based on Ward's linkage using Euclidean distance. Samples names are on the right, R1, R2 and R3 refer to the cheese replicates used for analysis. Identified compounds are at the bottom part of the plot. Abundance data were centered and scaled prior to analysis. Color ranging from blue to red correspond to normalized abundance mean levels. The different frames highlight compounds with similar profile during cheese-making and ripening

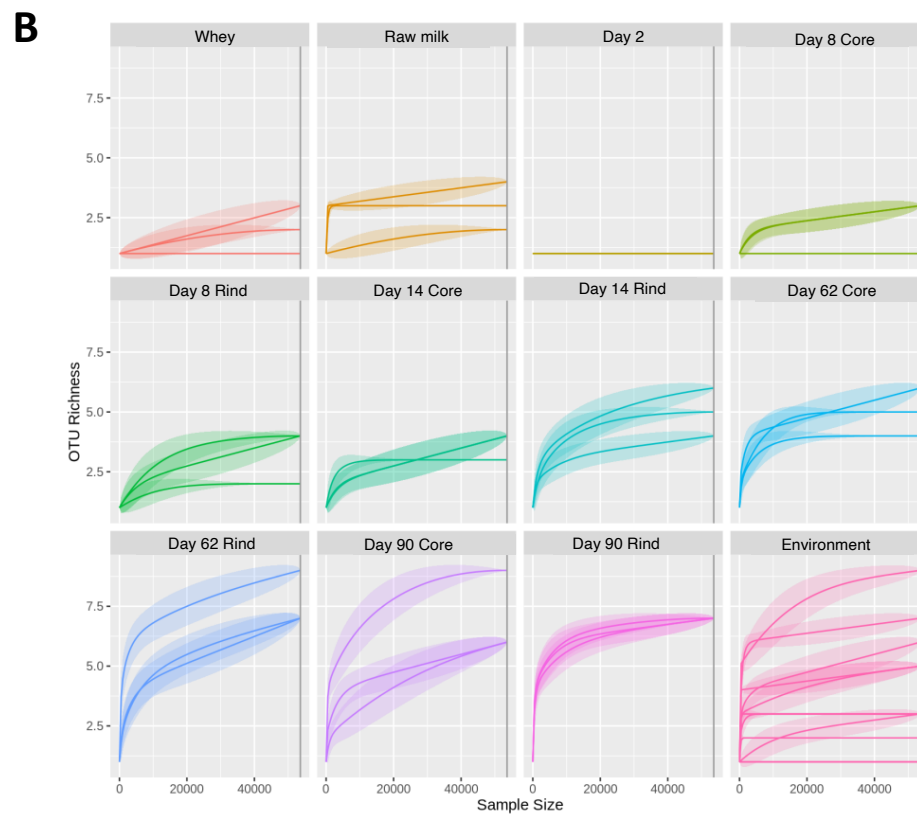
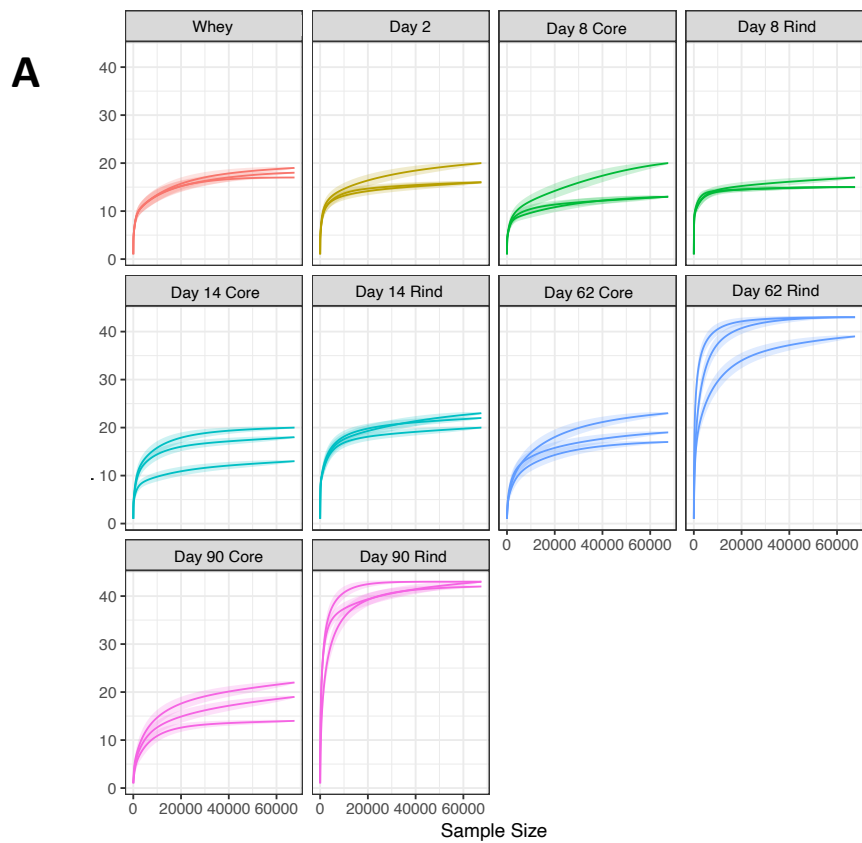


**Fig. 7. Heat-map representing Pearson correlation analysis between species identified using culture-dependent methods and biochemical compounds.** Species are shown at the bottom, compounds are displayed on the right and both were clustered using Ward's linkage using Euclidean distance. Color ranging from red to blue correspond to negative and positive correlation respectively. Red square highlight the strongest positive correlations ( $p < 0.001$ ) - \*, compounds quantified using HPLC.

*Supplementary material to article 1*



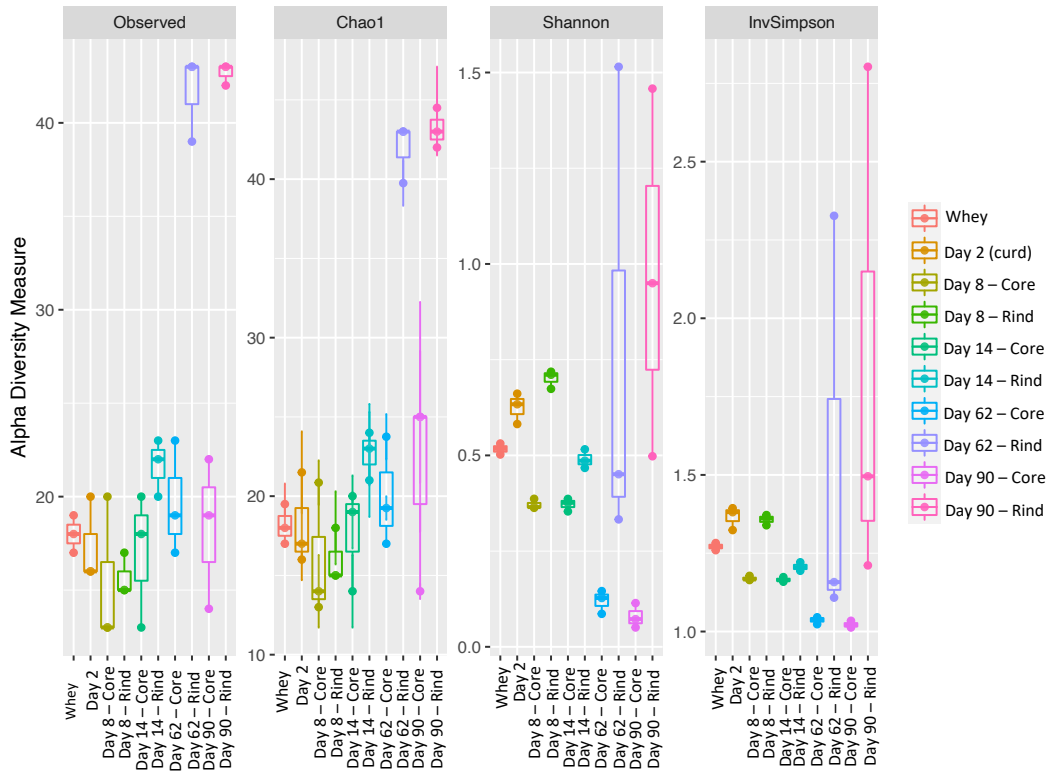
**Supplementary Fig. S1.** Example of a dendrogram of presumptive *Staphylococcus* species spectra obtained by MALDI-TOF analysis. Representative isolates chosen for identification by sequencing are indicated with “\*” symbol. Choice was based on heterogeneity within the same cluster and discrepancies between presumptive identification by commercial MALDI-TOF database and position within the species clusters.



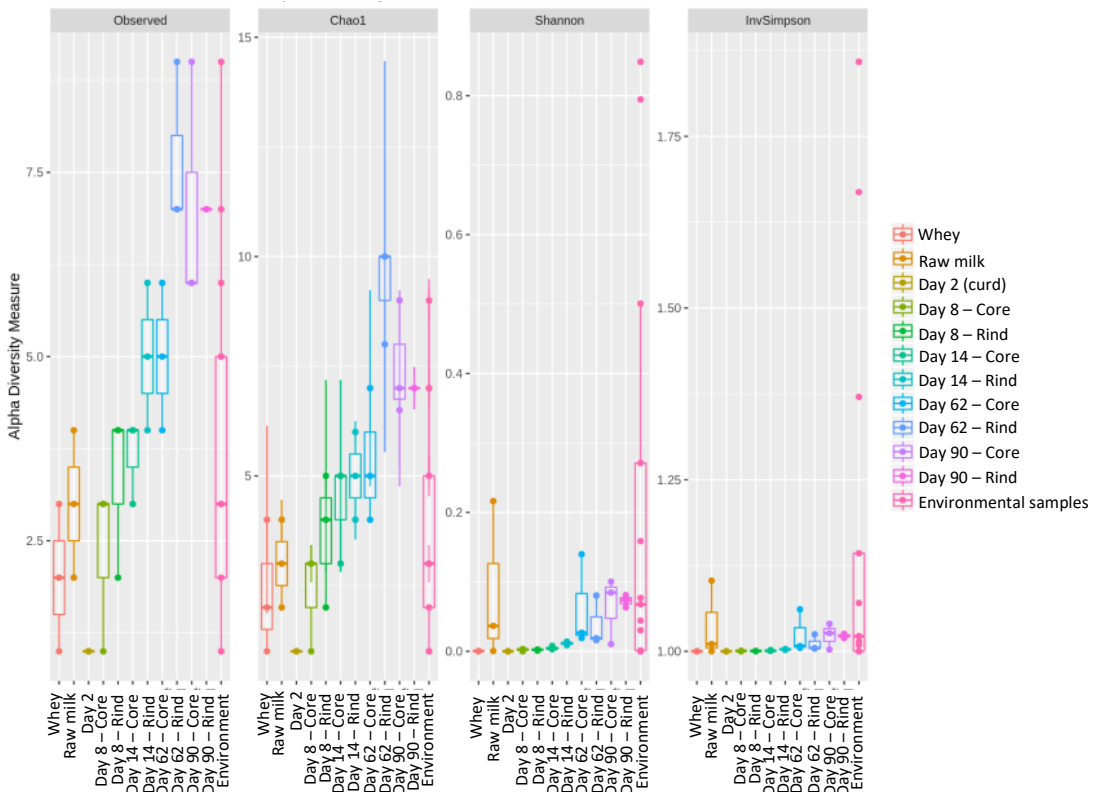
**Supplementary Fig. S2. Rarefaction curves of Illumina sequencing data after normalization grouped by cheese-making/ripening stage and sample type. (A) V3-V4 region of the 16S rRNA gene data (B) ITS2 sequencing data**



**A**  $\alpha$ -diversity indexes of bacterial communities as a function of sample type and process stage



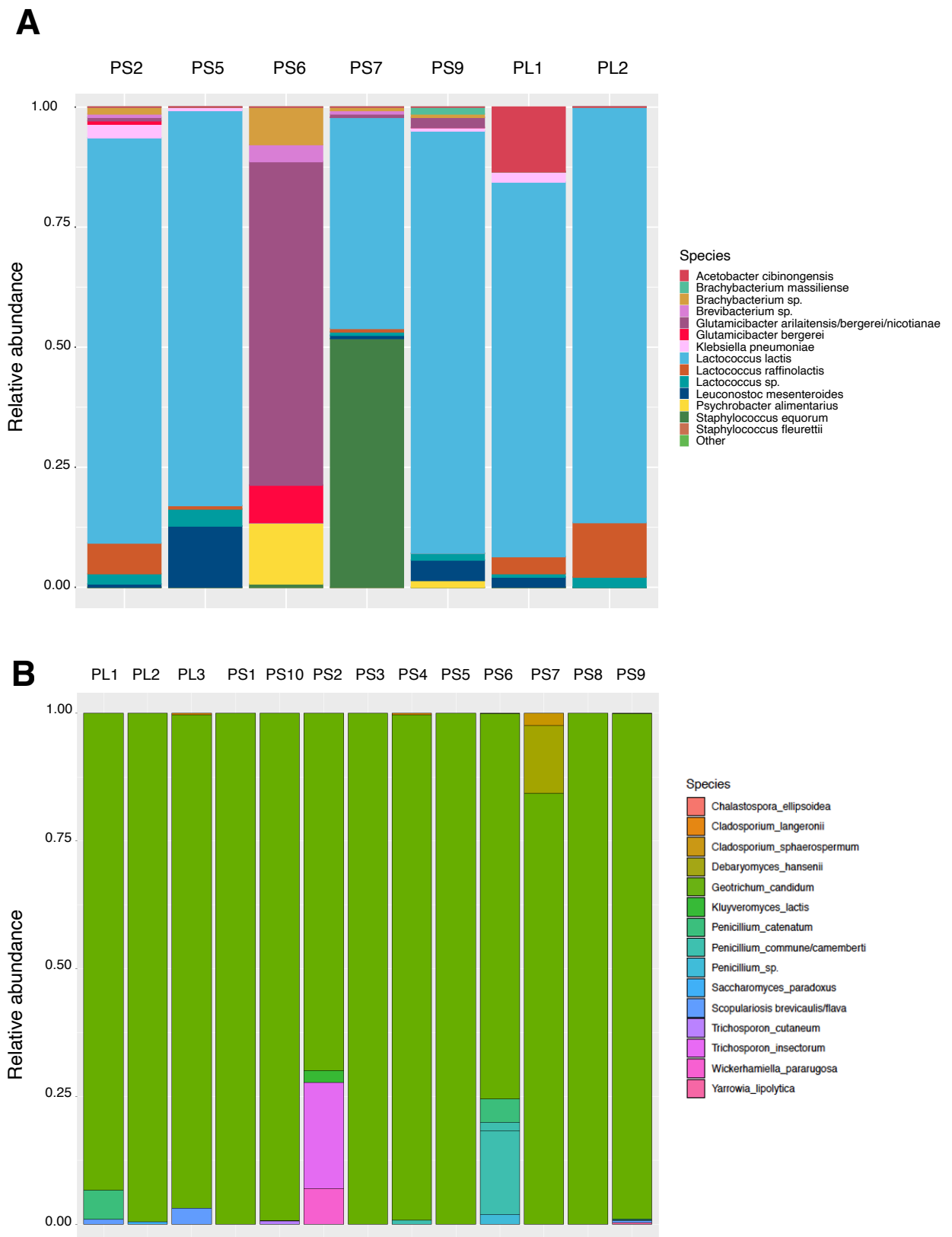
**B**  $\alpha$ -diversity indexes of fungal communities as a function of sample type and process stage



**Supplementary Fig. S3. Alpha-diversity indexes of bacterial (A) and fungal (B) communities during cheese-making and ripening of Pélardon cheese. Samples are grouped according to the process stage and type.**

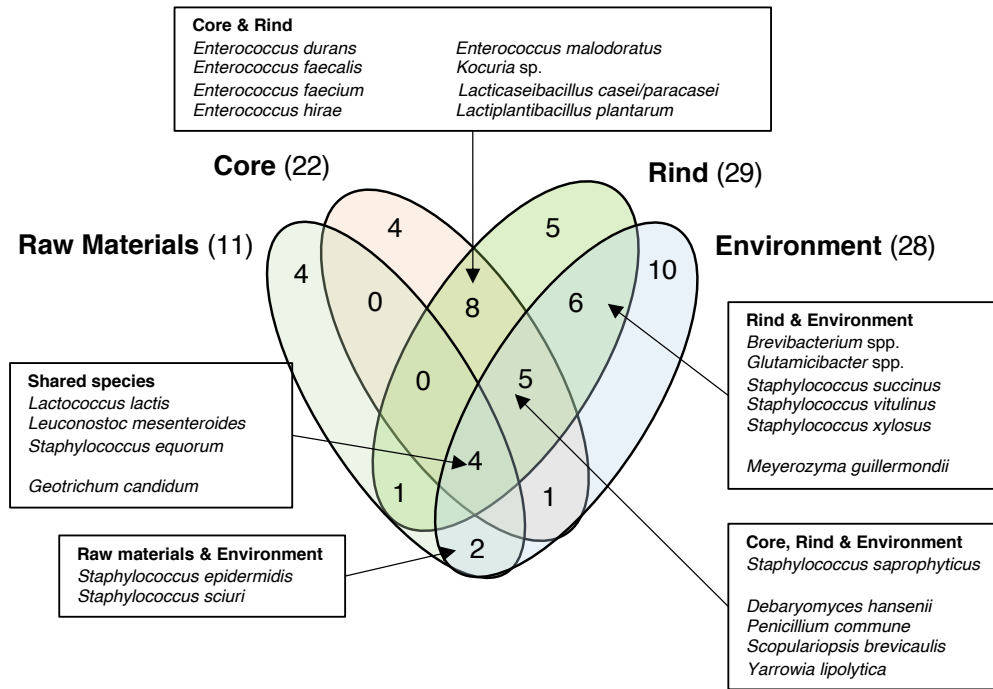


**Supplementary Fig. S4. Composition of fungal communities during Pélarçon cheese-making and ripening by culture-independent approach.** Data were obtained by high-throughput metabarcoding analysis targeting the ITS2 region.

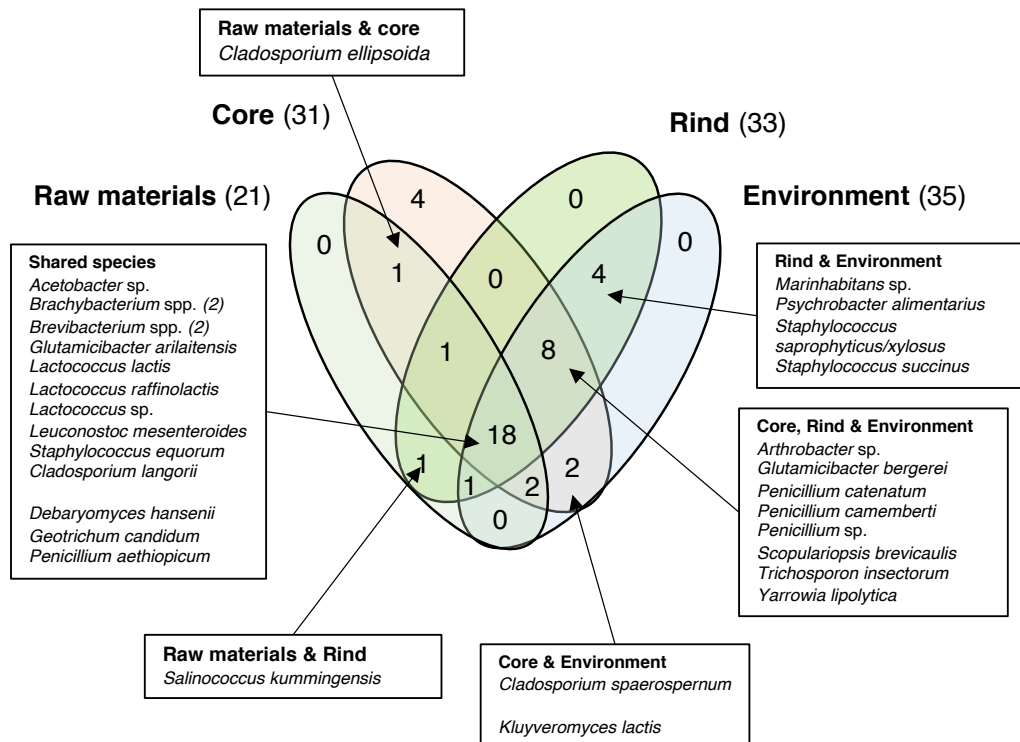


**Supplementary Fig. S5. Microbial community composition encountered in Pélardon cheese-making environment samples using a culture-independent approach. (A) bacterial communities (B) fungal communities using metabarcoding analyses targeting the V3-V4 region of 16S rRNA gene for bacteria and the ITS2 region for fungi. See Table 2 for legend of environmental samples.**

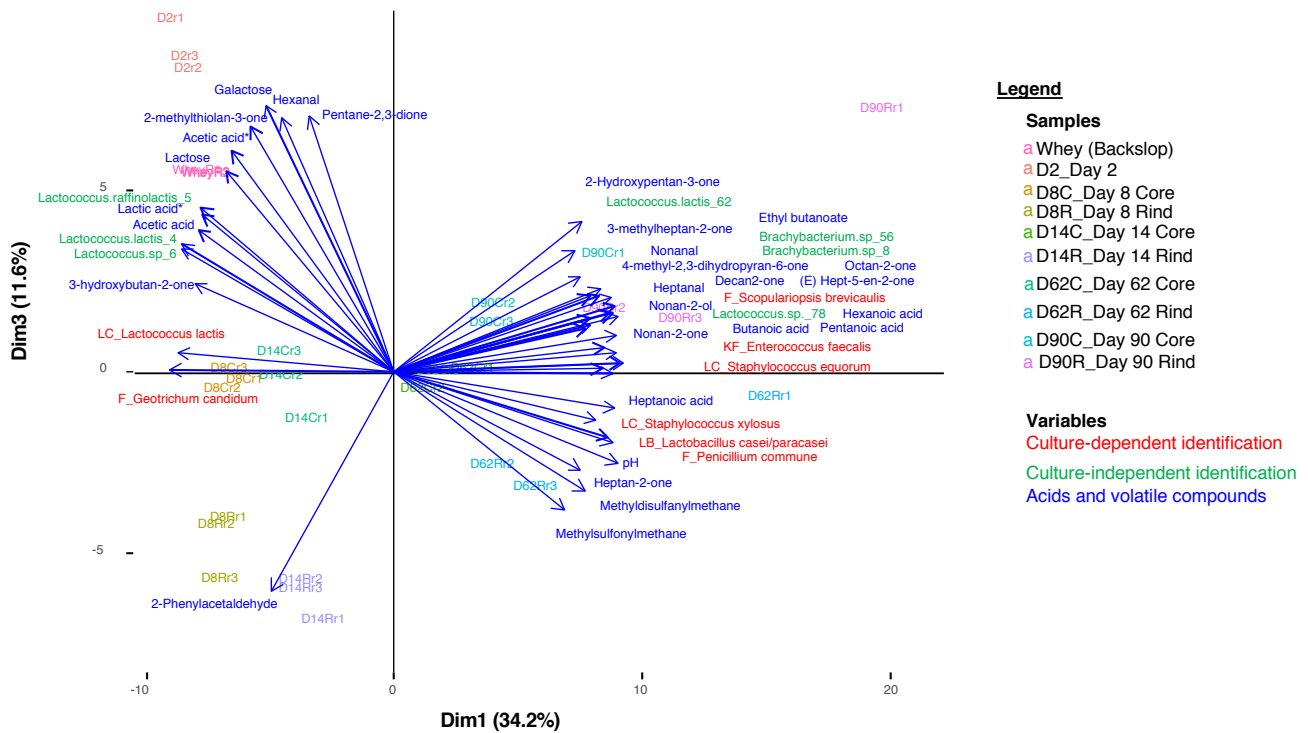
**A**



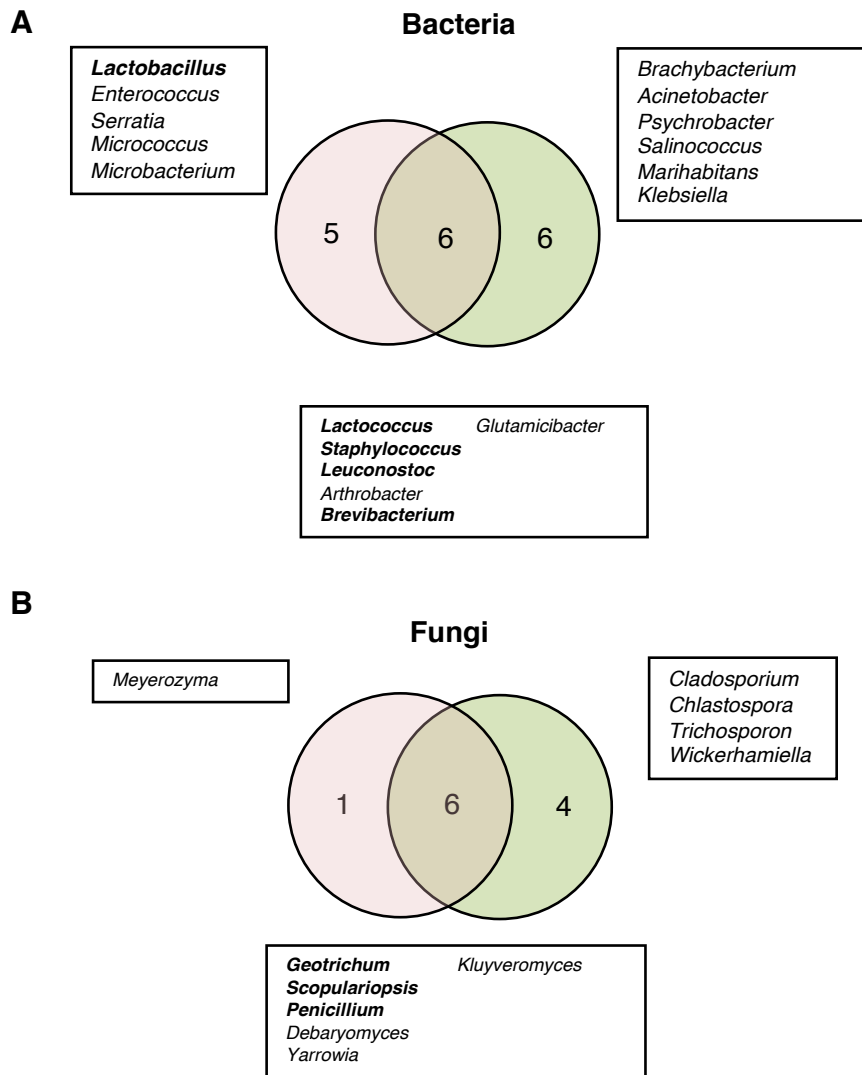
**B**



**Supplementary Fig. S6. Venn diagrams representing diversity and shared species in cheese and environmental samples using (A) culture-dependent and (B) culture-independent approaches.**



**Supplementary Fig. S7. Principal component analysis biplot of microbial counts, culture-dependent (red), culture-independent (green) and biochemical data (acids and volatile compounds in blue) at the different cheese-making and ripening stages. Data are projected on dimensions 1 and 3 and only variables with a  $\cos^2$  superior to 0.6 are displayed.**



**Supplementary Fig. S8. Venn diagrams comparing the number of genera and species identified using culture-dependent (red circles) and culture-independent (green circles) approaches for both bacteria (A) and fungi (B). Dominant genera identified by either of culture-dependent or independent approaches throughout the cheese-making or ripening are indicated in bold.**

**Supplementary Table S1. Primers used in this study**

<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Target</b>	<b>Reference</b>
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS region	
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	$\beta$ -tubulin gene	Glass and Donaldson (1995)
Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'		
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	D1-D2 domain	Kurtzman and Robnett (1998)
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'		
fD1	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	16S rRNA gene	Weisburg et al. (1991)
rP2	5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'		
TuflparacF	5'-TCCGGGAAGTCTCAGC-3'	tuf gene	modified from Achilleos and Berthier (2013)
TuflparacR	5'-TGTTTCACGAACAGGTG-3'		
S-D-Bact-0341-b-S-17	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'	V3-V4 region of 16S rDNA gene	Klindworth et al. (2013)
S-D-Bact-0785-a-A-21	5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'		
ITS3f	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	ITS2 region	Toju et al. (2012)
ITS4_Kyo1	5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-3'		

**Supplementary Table S2. Volatile compounds identified and quantified (AU) during Pélardon cheese-making and ripening using HS-GSMS.**

Compound	Pubchem #	LRI	EIC (m/z)	Identification <sup>a</sup>	Pvalue <sup>b</sup>	Abundance (AU) <sup>b</sup>						Odor descriptor <sup>c</sup>
						Whey	Curd (day 2)	Post-drying (day 8)	Ripening -2weeks (day 14)	Ripening-2months (day 62)	Ripening-3months (day 90)	
<i>Alcohols</i>												
Ethanol	702	950	57	RI, DB	1.98E-01	6.8E+08 ± 4.8E+07 <sup>a</sup>	6.0E+07 ± 4.2E+06 <sup>a</sup>	3.2E+08 ± 2.2E+08 <sup>a</sup>	4.0E+08 ± 5.1E+08 <sup>a</sup>	5.1E+08 ± 2.9E+08 <sup>a</sup>	4.7E+08 ± 2.0E+08 <sup>a</sup>	Alcoholic
Heptan-2-ol	10976	1355	83	RI, DB	<b>2.06E-04</b>	5.1E+05 ± 4.9E+04 <sup>c</sup>	1.2E+05 ± 1.9E+04 <sup>c</sup>	1.0E+05 ± 4.0E+04 <sup>c</sup>	5.7E+07 ± 1.1E+07 <sup>bc</sup>	1.9E+08 ± 8.6E+07 <sup>ba</sup>	2.4E+08 ± 9.7E+07 <sup>a</sup>	Citrus, earthy, bitter
Nonan-2-ol	12367	1568	69	RI, DB	<b>5.83E-04</b>	4.1E+06 ± 1.4E+06 <sup>bc</sup>	1.2E+06 ± 4.3E+05 <sup>c</sup>	7.7E+06 ± 1.1E+07 <sup>bc</sup>	3.7E+07 ± 1.5E+07 <sup>bc</sup>	9.6E+08 ± 3.6E+08 <sup>ba</sup>	1.5E+09 ± 7.8E+08 <sup>a</sup>	Waxy, fruity, dairy, musty
Oct-1-en-3-ol	18827	1482	57	RI, DB	<b>2.44E-07</b>	2.5E+07 ± 1.3E+06 <sup>c</sup>	6.8E+06 ± 1.3E+06 <sup>c</sup>	1.2E+07 ± 3.1E+06 <sup>c</sup>	8.7E+07 ± 3.7E+07 <sup>bc</sup>	1.9E+09 ± 4.2E+08 <sup>a</sup>	5.9E+08 ± 2.2E+08 <sup>b</sup>	Fungal, earthy
2-Phenylethanol	6054	NA	91	DB	<b>3.68E-05</b>	2.7E+07 ± 2.4E+06 <sup>c</sup>	4.5E+06 ± 3.0E+06 <sup>c</sup>	3.5E+08 ± 1.4E+08 <sup>ab</sup>	5.1E+08 ± 8.8E+07 <sup>a</sup>	1.4E+08 ± 8.9E+07 <sup>bc</sup>	1.8E+08 ± 6.4E+07 <sup>bc</sup>	Floral, sweet
<i>Aldehydes</i>												
3-Methylbut-2-enal	61020	1193	84	RI, DB	<b>1.60E-09</b>	2.9E+07 ± 7.7E+05 <sup>a</sup>	1.6E+07 ± 8.1E+05 <sup>b</sup>	1.3E+07 ± 2.2E+06 <sup>c</sup>	9.7E+06 ± 2.6E+05 <sup>c</sup>	1.3E+07 ± 1.3E+06 <sup>c</sup>	1.3E+07 ± 1.3E+05 <sup>c</sup>	Fruity, nutty, almond
3-Methylbutanal	11552	908	44	RI, DB, S	<b>6.30E-06</b>	5.2E+08 ± 6.1E+07 <sup>b</sup>	2.3E+08 ± 1.4E+07 <sup>b</sup>	8.0E+09 ± 2.6E+09 <sup>a</sup>	1.1E+09 ± 1.2E+08 <sup>b</sup>	6.8E+08 ± 2.0E+08 <sup>b</sup>	6.7E+08 ± 4.1E+07 <sup>b</sup>	Fruity, green
Hexanal	6184	1084	56	RI, DB	<b>8.26E-10</b>	1.6E+08 ± 2.5E+07 <sup>a</sup>	1.2E+08 ± 1.1E+07 <sup>b</sup>	3.3E+06 ± 5.4E+05 <sup>c</sup>	2.0E+06 ± 3.1E+05 <sup>c</sup>	4.0E+06 ± 5.9E+05 <sup>c</sup>	4.9E+06 ± 3.8E+06 <sup>c</sup>	Green, fresh
Heptanal	8130	1183	70	RI, DB, S	<b>1.09E-06</b>	4.2E+07 ± 2.7E+06 <sup>c</sup>	1.8E+07 ± 1.8E+06 <sup>c</sup>	9.9E+05 ± 4.6E+05 <sup>c</sup>	2.5E+07 ± 1.3E+07 <sup>c</sup>	1.9E+08 ± 3.7E+06 <sup>b</sup>	2.8E+08 ± 8.2E+07 <sup>a</sup>	Green, fatty, fresh
Nonanal	31289	1390	70	RI, DB	<b>2.13E-03</b>	2.6E+07 ± 8.3E+05 <sup>b</sup>	3.8E+06 ± 2.5E+06 <sup>b</sup>	4.3E+06 ± 6.8E+04 <sup>b</sup>	1.3E+07 ± 9.7E+06 <sup>b</sup>	2.7E+08 ± 7.2E+07 <sup>ba</sup>	5.3E+08 ± 3.3E+08 <sup>a</sup>	Fatty, rose
2-Phenylacetaldehyde	998	1641	120	RI, DB, S	<b>7.43E-10</b>	1.9E+06 ± 6.2E+05 <sup>c</sup>	1.3E+06 ± 7.7E+04 <sup>c</sup>	5.7E+07 ± 8.4E+06 <sup>a</sup>	3.8E+06 ± 3.6E+06 <sup>b</sup>	3.5E+06 ± 1.5E+06 <sup>c</sup>	4.4E+05 ± 1.2E+05 <sup>c</sup>	Green, floral, honey
<i>Fatty acids</i>												
Acetic acid	176	1451	45	RI, DB, S	<b>1.62E-06</b>	2.2E+10 ± 3.3E+09 <sup>a</sup>	2.4E+10 ± 3.3E+09 <sup>a</sup>	1.1E+10 ± 3.4E+09 <sup>b</sup>	1.1E+10 ± 2.3E+09 <sup>b</sup>	3.7E+09 ± 3.3E+09 <sup>bc</sup>	4.1E+08 ± 7.0E+08 <sup>c</sup>	Acidic, sour
Butanoic acid	264	1630	73	RI, DB, S	<b>9.86E-07</b>	9.7E+06 ± 5.7E+06 <sup>c</sup>	5.3E+06 ± 3.9E+06 <sup>c</sup>	1.1E+07 ± 1.1E+07 <sup>c</sup>	2.7E+09 ± 4.6E+08 <sup>bc</sup>	3.6E+09 ± 8.5E+08 <sup>b</sup>	9.0E+09 ± 2.4E+09 <sup>a</sup>	Cheesy, sour, dairy
Propanoic acid	1032	1544	74	RI, DB, S	8.50E-01	3.9E+08 ± 2.4E+08 <sup>a</sup>	4.0E+08 ± 1.9E+08 <sup>a</sup>	5.5E+08 ± 4.2E+08 <sup>a</sup>	5.7E+08 ± 2.7E+08 <sup>a</sup>	3.7E+08 ± 2.6E+08 <sup>a</sup>	5.6E+08 ± 1.8E+08 <sup>a</sup>	Acidic, dairy, fruity
Pentanoic acid	7991	1747	73	DB, S	<b>9.04E-07</b>	8.2E+06 ± 1.5E+06 <sup>b</sup>	9.0E+06 ± 1.5E+06 <sup>b</sup>	8.2E+06 ± 1.5E+06 <sup>b</sup>	2.6E+07 ± 3.5E+06 <sup>a</sup>	5.8E+07 ± 1.1E+07 <sup>a</sup>	7.5E+07 ± 1.7E+07 <sup>a</sup>	Cheesy, acidic
Hexanoic acid	8892	NA	73	DB, S	<b>6.95E-09</b>	3.6E+08 ± 7.7E+07 <sup>d</sup>	5.5E+08 ± 1.1E+08 <sup>d</sup>	1.5E+08 ± 5.3E+07 <sup>d</sup>	2.0E+09 ± 3.0E+08 <sup>c</sup>	3.7E+09 ± 1.0E+09 <sup>b</sup>	6.2E+09 ± 2.2E+08 <sup>a</sup>	Fatty, cheesy, goaty
Heptanoic acid	8094	NA	87	DB, S	<b>1.46E-06</b>	5.8E+06 ± 9.8E+05 <sup>c</sup>	6.1E+06 ± 2.4E+06 <sup>c</sup>	5.7E+06 ± 1.6E+06 <sup>c</sup>	1.5E+07 ± 3.1E+05 <sup>b</sup>	2.5E+07 ± 5.1E+06 <sup>a</sup>	2.5E+07 ± 5.1E+06 <sup>a</sup>	Waxy, cheesy
Octanoic acid	379	NA	101	DB, S	<b>1.06E-02</b>	7.3E+07 ± 2.7E+07 <sup>b</sup>	1.3E+08 ± 3.4E+07 <sup>ab</sup>	5.4E+07 ± 2.7E+07 <sup>b</sup>	1.7E+08 ± 3.3E+07 <sup>ab</sup>	2.5E+08 ± 7.4E+07 <sup>ab</sup>	4.1E+08 ± 2.3E+08 <sup>a</sup>	Fatty, rancid, cheesy
Nonanoic acid	8158	NA	115	DB	<b>2.77E-02</b>	6.3E+06 ± 2.1E+06 <sup>ab</sup>	6.1E+06 ± 2.7E+06 <sup>ab</sup>	5.4E+06 ± 2.0E+06 <sup>b</sup>	8.8E+06 ± 7.0E+05 <sup>ab</sup>	8.1E+06 ± 6.6E+05 <sup>ab</sup>	1.1E+07 ± 2.0E+06 <sup>a</sup>	Waxy, cheesy mild sweet
Decanoic acid	2969	NA	73	DB, S	6.22E-01	8.1E+07 ± 2.4E+07 <sup>a</sup>	8.8E+07 ± 3.2E+07 <sup>a</sup>	5.7E+07 ± 3.5E+07 <sup>a</sup>	8.1E+07 ± 1.8E+07 <sup>a</sup>	9.2E+07 ± 3.0E+07 <sup>a</sup>	1.0E+08 ± 4.1E+07 <sup>a</sup>	Rancid (-), sour, fruity
<i>Branched-chain fatty acids</i>												
3-Methylbutanoic acid	10430	1674	60	RI, DB, S	<b>1.20E-04</b>	1.1E+08 ± 1.3E+07 <sup>b</sup>	2.2E+07 ± 5.9E+06 <sup>b</sup>	2.8E+09 ± 1.1E+09 <sup>a</sup>	2.0E+09 ± 6.9E+08 <sup>b</sup>	3.0E+08 ± 2.1E+08 <sup>b</sup>	3.2E+08 ± 2.1E+08 <sup>b</sup>	Cheesy, sour, ripe
2-Methylpropanoic acid	6590	1573	73	RI, DB, S	<b>2.62E-03</b>	9.4E+07 ± 2.9E+06 <sup>bc</sup>	9.7E+06 ± 2.2E+06 <sup>c</sup>	6.2E+08 ± 3.2E+08 <sup>a</sup>	4.3E+08 ± 1.5E+08 <sup>ab</sup>	1.3E+08 ± 5.2E+07 <sup>bc</sup>	1.4E+08 ± 1.1E+08 <sup>bc</sup>	Acidic, cheesy, sour
2-Ethylhexanoic acid	8697	NA	88	DB	<b>7.64E-03</b>	5.2E+06 ± 1.1E+06 <sup>b</sup>	4.7E+06 ± 2.2E+06 <sup>b</sup>	9.9E+06 ± 3.9E+06 <sup>ab</sup>	1.4E+07 ± 1.1E+07 <sup>ab</sup>	2.4E+07 ± 4.9E+06 <sup>a</sup>	1.8E+07 ± 4.8E+06 <sup>ab</sup>	-
<i>Esters</i>												
Ethyl acetate	8857	874	61	RI, DB, S	<b>1.14E-04</b>	4.1E+07 ± 6.9E+05 <sup>b</sup>	4.2E+07 ± 2.1E+06 <sup>b</sup>	1.9E+07 ± 9.5E+06 <sup>b</sup>	6.9E+07 ± 5.1E+06 <sup>b</sup>	2.5E+07 ± 1.5E+07 <sup>b</sup>	2.0E+08 ± 7.6E+07 <sup>a</sup>	Ethereal
Ethyl butanoate	7762	1032	71	RI, DB, S	<b>1.28E-04</b>	8.2E+07 ± 1.1E+07 <sup>b</sup>	5.0E+06 ± 5.5E+05 <sup>b</sup>	2.6E+07 ± 3.8E+06 <sup>b</sup>	1.1E+08 ± 1.6E+07 <sup>b</sup>	3.8E+08 ± 2.2E+08 <sup>b</sup>	2.6E+09 ± 1.2E+09 <sup>a</sup>	Fruity, fsweet, fresh
Ethyl hexanoate	31265	1233	88	RI, DB, S	<b>1.74E-02</b>	7.0E+06 ± 2.1E+06 <sup>b</sup>	1.3E+04 ± 1.5E+04 <sup>b</sup>	1.2E+08 ± 2.1E+07 <sup>b</sup>	5.9E+07 ± 7.9E+06 <sup>b</sup>	7.9E+07 ± 3.9E+07 <sup>b</sup>	7.7E+08 ± 6.0E+08 <sup>a</sup>	Fruity, erty, pineapple
Ethyl octanoate	7799	1436	88	RI, DB	1.37E-01	9.1E+05 ± 3.4E+05 <sup>a</sup>	2.6E+05 ± 9.1E+04 <sup>a</sup>	3.1E+06 ± 1.2E+06 <sup>a</sup>	8.3E+06 ± 4.7E+06 <sup>a</sup>	2.6E+07 ± 2.7E+07 <sup>a</sup>	4.1E+06 ± 3.5E+06 <sup>a</sup>	Waxy, musty, mushroom
Ethyl decanoate	8048	1639	101	RI, DB, S	6.44E-02	5.6E+06 ± 4.3E+05 <sup>a</sup>	1.6E+05 ± 1.2E+05 <sup>a</sup>	1.2E+06 ± 3.8E+05 <sup>a</sup>	3.7E+06 ± 3.7E+05 <sup>a</sup>	1.0E+07 ± 5.9E+06 <sup>a</sup>	8.8E+07 ± 8.6E+07 <sup>a</sup>	Waxy, fruity
<i>Ketones</i>												
Butan-2-one	6569	893	43	RI, DB, S	<b>1.10E-07</b>	2.2E+09 ± 7.7E+07 <sup>a</sup>	7.8E+08 ± 5.5E+07 <sup>cd</sup>	3.1E+08 ± 3.2E+07 <sup>c</sup>	3.2E+08 ± 5.5E+07 <sup>de</sup>	9.9E+08 ± 1.7E+08 <sup>bc</sup>	1.4E+09 ± 3.7E+08 <sup>b</sup>	Fruity, green
Butane-2,3-dione	650	975	43	RI, DB, S	<b>2.68E-02</b>	7.7E+09 ± 1.6E+08 <sup>ab</sup>	1.2E+10 ± 2.8E+09 <sup>a</sup>	8.2E+09 ± 1.7E+09 <sup>ab</sup>	8.5E+09 ± 3.2E+09 <sup>ab</sup>	4.0E+09 ± 5.4E+08 <sup>b</sup>	7.4E+09 ± 2.7E+09 <sup>ab</sup>	Buttery, creamy



Compound	Pubchem #	LRI	EIC (m/z)	Identification <sup>a</sup>	Pvalue <sup>b</sup>	Abundance (AU) <sup>b</sup>						Odor descriptor
						Whey	Curd (day 2)	Post-drying (day 8)	Ripening -2weeks (day 14)	Ripening-2months (day 62)	Ripening-3months (day 90)	
Pentan-2-one	7895	967	86	RI, DB	<b>2.40E-04</b>	3.4E+07 ± 6.3E+06 <sup>b</sup>	1.4E+08 ± 1.6E+08 <sup>b</sup>	1.7E+07 ± 3.7E+06 <sup>b</sup>	7.7E+09 ± 3.7E+09 <sup>a</sup>	3.8E+09 ± 7.3E+08 <sup>ab</sup>	8.7E+09 ± 3.1E+09 <sup>a</sup>	Fruity, fermented, sweet
Pentane-2,3-dione	11747	1066	57	RI, DB	<b>2.22E-15</b>	4.4E+07 ± 1.1E+06 <sup>b</sup>	1.7E+08 ± 1.3E+06 <sup>a</sup>	1.3E+07 ± 1.9E+06 <sup>d</sup>	1.4E+07 ± 2.5E+06 <sup>cd</sup>	2.0E+07 ± 3.1E+06 <sup>cd</sup>	2.2E+07 ± 6.6E+06 <sup>c</sup>	Buttery, toasted
Hexan-2-one	11583	1080	100	RI, DB, S	<b>3.29E-04</b>	3.8E+05 ± 1.8E+05 <sup>b</sup>	6.0E+05 ± 2.6E+05 <sup>b</sup>	1.9E+04 ± 1.4E+05 <sup>b</sup>	2.8E+07 ± 1.3E+07 <sup>b</sup>	5.4E+07 ± 6.2E+06 <sup>a</sup>	5.8E+07 ± 3.1E+07 <sup>a</sup>	Fruity, fungal, buttery
Heptan-2-one	8051	1181	43	RI, DB, S	<b>1.43E-07</b>	1.1E+08 ± 1.0E+07 <sup>b</sup>	6.6E+07 ± 1.2E+07 <sup>b</sup>	4.7E+07 ± 9.5E+06 <sup>b</sup>	8.7E+09 ± 2.8E+09 <sup>a</sup>	9.7E+09 ± 6.1E+08 <sup>a</sup>	9.8E+09 ± 1.2E+09 <sup>a</sup>	Cheesy, green, waxy
3-Methylheptan-2-one	92927	1195	72	RI, DB	<b>2.29E-05</b>	9.2E+05 ± 5.3E+04 <sup>b</sup>	4.4E+04 ± 3.9E+04 <sup>b</sup>	1.1E+05 ± 3.4E+04 <sup>b</sup>	2.0E+06 ± 7.2E+05 <sup>b</sup>	9.2E+07 ± 7.2E+06 <sup>a</sup>	2.8E+08 ± 1.1E+08 <sup>a</sup>	-
(E)-Hept-5-en-2-one	5363108	1219	112	RI, DB	<b>1.07E-04</b>	1.6E+05 ± 1.4E+05 <sup>b</sup>	1.0E+04 ± 7.3E+03 <sup>b</sup>	9.9E+03 ± 1.0E+04 <sup>b</sup>	9.1E+04 ± 6.9E+04 <sup>b</sup>	2.3E+06 ± 4.1E+05 <sup>ba</sup>	4.7E+06 ± 2.1E+06 <sup>a</sup>	-
Octan-2-one	8093	1280	58	RI, DB, S	<b>7.86E-05</b>	5.6E+06 ± 1.5E+06 <sup>c</sup>	4.1E+06 ± 3.7E+05 <sup>c</sup>	9.0E+06 ± 5.8E+05 <sup>c</sup>	5.0E+07 ± 2.1E+07 <sup>bc</sup>	4.6E+08 ± 1.2E+08 <sup>ab</sup>	8.6E+08 ± 3.7E+08 <sup>a</sup>	Musty, cheesy, parmesan
Octan-3-one	246728	1250	72	RI, DB	<b>3.96E-09</b>	3.4E+06 ± 4.1E+05 <sup>c</sup>	4.9E+04 ± 3.1E+04 <sup>c</sup>	7.0E+06 ± 9.9E+05 <sup>c</sup>	3.4E+07 ± 1.3E+07 <sup>c</sup>	4.6E+08 ± 7.8E+07 <sup>a</sup>	1.4E+08 ± 6.2E+06 <sup>b</sup>	Mushroom, cheesy, herbal
Nonan-2-one	13187	1387	43	RI, DB	<b>6.04E-06</b>	7.4E+07 ± 5.6E+06 <sup>b</sup>	3.9E+07 ± 1.6E+06 <sup>b</sup>	4.4E+07 ± 2.4E+07 <sup>b</sup>	2.2E+09 ± 1.3E+09 <sup>b</sup>	1.0E+10 ± 2.5E+09 <sup>ab</sup>	1.2E+10 ± 3.7E+09 <sup>a</sup>	Green, cheesy
Non-8-en-2-one	21108	1443	58	RI, DB	<b>3.66E-02</b>	1.3E+06 ± 4.2E+05 <sup>a</sup>	2.8E+05 ± 4.8E+04 <sup>a</sup>	4.4E+05 ± 2.6E+05 <sup>a</sup>	2.9E+07 ± 2.2E+07 <sup>a</sup>	3.3E+08 ± 2.9E+08 <sup>a</sup>	2.7E+07 ± 7.5E+06 <sup>a</sup>	Fruity, baked
Decan-2-one	12741	1492	58	RI, DB	<b>1.46E-02</b>	3.4E+06 ± 6.1E+05 <sup>b</sup>	6.8E+05 ± 1.5E+05 <sup>b</sup>	8.0E+05 ± 2.7E+05 <sup>b</sup>	6.5E+06 ± 3.7E+06 <sup>b</sup>	1.0E+08 ± 3.8E+07 <sup>ab</sup>	2.1E+08 ± 1.7E+08 <sup>a</sup>	Floral, fermented, fatty
Undecan-2-one	8163	1596	58	RI, DB	<b>3.07E-02</b>	8.4E+06 ± 9.0E+05 <sup>ab</sup>	3.4E+06 ± 7.5E+05 <sup>b</sup>	3.0E+06 ± 9.8E+05 <sup>b</sup>	3.2E+07 ± 2.8E+07 <sup>ab</sup>	7.1E+08 ± 3.8E+08 <sup>ab</sup>	2.1E+09 ± 1.9E+09 <sup>a</sup>	Fruity, floral, creamy, cheesy
3-Hydroxybutan-2-one	179	1282	43	RI, DB, S	<b>1.12E-09</b>	2.0E+10 ± 6.2E+08 <sup>a</sup>	1.7E+10 ± 5.7E+08 <sup>a</sup>	1.7E+10 ± 3.3E+09 <sup>a</sup>	6.1E+09 ± 4.5E+08 <sup>b</sup>	6.1E+08 ± 8.2E+07 <sup>c</sup>	9.6E+08 ± 2.8E+08 <sup>c</sup>	Buttery, creamy, milky
1-Hydroxypropan-2-one	8299	1301	74	RI, DB	<b>2.64E-02</b>	6.4E+06 ± 4.8E+05 <sup>b</sup>	4.2E+06 ± 4.8E+05 <sup>b</sup>	6.8E+06 ± 1.7E+06 <sup>b</sup>	2.1E+07 ± 1.7E+07 <sup>ab</sup>	4.3E+07 ± 3.6E+07 <sup>ab</sup>	2.8E+08 ± 2.3E+08 <sup>a</sup>	caramellic, sweet
2-Hydroxypentan-3-one	521790	1363	57	RI, DB	<b>3.94E-05</b>	7.7E+07 ± 4.3E+05	9.5E+07 ± 1.4E+06	1.1E+07 ± 3.7E+06	3.8E+07 ± 1.0E+07	1.2E+08 ± 4.0E+07	2.0E+08 ± 5.5E+07	Truffle, earthy, nutty
2-Methylthiolan-3-one	61664	1519	116	RI, DB	<b>4.63E-18</b>	7.4E+07 ± 1.0E+06 <sup>a</sup>	7.2E+07 ± 1.4E+06 <sup>a</sup>	1.0E+07 ± 6.0E+05 <sup>b</sup>	7.4E+06 ± 1.6E+06 <sup>b</sup>	8.6E+05 ± 1.2E+06 <sup>c</sup>	5.2E+05 ± 3.7E+05 <sup>c</sup>	Sulfurous, fruity
4-Methyl-2,3-dihydropyran-6-one	557445	NA	82	DB	<b>6.28E-07</b>	1.1E+06 ± 1.0E+06 <sup>c</sup>	2.7E+05 ± 1.4E+05 <sup>c</sup>	6.5E+05 ± 4.0E+05 <sup>c</sup>	2.3E+06 ± 3.0E+05 <sup>c</sup>	2.6E+07 ± 1.1E+07 <sup>b</sup>	5.0E+07 ± 9.0E+06 <sup>a</sup>	-
<i>Others</i>												
(Methylsulfonyl)methane	12232	1067	94	RI, DB, S	<b>6.45E-12</b>	3.0E+07 ± 1.2E+06 <sup>c</sup>	8.5E+06 ± 1.7E+06 <sup>c</sup>	1.1E+08 ± 1.2E+07 <sup>c</sup>	8.1E+08 ± 5.3E+07 <sup>b</sup>	9.8E+08 ± 4.4E+07 <sup>a</sup>	8.9E+08 ± 9.7E+07 <sup>b</sup>	Sulfurous, malty
Methylsulfonylmethane	6213	NA	79	DB	<b>6.13E-05</b>	4.8E+07 ± 2.3E+07 <sup>c</sup>	2.3E+07 ± 1.3E+07 <sup>c</sup>	4.2E+08 ± 8.2E+07 <sup>ab</sup>	3.6E+08 ± 1.8E+08 <sup>b</sup>	4.5E+08 ± 8.6E+07 <sup>ab</sup>	6.7E+08 ± 1.6E+08 <sup>a</sup>	-
2-Pentylfuran	19602	1226	81	RI, DB	<b>2.04E-14</b>	4.9E+07 ± 3.0E+06 <sup>a</sup>	5.1E+06 ± 7.0E+05 <sup>b</sup>	2.3E+05 ± 4.4E+04 <sup>c</sup>	5.3E+05 ± 1.4E+05 <sup>c</sup>	5.0E+05 ± 1.0E+05 <sup>c</sup>	9.7E+05 ± 2.5E+05 <sup>c</sup>	Fruity, musty, green
1-(3,4-Dihydro-2H-pyrrol-5-yl)ethanone	522834	1329	111	RI, DB	2.96E-01	2.2E+05 ± 2.4E+05 <sup>a</sup>	6.4E+03 ± 5.6E+03 <sup>a</sup>	2.7E+03 ± 7.9E+02 <sup>a</sup>	2.5E+03 ± 2.4E+03 <sup>a</sup>	1.5E+05 ± 9.1E+04 <sup>a</sup>	1.8E+07 ± 2.6E+07 <sup>a</sup>	Popcorn
2,2,4,6,6-Pentamethylheptane	26058	950	99	RI, DB	3.75E-01	2.6E+07 ± 2.0E+06 <sup>a</sup>	1.4E+06 ± 6.5E+05 <sup>a</sup>	1.3E+07 ± 1.1E+07 <sup>a</sup>	1.8E+07 ± 2.8E+07 <sup>a</sup>	2.0E+07 ± 1.1E+07 <sup>a</sup>	1.5E+07 ± 5.1E+06 <sup>a</sup>	-
1,3-Xylene	7929	1125	91	RI, DB, S	<b>1.77E-06</b>	2.7E+08 ± 7.5E+07 <sup>a</sup>	2.1E+07 ± 1.0E+07 <sup>b</sup>	8.6E+05 ± 2.8E+05 <sup>b</sup>	6.0E+06 ± 3.7E+06 <sup>b</sup>	1.9E+06 ± 4.0E+05 <sup>b</sup>	2.7E+07 ± 2.3E+07 <sup>b</sup>	Sweet
1,4-Xylene	7809	1140	106	RI, DB, S	<b>6.01E-08</b>	6.2E+07 ± 0.3E+07 <sup>a</sup>	5.5E+06 ± 4.5E+06 <sup>c</sup>	1.2E+07 ± 3.0E+06 <sup>c</sup>	1.3E+07 ± 1.7E+06 <sup>bc</sup>	1.1E+07 ± 1.3E+06 <sup>c</sup>	2.5E+07 ± 9.7E+06 <sup>b</sup>	Sweet

<sup>a</sup> Peak identification method – RI comparison of retention index with literature data ; DB, tentatively identified by spectrum comparison using NIST 2008 workbook database; S comparison of spectra and retention time with those of a commercial standard analyzed under the same conditions

<sup>b</sup> Anova p-value (bold value indicate p<0.05 and in red p<0.001 – different letters in the same row indicate groups with significant difference using Tukey's LSD test (p<0.05)

<sup>c</sup> odor descriptor associated with the compounds according to Thegoodscentscompany database (<http://www.thegoodscentscompany.com>)

NA=Not Available AU= Arbitrary units

## IV. Annexe 1 - Process environmental sampling campaign

### What are the potential microbial sources in the farmhouse-plant?

As no commercial starters can be used, its microbial diversity relies on the raw milk, the back-slopping step and the environment.

Regarding **raw materials**, based on the producer report, no production accidents requiring the use of starter cultures or another producers were reported. As a consequence, the primary and direct sources of microorganisms should be milk, the current whey used for acidification and salt.

Regarding **indirect sources** and **environment input**, cheese-making process takes place in three different rooms with different temperature and hygrometry conditions. It is thus possible that each atmosphere differs in terms of airborne-microorganisms and air sampling of each room could be of interest.

**Material** cleaning is performed after each production batch however using hot water and soap (not systematically), then left to dry naturally. The presence of microbial biofilms is thus not excluded. Moreover, clean containers are all kept in the main production room and exposed to raw milk and cheeses aging from curd to post-drying stages. Based on these elements, most relevant material surfaces to sample would include those of the vats used for acidification, the moulds used during the initial draining step, the trays on which the cheeses are positioned in the different rooms.

Based on these conclusions, samples were taken in different spots of the cheese-making facilities during the monitored Pélardon cheese batch.

## **V. Annexe 2 - Validation des étapes d'extraction et d'amplification pour des analyses métagénomiques**

### **■ Contexte et objectif**

La qualité des résultats des analyses métagénomiques dépend de nombreux paramètres liés au séquençage mais également des étapes en amont telles que l'extraction et l'amplification.

Compte-tenu de la complexité des communautés microbiennes, une extraction efficace est en effet nécessaire pour cibler à la fois les populations fongiques et les populations bactériennes et extraire l'ADN de la manière la plus complète possible. Quant à l'amplification, pour une même région il existe de multiples choix de marqueurs moléculaires qui peuvent être plus ou moins efficaces pour identifier certains micro-organismes. Ceci est particulièrement vrai pour les champignons qui ont une taille d'ITS hautement variable entre espèces. Avant de procéder aux analyses, des pré-manipulations ont donc été réalisées afin de valider d'une part le protocole d'extraction et d'autre part, le choix des amorces universelles pour l'amplification.

### **■ Matériel et méthodes**

#### Variables testées :

Concernant l'extraction, l'efficacité du protocole a été testée sur des fromages correspondant à deux stades extrêmes de production : caillé acidifié (jour 2) et le Pélardon à 3 mois d'affinage.

Pour ce dernier, le cœur et la surface du fromage ont été analysés séparément. Deux variables ont été testées : la prise d'effet d'échantillon pour l'extraction d'ADN total (volume de 1 mL ou 5 mL) et deux couples d'amorces ciblant la région ITS.

#### Préparation et extraction des ADNs:

Pour tous ces paramètres, le même protocole d'extraction a été appliqué. Les culots cellulaires ont été préparés par homogénéisation de la matrice dans de l'eau citratée (dilution 1/10) suivi d'une étape de centrifugation (9000 g, 15min ; 4°C) à partir des différentes prises d'essai testées (1 et 5 mL).

L'extraction d'ADN à partir des culots a été réalisée suivant le protocole optimisé pour les matrices fromagères utilisé en routine au laboratoire mais légèrement adapté pour extraire

également les ADNs fongiques. Succinctement, les ADNs totaux ont été extraits avec le QIAGEN Blood and Tissue kit comprenant une phase de lyse enzymatique mélangeant trois enzymes (lyticase 20 mg/mL; lysozyme 20 mg/mL et mutanolysine 10mg/mL; réalisée en amont du kit), une phase de broyage mécanique suivie d'une précipitation et purification sur colonne.

### Conditions d'amplification

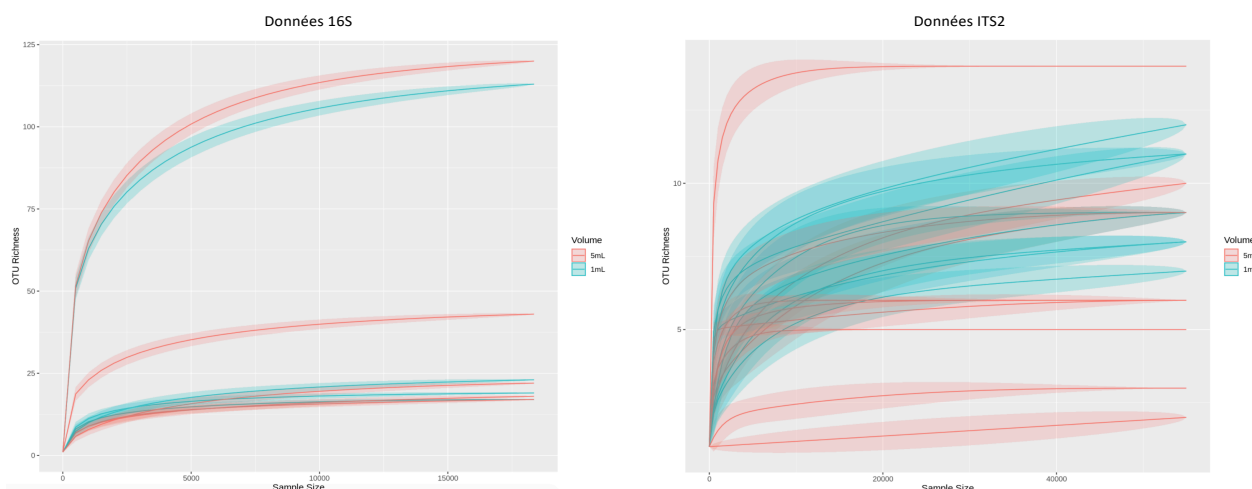
L'amplification a été réalisée pour les ADNs bactériens en ciblant la région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S. Les amorces S-D-Bact-0341-b-S-17 et S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013) précédemment testées en interne dans le cadre de l'étude de nombreuses matrices alimentaires ont été utilisées.

Pour les ADNs fongiques, deux paires d'amorces ciblant la région ITS2 ont été testées : les amorces ITS3f/ITS4\_Kyo1 développées par Toju et al. (2012) et le couple ITS3tagmix1/ITS4ngs développé par Tederso et al., (2014), en suivant les conditions d'amplification décrites dans les publications respectives.

## ▪ Résultats

### Profondeur de séquençage

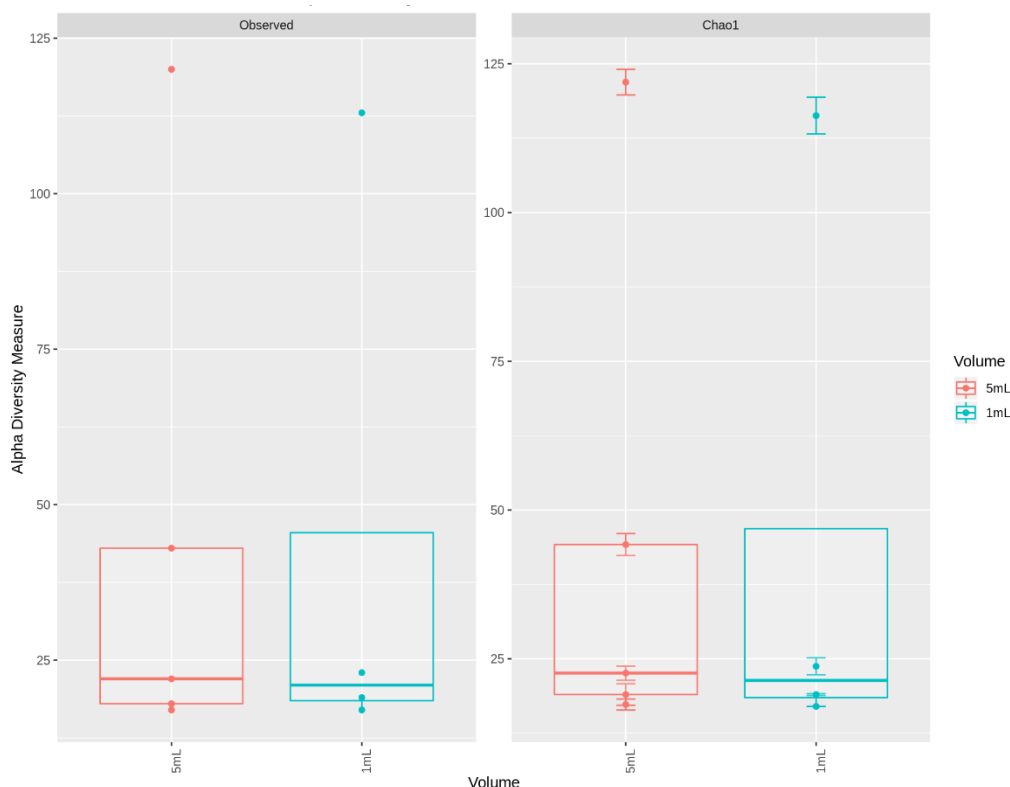
Les courbes de raréfaction laissent entrevoir les plateaux ce qui indique que la profondeur de séquençage est suffisante pour les deux types de communautés, fongique et bactérienne (**Figure 11**).



**Figure 11. Courbes de raréfaction des données de séquençage**

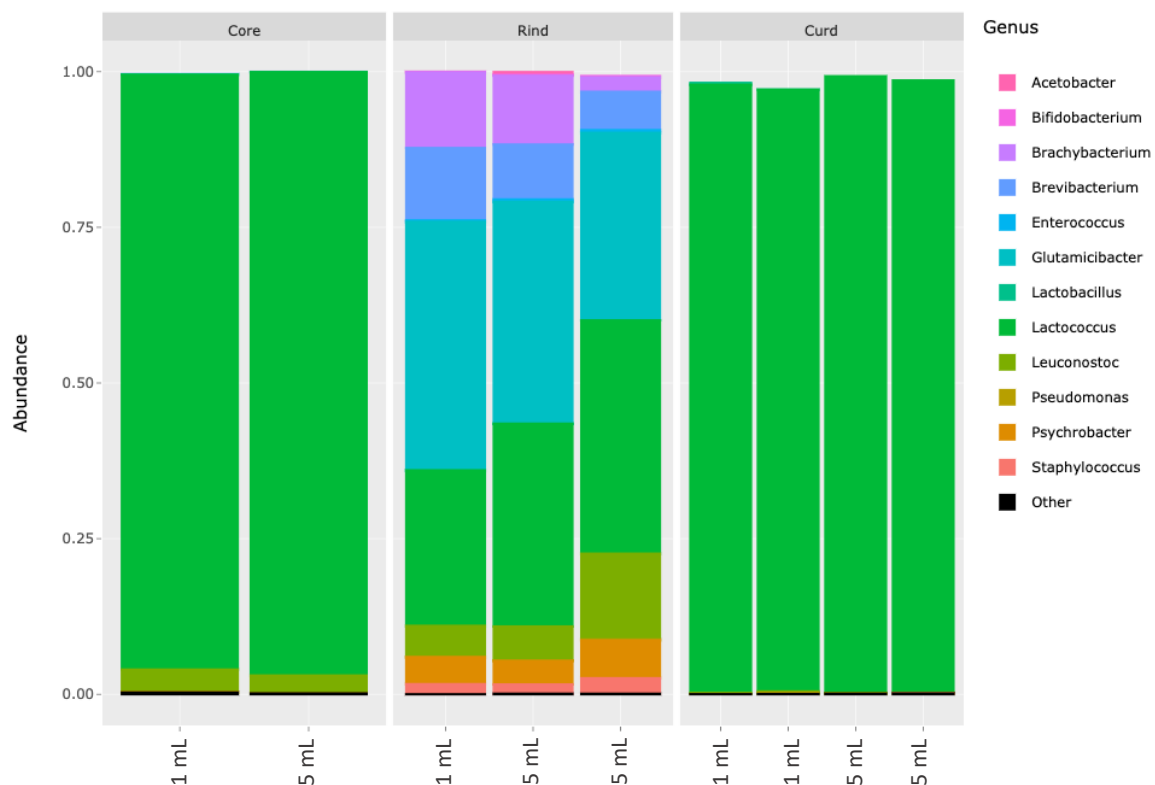
### Impact des paramètres sur les communautés bactériennes

Afin d'évaluer l'impact des différentes techniques testées, une analyse de la diversité alpha a été réalisée sur les différents échantillons et les différences évaluées par analyse de la variance (ANOVA).



**Figure 12. Représentation graphique des indices de diversité alpha (Richesse et Chao1) des communautés bactériennes d'échantillons de Pélardon en fonction de la prise d'essai pour l'extraction (1 mL ou 5 mL)**

Les indices de richesse (nombre d'OTUs par échantillon) et Chao1 ont été comparés entre échantillons (**Figure 12**). Les résultats ont ainsi montré qu'il n'y avait pas de différence statistique significative entre les indices de richesse des échantillons extraits à partir d'une prise d'essai de 5 mL ou de 1 mL ( $P = 0.97$ ). Toutefois, les différences observées et les écarts types s'expliquaient par le type d'échantillon (caillé Vs cœur Vs surface) ( $Pvalue = 0.016$ ) comme le laisse entrevoir les différences marquées de composition entre les différents échantillons (**Figure 13**).



**Figure 13. Composition des communautés bactériennes des échantillons de cœur, croûte et de caillé de Pélardon obtenus après amplification ciblée d'ADN microbien issu de prise d'essais de 1mL ou 5 mL (dilution initiale du fromage au 1/10e)**

### Impact des paramètres sur les communautés fongiques

Les résultats des tests d'analyse de la variance pour les différents indices et variables testées sont présentés en **Tableau 12**.

**Tableau 12. Résultats des tests d'Analyse de la Variance sur la diversité alpha des communautés fongiques des différents échantillons en fonction des paramètres d'extraction et d'amplification testés. Les Pvalue sont données pour les indices de Richesse et Chao1.**

Pvalue	Alpha diversité	
	Indice de Richesse	Indice Chao1
Variable		
Volume prise d'essai	0,105	0,09
Amorces	0,607	0,538
Type échantillon	0,906	0,85

Concernant les populations fongiques, le volume d'extraction n'influçait pas de manière significative les indices de richesse des différents échantillons, bien que les valeurs soient légèrement supérieures pour une prise d'essai de 1mL. Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les deux couples d'amorces utilisés. Par ailleurs, la diversité rencontrée dans les différents échantillons, quelle que soit leur nature (caillé, cœur, croûte), était assez faible avec une dominance de *G. candidum* aux deux stades étudiés.

### ▪ Conclusion

Que ce soit pour l'analyse des communautés fongiques ou bactériennes, les résultats n'ont pas révélé de différences significatives entre les deux volumes de prise d'essai testés. Pour des raisons pratiques, il a été décidé que les extractions pour la suite de l'étude seraient réalisées à partir d'une prise d'essai de 1 mL.

Concernant les amorces, les deux couples testés ne donnaient pas accès à une richesse significativement différente l'une de l'autre, ce qui peut notamment s'expliquer par la composition peu complexe des communautés fongiques aux stades pris comme exemples ici. Compte-tenu de ces résultats, il a été décidé de sélectionner le couple ITS3f/ITS4\_Kyo1 utilisé pour l'autre matrice étudiée dans ces travaux.

Au-delà de ces considérations techniques, ces pré-expériences ont permis d'avoir un aperçu des communautés fongiques et bactériennes à deux stades extrêmes et de mieux appréhender la future étude à cinq temps différents de la production.

---

# **Chapitre II - Étude de la diversité microbienne des olives de Nyons**

---





Ce second chapitre est consacré à la caractérisation de la diversité microbienne des olives de Nyons. Il comprend la présentation du produit ainsi deux études faisant chacune l'objet d'un article scientifique. La première étude se focalise sur la description de la diversité microbienne lors de la fermentation des olives et repose sur un suivi sur plus d'un an et demi de fermentations artisanales au sein de la coopérative Vignolis de Nyons. La seconde étude se focalise sur l'origine des micro-organismes impliqués dans la fermentation des olives de Nyons et de l'influence de l'environnement de production sur la fermentation dans cette même coopérative.

*(Des informations complémentaires sur la coopérative partenaire et la production des olives au sein de la coopérative sont apportées en **première partie I**)*

#### ▪ **Présentation du produit d'étude**

Comme évoqué en introduction bibliographique, les olives de table sont, pour la grande majorité, produites par fermentation naturelle. La fermentation est une étape essentielle pour rendre l'olive comestible et réduire son amertume naturelle *via* des phénomènes de diffusion en saumure et de dégradations microbienne et chimique. Cette fermentation, bien que naturelle, peut être précédée d'une étape de pré-désamérisation, et les paramètres de fermentation tels que la durée, la concentration en sel peuvent varier, tout comme la variété (au sens cultivar) d'olives. Toutes ces combinaisons expliquent la diversité et le grand nombre de types d'olives de table aux caractéristiques différentes existant aujourd'hui autour du bassin méditerranéen.

Les olives de Nyons sont produites de manière artisanale dans le sud de la France. D'un point de vue sensoriel, ces olives sont noires, légèrement marron, fondantes et caractérisées par des arômes floraux, de rose et de litchi. Ces olives bénéficient d'une AOP depuis 2000. Les principaux aspects de cette AOP définissent l'origine des olives, la variété (Tanche), leurs caractéristiques (taille minimale, couleur, ratio pulpe/noyau). Leur récolte s'effectue lorsqu'elles atteignent la pleine maturité en hiver sur une période restreinte (début décembre – mi-février) ; elles sont alors noires et ridées. Leur procédé de fabrication est dérivé de la méthode "à la grecque" et repose sur une fermentation spontanée des fruits frais directement submergés dans une saumure à 10% de sel.

Une particularité des olives de Nyons repose sur la concentration, assez élevée en sel, et la fermentation particulièrement longue, pouvant aller jusqu'à un an et demi.

## I. Présentation des olives de Nyons

*Ce document a été rédigé dans le cadre du projet PROMEDFOODS. Il a pour but de recenser, d'une part, les informations relatives aux caractéristiques et à la typicité du produit étudié et d'autre part, de décrire précisément le schéma de fabrication du produit étudié chez le producteur partenaire.*

### ▪ Description of the product

#### Nyons table olives characteristics

Nyons table olives, named after the city where they were originally prepared, are French naturally fermented black olives. They were first granted “Appellation d’origine Judiciaire” in 1968, later replaced in 1994 by the French “Controlled Origin Designation” status, and since 1997 by the Protected Designation of Origin (PDO) status.



**Figure 14. Nyons table olives**

Nyons olives specificity relies on the advanced maturity state when harvested in the winter and its natural fermentation since 1923. They are obtained by a slow fermentation in brine or in dry salt during which time it acquires its distinctive aromas and characteristic aspect. These characteristics are precisely established by the PDO specification and the olives must also comply with the general criteria of the “French Code of fair practice for table olives”.

**Tableau 13. Nyons table olive characteristics based on the PDO specification and the “French Code of fair practice for table olives”**

Characteristic/property	Targeted descriptors/indicators
Fruit size	At least 14 mm long ; no visible defect at harvest or after fermentation
Visual aspect	Black, slightly wrinkled at the harvest ; dark brown “monk habit” colour after fermentation
Texture	Firm texture ; delicate flesh
Flavours, smell	Salty, no bitterness ; fruity and flowerly aromas (rose, lychee, truffle and prune)

## Production area

Geographical production and transformation areas are determined by the PDO specifications and follow the parcels where the Tanche variety is grown. Agricultural practices are also regulated such as plantation density, irrigation, pruning frequency etc.



**Figure 15. Production area of Tanche cultivar growth and Nyons table olive production**

The olives are currently harvested in 53 municipalities located in the Drôme and Vaucluse departments and corresponds to approximately 1000 hectares of land (Figure 15). Compared to other olive productions, these areas are further north thus exposing the fruits to frost. However, they are also characterized by adequate sun exposure, moderate winds and dryness. This set of climatic conditions allow olive fruits to reach the desired and typical wrinkled aspect without falling off the tree before harvest.

## Consumption & place in the local culture

Nyons table olives are also called the “Black pearl of the Nyonsais area” underlining its place in the local culture. As another example, a festival “Les Olivades” dedicated to table olives takes place every year on the 20<sup>th</sup> of July to promote these olives.

The granting of the PDO status allowed olive oil and olive production in Nyons and its surrounding areas to be restored. Today, Nyons table olives are consumed first and foremost locally mainly during the warmer months and summer (May-October) as an appetizer but can also be found all over France in gourmet and health food shops. International export remains limited.

- **Local partner : Vignolis cooperative**

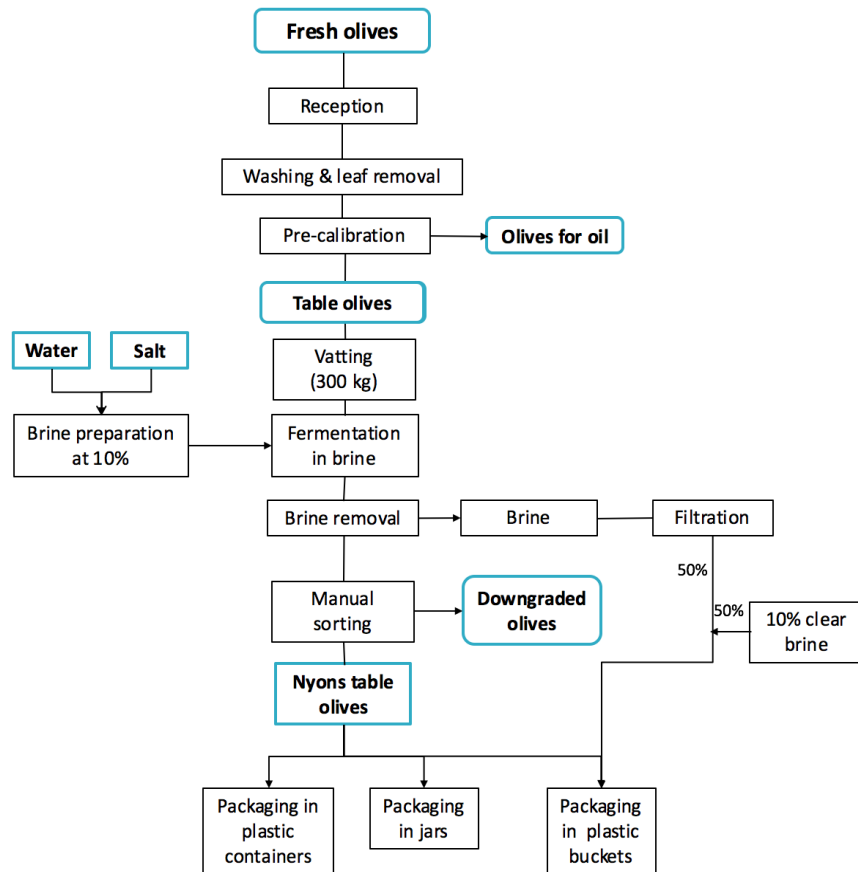
The cooperative Vignolis is based in Nyons and was founded in 1923. Its activity is divided in four sectors: fruits, wine, oil, table olives under the brand Nyonsolive®. Table olive production is currently supervised by Mme Anne Laurent (Head of the cooperative) and Mr. Noël Levathu (Head of olive and oil production). The cooperative regroups 800 members and employs 7 people for the olive sector. For the harvest 2015/2016, 275 tons of Nyons table olives were produced out of the 1300 tons harvested. Approximately 100 tons were sold for a turnover of 800 k€. Regarding these sales, 50% of the sales were performed directly via the factory shop or through the cooperative website. The remaining was sold locally in supermarkets, gourmet shops or exported elsewhere in France (less than 5% of the sales). Table olives sold by Vignolis are prepared in accordance with the PDO requirements using three different methods: olives pricked in salt (“*olives piquées au sel*”), olives in dry salt (“*olives au naturel*”) and olives fermented directly in brine (“*olives en saumure*”). The latter is the main way of preparation in the cooperative and was thus chosen as the object of our study.

- **Production process**

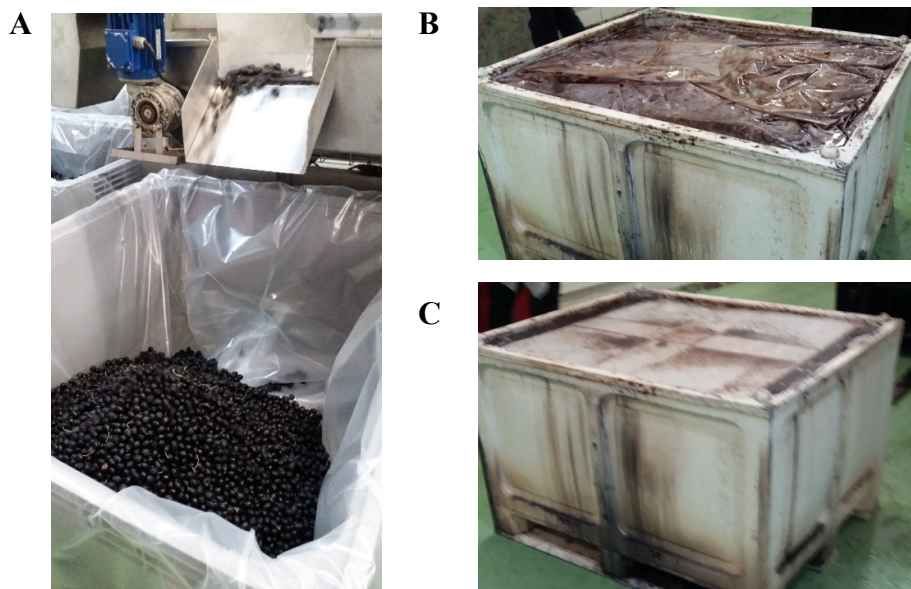
### **Preparation process**

Nyons table olives preparation is subject to strict requirements in relation with its PDO status. (Figure 16).

Olives are harvested by the olive growers and directly delivered to the cooperative. Organically and conventionally cultivated olives are processed separately. Upon reception, a first sorting step is operated to separate the olives destined for fermentation from the ones used for oil production. After another mechanical calibration step, 300kg selected olives are placed in vats (whose sidewalls are covered with a plastic sheet) and immersed in 10% clear brine. The vat is then covered with the plastic sheet then with a heavy cover plate to limit the air layer and thus the development of molds (Figure 17)



**Figure 16. Preparation of Nyons table olives in Vignolis cooperative**



**Figure 17. Fermentation vats preparation at Vignolis cooperative. (A) Vats are filled with 300kg of sorted olives - (B) Olives are submerged in a 10% salt brine - (C) Vats are covered with a heavy lid on top.**

The fermentation of the olives relies on the autochthonous micro-organisms encountered. As of today, no starter culture nor additives of any kind can be added to enhance the process or the flavours. The fermentation step is primordial and essential for the production of Nyons table olives: debittering, stabilization and conservation. A balance in microorganisms presence must be reached to obtain the typical Nyons table olives characteristics. The end of fermentation is assessed according to organoleptic criteria and measurements of the brine pH. The olives are packaged using three ways: in plastic containers, in jars or in buckets. For this last type of packaging, the olives are conserved in brine composed for 50% of clear brine and 50% of filtered brine. This method allows for better storage conditions and prevents olive discoloration. The olives can be stored up to 12 months without risk whereas for the olives in plastic containers, the shelf-life is 8 months in a cool environment.

### Quality & encountered defects

Table olives are subject to the microbiological criteria of EU regulation N° 2073/2005, reiterated in the Code of fair practice for table olives (**Tableau 14**).

**Tableau 14. Microbiological criteria for table olives according to UE regulation and the Code of faire practices for table olives**

Micro-organism	Nature	criteria	Modalities
<i>Salmonella</i>	Obligatory	Absence in 25g	M=m n= 5 c=0
Coagulase-positive <i>Staphylococci</i>	Obligatory	m = 10 <sup>2</sup> CFU/g	M = 10 <sup>3</sup> CFU/g ; n= 5 ; c= 2
<i>Escherichia coli</i>	Obligatory	m = 10 <sup>2</sup> CFU/g	M = 10 <sup>3</sup> CFU/g ; n= 5 ; c= 2
Aerobic microorganisms at 30°C	Indicative	m = 5.10 <sup>6</sup> CFU/g	M = 5.10 <sup>7</sup> CFU/g ; n= 5 ; c= 2
Yeasts	Indicative	m = 1.10 <sup>6</sup> CFU/g	M = 1.10 <sup>7</sup> CFU/g ; n= 5 ; c= 2
Molds	Indicative	m = 1.10 <sup>3</sup> CFU/g	M = 1.10 <sup>4</sup> CFU/g ; n= 5 ; c= 2

The spontaneous fermentation is responsible for the characteristics of Nyons table olives but can also cause variations in the quality of the olive organoleptic properties. According to the producers, these differences are linked to productions from different harvests from one year to another rather than the different batches.

Overall, food losses affect a very small portion of the production. Olives which do not comply with the quality requirements are used for the oil production (in the beginning of the process)

or downgraded (20% of the 2017 production) to other applications such as tapenade preparation or as table olives labelled without the PDO status. Some quality defects of microbial origin are however encountered, the most frequent being the formation of gas pockets under the olive skin. This has been related in the past to excessive fermentative yeasts growth leading to the high production of CO<sub>2</sub> that may enter the olives flesh.

#### ▪ **Conclusion**

Nyons table olives are locally well-known and are actively promoted by the cooperative. Currently, one major concern for the producers is the length of the fermentation time. It seems to increase through the years and as a consequence, there is a growing number of vats undergoing fermentation. It results in storage difficulties and may limit the production development.

As previously stated, the fermentation relies on the natural microbial populations present and the initial microbial charge determines the conduct and speed of the process. Thus, a better comprehension of the microbial dynamics could be of great interest for the cooperative. In the end, selection of autochthonous strains that enhance the fermentation process and overall product quality might also be of interest in the future despite the current PDO requirements specifying no starter cultures are used.



## **II. Étude 1 - caractérisation de la diversité microbienne des olives de Nyons**

### **▪ Objectif de l'étude**

L'objectif de cette première étude est de caractériser les dynamiques bactériennes et fongiques au cours de la fermentation spontanée des olives de Nyons et d'en identifier les principaux acteurs microbiens en lien avec l'évolution des caractéristiques biochimiques des olives.

### **▪ Stratégie expérimentale**

Afin d'évaluer les potentielles différences inhérentes aux caractéristiques des olives fraîches, deux périodes de récolte et deux types d'olives (biologiques et conventionnelles) ont été étudiées au cours de la récolte 2017-2018. Douze cuves de fermentation (correspondant aux deux périodes de récoltes, aux deux types d'olives et aux triplicats biologiques) préparées selon la manière traditionnelle de la coopérative, ont ainsi été suivies entre janvier 2018 et mai 2019.

Sur cette période, pour chaque cuve, 9 prélèvements ont été réalisés (jours 1, 8, 21, 42, 64, 120, 183, 267, 482) et soumis à des analyses microbiennes en associant, comme pour le Pélardon, approches culture-dépendante et culture-indépendante par analyse métagénomique. Cette analyse a fait l'objet de travaux de validation de l'extraction et des amorces choisies en amont (**annexe 1**). En parallèle, des analyses biochimiques (acides organiques, composés phénoliques, composés volatils) ont été réalisées dans le but de corrélérer les dynamiques microbiennes observées avec les changements des caractéristiques des olives au cours de la fermentation.

**Ces travaux ont fait l'objet de l'article 2 (publié) présenté en partie III du présent chapitre et dont les résultats majeurs sont rapportés ci-après.**

### **▪ Diversité des communautés microbiennes par approche polyphasique**

Les différentes fermentations suivies par les approches culture-dépendante et -indépendante ont révélé une dominance des communautés fongiques, mais aussi des dynamiques marquées entre les différents stades de fermentation. Les populations fongiques des fruits frais étaient dominées par des levures et champignons filamenteux communément

retrouvés sur les plantes et dans le sol. Ces espèces disparaissaient au cours de la première semaine de fermentation et à partir du 8<sup>ème</sup> jour, cinq espèces se succédaient ou co-donnaient dans toutes les fermentations indépendamment de la période de récolte ou du type d'olive et suivant un ordre précis : *Wickerhamomyces anomalus*, *Citeromyces nyonsensis*, *Zygorulaspora mrakii*, *Pichia membranifaciens* et *Candida boidinii*.

A l'inverse, les populations bactériennes étaient très faibles et la diversité réduite à deux espèces dès la 3<sup>e</sup> semaine de fermentation (21<sup>e</sup> jour) : *Celerinatantimonas diazotrophica* et *Marinobacterium litorale*. Un point majeur est que cette première bactérie, qui représentait jusqu'à 99 % des communautés bactériennes analysées par métagénomique, n'a pas été détectée par analyse culture-dépendante et sa population n'a pas pu être quantifiée, ce qui expliquerait les faibles niveaux de populations bactériennes rencontrés. En effet, les milieux de cultures choisis ciblaient les grands groupes microbiens (LAB, levures) et étaient sans doute peu adaptés à cette bactérie diazotrophe, capable par ailleurs de fermenter de nombreux substrats. De plus, l'analyse préliminaire phylogénétique réalisée sur la base des séquences V3-V4 représentatives des OTUs affiliées à cette espèce, a montré qu'elles formaient un clade séparé des souches types présentes dans les bases de données (**Annexe 2**), ce qui signifie qu'il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce ou sous-espèce du genre *Celerinantimonas*. Des tentatives d'isolement, *a posteriori* des suivis, ont été menées mais sans succès à ce jour. Par ailleurs et de manière tout à fait intéressante, les bactéries lactiques (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus plantarum*), très souvent impliquées dans les fermentations d'olives de table n'ont été détectées qu'au début de la fermentation, comme populations sous-dominantes et n'ont pas persisté par la suite.

- Analyse de corrélation et contribution des espèces des communautés microbiennes aux composés d'arômes des olives de Nyons

Les analyses biochimiques réalisées à différents stades ont mis en évidence des changements importants au cours de la fermentation. La quantification de composés phénoliques, et en particulier de l'oleuropéine (principal composé responsable de l'amertume de l'olive), a montré une dégradation lente du composé. Par ailleurs, les acides citrique, acétique et lactique ont été retrouvés à très haute concentration (> 1 g/L) dans la saumure et augmentaient tout au long de la fermentation. Enfin, 62 composés volatils ont montré des abondances significativement différentes au cours de la fermentation des olives.

Ces changements biochimiques ont été corrélés (Spearman) aux abondances microbiennes obtenues par analyse culture-indépendante (metabarcoding) et ont mis en évidence de fortes corrélations positives entre certains micro-organismes et composés. *C. diazotrophica* était ainsi corrélée aux acides lactique, malique et acétique dans la saumure.

Concernant les communautés de levures, la fermentation peut être divisée en 4 phases sur la base des corrélations positives et des dominances observées. La première phase correspond à la disparition des champignons et bactéries des olives. La seconde phase (21<sup>e</sup> jour-120<sup>e</sup> jour) est dominée par *W. anomalus* et *C. nyonsensis*, associée à la production d'acide malique et à la baisse de pH. La troisième phase (120<sup>e</sup> jour -183<sup>e</sup> jour) est caractérisée par une augmentation de la plupart des acides et les plus fortes abondances de certains composés volatils (2-phényléthanol, méthylpropanoate et esters d'octanoate) et de fortes corrélations étaient observées entre *Z. mrakii*, *P. membranifaciens* et *C. boidinii*. Enfin la dernière phase (267<sup>e</sup> et 482<sup>e</sup> jours) est caractérisée par la dominance de *P. membranifaciens* et *C. boidinii* ; ces deux espèces ont montré le plus grand nombre de corrélations positives avec certains composés volatils parmi lesquels des alcools supérieurs (phénylméthanol), des acides (acide acétique) et des esters (propanoate d'éthyle, 2-méthylbutanoate d'éthyle).

- Impact de la période de récolte et des pratiques agricoles

Aucune différence majeure n'a été observée selon la récolte ou le type d'olives au niveau des populations microbiennes. Au niveau des profils biochimiques et notamment des composés volatils, des abondances plus fortes étaient ponctuellement observées pour certains composés comme l'acide lactique dans les fermentations d'olives de récolte tardive, ou pour certains composés volatils comme les aldéhydes. Toutefois, aucun de ces composés n'a pu être relié à un micro-organisme en particulier et il est donc probable que ces différences soient liées aux différences de composition des fruits frais ou aux interactions entre micro-organismes.

- **Conclusion à l'issue de l'étude 1**

L'étude réalisée a mis en évidence de manière très complète les dynamiques microbiennes et caractéristiques biochimiques régissant la fermentation des olives de Nyons. La flore microbienne des olives de Nyons se caractérise par une forte diversité fongique avec cinq espèces dominantes (qui forment le *core* microbiote) et une communauté bactérienne plus réduite. Cependant, une bactérie *C. diazotrophica* uniquement identifiée par analyse culture-indépendante dominait la fermentation et pourrait jouer un rôle dans cette fermentation. D'un

point de vue biochimique, la fermentation des olives de Nyons est caractérisée par une dégradation lente de l'oleuropéine, ce qui explique la longueur de la fermentation, nécessaire pour que l'amertume disparaisse. Le rôle des micro-organismes dans cette dégradation reste à éclaircir. Enfin, l'analyse de corrélation a permis d'établir que les levures jouaient un rôle prépondérant dans la fermentation des olives de Nyons et certaines espèces ont pu être corrélées à de nombreux composés d'arômes. Cette étude apporte les premiers éléments pour mieux comprendre le rôle et la contribution des micro-organismes. Des expériences futures seront nécessaires pour bien confirmer ou non ces corrélations et ainsi bien déterminer le rôle fonctionnel des espèces d'importance dans cette fermentation et/ou leurs interactions. A travers l'analyse culture-dépendante, une collection de levures autochtones (n=867) a pu être créée afin de préserver cette biodiversité à long terme. Cette collection servira de support pour mieux caractériser le rôle des micro-organismes. Cet aspect ainsi que l'exploitation de ces micro-organismes fait l'objet du **chapitre IV** de la thèse.

### **III. Article publié dans *Frontiers in microbiology***

**Penland M.,** Deutsch S., Falentin H., Pawtowski A., Visentin G., Poirier E., Le Meur C., Maillard M., Thierry A., Mounier J. and Coton M. (2020). Deciphering microbial community dynamics and biochemical changes during Nyons black olive natural fermentations. *Published in Frontiers in Microbiology*)



# Deciphering Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black Olive Natural Fermentations

Marine Penland<sup>1,2</sup>, Stéphanie-Marie Deutsch<sup>2</sup>, Hélène Falentin<sup>2</sup>, Audrey Pawtowski<sup>1</sup>, Elisabeth Poirier<sup>1</sup>, Giorgia Visenti<sup>1</sup>, Christophe Le Meur<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Anne Thierry<sup>2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup> and Monika Coton<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, Plouzané, France, <sup>2</sup> STLO, INRAE, Institut Agro, Rennes, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Vittorio Capozzi,  
Italian National Research Council, Italy

### Reviewed by:

Francisco Noé Arroyo López,  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC), Spain  
Antonio Bevilacqua,  
University of Foggia, Italy

### \*Correspondence:

Monika Coton  
monika.coton@univ-brest.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Food Microbiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 23 July 2020

Accepted: 02 September 2020

Published: 08 October 2020

### Citation:

Penland M, Deutsch S-M, Falentin H, Pawtowski A, Poirier E, Visenti G, Le Meur C, Maillard M-B, Thierry A, Mounier J and Coton M (2020) Deciphering Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black Olive Natural Fermentations. *Front. Microbiol.* 11:586614. doi: 10.3389/fmicb.2020.586614

French PDO Nyons black table olives are produced according to a traditional slow spontaneous fermentation in brine. The manufacture and unique sensorial properties of these olives thus only rely on the autochthonous complex microbiota. This study aimed at unraveling the microbial communities and dynamics of Nyons olives during a 1.5-year-long spontaneous fermentation to determine the main microbial drivers and link microbial species to key metabolites. Fermentations were monitored at a local producer plant at regular time intervals for two harvests and two olive types (organically and conventionally grown) using culture-dependent and metabarcoding (ITS2 for fungi, V3-V4 region for bacteria) approaches. Olives and brines were also sampled for volatiles, organic acids and phenolic compounds. No major differences in microbiota composition were observed according to olive type or harvest period. Throughout the fermentation, yeasts were clearly the most dominant. ITS2 sequencing data revealed complex fungal diversity dominated by *Citeromyces nyonsensis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Zygorhizula* *mrakii*, *Candida boidinii* and *Pichia membranifaciens* species. Bacterial communities were dominated by the *Celerinatantimonas* genus, while lactic acid bacteria remained scarce. Clear shifts in microbial communities and biochemical profiles were observed during fermentation and, by correlating metabolites and microbiota changes, four different phases were distinguished. During the first 7 days, phase I, a fast decrease of filamentous fungal and bacterial populations was observed. Between days 21 and 120, phase II, *W. anomalus* and *C. nyonsensis* for fungi and *Celerinatantimonas diazotrophica* for bacteria dominated the fermentation and were linked to the pH decrease and citric acid production. Phase III, between 120 and 183 days, was characterized by an increase in acids and esters and correlated to increased abundances of *Z. mrakii*, *P. membranifaciens* and *C. boidinii*. During the last months of fermentation, phase IV, microbial communities were dominated by *P. membranifaciens*

and *C. boidinii*. Both species were strongly correlated to an increase in fruity esters and alcohol abundances. Overall, this study provides an in-depth understanding about microbial species succession and how the microbiota shapes the final distinct olive characteristics. It also constitutes a first step to identify key drivers of this fermentation.

**Keywords:** microbial dynamics and diversity, volatiles, metabarcoding, phenolic compounds, spontaneous fermentation

## INTRODUCTION

Table olives are among the most consumed fermented vegetables with 2.57 million tons in 2019 (International Olive Council, 2019). They originate from the Mediterranean area and are produced and consumed worldwide. Table olives are appreciated by consumers for their characteristic taste and pleasant aromas. Moreover, many health and nutritional benefits have been reported as they are rich in polyunsaturated fatty acids and polyphenols (Conte et al., 2020).

Initially, a fermentation step was mandatory to reduce the natural bitterness of the fruits and make them edible. Different preparation methods have been reported depending on traditional know-how, olive variety and maturity, although three main methods are used nowadays (Romeo, 2012). For Spanish-style green olives, debittering is performed in 1.6–2.3% lye depending on the variety and harvest time prior to fermentation in 6–8% salt brine. The Californian-style olive preparation includes lye treatment after brining and fruit darkening by chemical or heat treatment. Finally, for Greek-style black olives, the debittering process occurs during natural fermentations in brine with a 6–10% salt concentration.

Regardless of the method, fermentation is carried out by diversified, often autochthonous, microbial communities. Lactic acid bacteria and yeasts, naturally present on olives, are considered to be the main drivers of the process and produce diverse organic acids among other metabolites (Randazzo et al., 2017). Different studies have described the microbial diversity encountered in some olive fermentations, especially for Spanish- and Greek-style olives from *Manzanilla* and *Alorena de Malaga* varieties. The most frequently described genera are *Lactiplantibacillus* (ex-*Lactobacillus*) and *Leuconostoc* for bacteria and *Pichia*, *Candida*, *Wickerhamomyces* and *Saccharomyces* for yeasts (Hurtado et al., 2012; Heperkan, 2013). In addition, intensive studies on the microbial diversity encountered in different varieties have been conducted and revealed that the indigenous microbiota was strongly influenced by olive cultivar and maturity (Hurtado et al., 2009) and preparation parameters, such as temperature and salt concentration. This directly impacts table olive characteristics as microbial communities also induce chemical changes in olives. Thus, olive flavor is closely related to qualitative and quantitative volatile and non-volatile acids (Panagou and Tassou, 2006). In spite of this, few studies have investigated the volatile profile of fermented olives and the relation to microbial communities throughout the fermentation process except for green olive fermentations.

Nyons table olives are distinct for many reasons. It is one of the table olive types granted PDO in southern France. They are well-known for their dark brown color, their melting texture and typical flowery aromas. The traditional fermentation process follows specific requirements: Tanche variety olives must be harvested at full maturity during the winter season (mid-December to early February) and directly submerged in brine where they undergo spontaneous fermentation without microbial adjuncts. From a technical perspective, one specific and interesting aspect of this process is that fermentation can last up to 1.5 years. Current knowledge about the microbial diversity of Nyons table olives is limited to yeast diversity and dynamics, as assessed by a culture-dependent approach (Coton et al., 2006). The data obtained from this study revealed rich yeast diversity and led to the identification of two new species, *Citeromyces nyonsensis* (Casaregola et al., 2013) and *Saccharomycopsis olivae* (Jacques et al., 2014), however, bacterial communities and detailed microbial dynamics were not described.

Thus, the objective of this study was to unravel the microbial dynamics during natural olive fermentations, using conventionally and organically grown Nyons olives, and to determine to what extent they contribute to the final product characteristics. For this purpose, the strategy was to (i) identify the microorganisms involved in Nyons table olive fermentations and understand their dynamics by culture-dependent and metabarcoding analyses, (ii) assess the impact of olive maturity and cultivation practices (organic or conventional olives) on the fermentation process and (iii) investigate changes in the biochemical profile during fermentation to better understand the link between microorganisms and organoleptic characteristics of these olives.

## MATERIALS AND METHODS

### Olive Fermentation Preparation and Sampling

Samples were obtained from PDO Nyons table olive fermentations directly from the Vignolis cooperative located in Nyons, France. Four different fermentations were monitored over a 1.5-year period between January 2018 and May 2019. First, to investigate the impact of olive fruit maturity on fermentation, two harvests were studied: one harvest started in early January (R1) while the second harvest was in late January (R2). Secondly, to investigate the impact of agricultural practices on the fermentation process, both organic and conventional olives

were separately used for both harvests. For each fermentation condition, named R1-Orga, R1-Conv, R2-Orga and R2-Conv, three independent fermentation tanks were prepared for each condition using the same olive batch (biological replicates). Tanks were prepared at the cooperative facilities and according to the traditional PDO process as follows: 300 kg of freshly harvested and lightly water washed olives were submerged in 200 L of cover brine (10% salt) and then sealed with a heavy lid to limit the air layer. Then, tanks were left untouched, except for sampling, during fermentation in the cooperative storage area and at room temperature ( $<18^{\circ}\text{C}$ ). Brine and olive samples were taken at days 1 (fresh fruits), 8, 21, 42, 64, 120, 183, 267, and  $\sim 480$  (endpoint), stored between 12 and  $16^{\circ}\text{C}$ , and processed within 24 h.

## Microbial Counts During Nyons Olive Fermentations

Microbial populations of interest were monitored during fermentation for each tank. Brine and olive fruits were treated together in a 1:1 ratio (w/w): 12.5 g of olive flesh and 12.5 mL of brine were mixed with 225 mL buffered peptone water and blended with a stomacher for 3 min at high speed. Serial dilutions were prepared in Tryptone Salt diluent (TS; sodium chloride 8.5 g/L, tryptone 1 g/L) and plated on seven different media to enumerate: total fungal populations (Yeast extract Glucose Chloramphenicol medium (YGC,  $25^{\circ}\text{C}$ , 5 days), halotolerant fungi (YGC+5 % NaCl,  $25^{\circ}\text{C}$ , 5 days), total microbial populations on Plate Count Agar (PCA,  $30^{\circ}\text{C}$ , 72 h), halotolerant microbial populations on PCA+5% NaCl ( $30^{\circ}\text{C}$ , 72 h), enterobacteria on Violet Red Bile Glucose agar (VRBG,  $30^{\circ}\text{C}$ , 48 h), lactic acid bacteria (LAB) on de Man Rogosa Sharpe agar (MRS+0.01% cycloheximide to prevent fungal growth,  $30^{\circ}\text{C}$ , 48 h; anaerobiosis) and halotolerant LAB on MRS+5% NaCl + 0.01% cycloheximide ( $30^{\circ}\text{C}$ , 48 h; anaerobiosis). Enumeration results were subjected to ANOVA analysis and Tukey's test for mean comparison ( $P < 0.05$ ).

Hygiene and safety quality of the olives was assessed in compliance with EU Regulation n°2073/2005. *Escherichia coli* (TBX,  $42^{\circ}\text{C}$ , 24 h) and coagulase-positive staphylococci (Baird Parker supplemented with Rabbit Plasma Fibrinogen,  $37^{\circ}\text{C}$ , 48 h) were enumerated while *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. absence in 25 g was checked for, following ISO 11290-1:2017 and ISO 6579-1:2017 guidelines, respectively.

## Isolation and Identification of Microorganisms

Microorganisms of interest were isolated from three media: halotolerant fungi from YGC+5% salt, halotolerant bacteria from PCA+5% salt and LAB from MRS+5% salt supplemented with 0.01% cycloheximide. For each biological replicate (individual tanks) and media, 20 representative clones (when possible) were isolated from the dilution showing the highest morphological diversity and cryopreserved in 15% (bacteria) or 20% (fungi) (v/v) glycerol at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A total of 867 yeasts, 16 filamentous fungi and 102 bacteria were collected. A dereplication step was

performed for all yeast isolates using Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy (FTIR) as described by Coton et al. (2017). FTIR spectrum of each isolate was first compared against an internal dataset of more than 2500 FTIR spectra of reference yeasts to obtain a presumptive identification and secondly against one another to build clusters based on their heterogeneity. Overall, 370 representative fungal isolates (1–5 isolates per cluster) were then chosen and identified by sequencing. Species-level molecular identifications for representative yeast isolates were done after amplification and sequencing of the D1-D2 domain using NL1/NL4 primer pair (Kurtzman and Robnett, 1997) (primer sequences are available in **Supplementary Table 1**) while all filamentous fungi isolates were identified by targeting the internal transcribed spacer (ITS) region using ITS4/ITS5 primers (White et al., 1990). All bacterial isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing after amplification with fD1 and rP2 primers (Weisburg et al., 1991).

Sequences were assembled into contigs using Geneious software<sup>1</sup> (Kearse et al., 2012) and compared with the GenBank database using the “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST)<sup>2</sup> and applying a 97% identity and 98% coverage threshold for species identifications. The obtained genus- or species-level identifications of yeasts were then confronted with FTIR dendrogram analyses. When identifications were consistent inside a given cluster, the identification was expanded to all the isolates within the cluster.

## Metabarcoding Analysis on Olive Fruits and Brine During Fermentation

### Sample Preparation and Total DNA Extraction

Metabarcoding analysis was performed for all sampling points on brine and olive fruits ( $n = 216$  samples) separately. Brine samples (5 mL) were centrifuged at 9,000 g for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the obtained pellets were washed in TS diluent before storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Regarding olive samples, 10 g of olive surface pulp were collected and ground with 40 mL of TS diluent using an Ultra-turrax homogenizer (T25, Ika Works Inc., United States). Then, the mix was further homogenized for 1 min in a Stomacher Bag® (Interscience, St-Nom, France). Aliquots of 5 mL were then centrifuged (600 g, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). The supernatants were recovered and centrifuged (9,000 g, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) to obtain cell pellets which were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until DNA extraction. Total DNA extractions and purifications were performed using NucleoSpin Soil DNA kit (Macherey-Nagel, Germany) with a supplementary initial enzymatic lysis. First, pellets were thawed at room temperature and immediately resuspended in 400  $\mu\text{L}$  of lysis buffer (Tris-HCl 20 mM at pH 8.0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1.2%) supplemented with lysozyme (20 mg/mL) and mutanolysin (5 U/ $\mu\text{L}$ ), then RNase A (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Qiagen, Germany) and lyticase (0.5 U/ $\mu\text{L}$ ; Sigma-Aldrich, Germany) were added. Samples were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for up to 2 h followed by a mechanical lysis step in NucleoSpin® Bead Tubes Type A using a Retsch MM400 mixer mill. Then, proteinase K (20 mg/mL) was added to each sample, followed by incubation

<sup>1</sup><http://www.geneious.com>

<sup>2</sup><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>



for 1 h at 56°C. The rest of the extraction and purification was performed according to the kit manufacturer's instructions and DNA extracts were stored at -20°C.

### Amplification and Sequencing Parameters

To study bacterial and fungal diversity, DNA extracts were amplified by PCR using universal primers. For bacteria, the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was targeted using S-D-bact-0341-b-S-17 and S-D-BAct-0785-a-A-21 primers and the PCR conditions described by Klindworth et al. (2013). For fungi, ITS3f/ITS4\_Kyo1 primers targeting the ITS2 region were used according to the PCR conditions described by Toju et al. (2012). ITS2 and V3-V4 16S rRNA amplicons were sequenced at GATC sequencing platform (Eurofins, Germany) using Illumina Miseq PE300 technology generating 2 × 300 bp reads and a total of 4.8 and 4.4 Gb of data for bacterial and fungal amplicons, respectively.

### Bioinformatics

Sequences were pre-processed for quality and length using the following parameters: amplicon size between 370 and 490 bp for V3-V4 contigs and 100–530 bp for ITS2 contigs, mismatch rate was set at 0.1 and sequences with NNN were filtered out for both data types. Sequencing data were then analyzed using the FROGS pipelines as developed by Escudié et al. (2018) under Galaxy (Afgan et al., 2018). Briefly, raw paired-end reads were assembled and sequences were clustered using the Swarm algorithm (Mahé et al., 2015) with an aggregation distance of 3 into Operational Taxonomic Units (OTUs). Sequences underwent some filtering steps: chimeras were detected using Uparse (Edgar, 2013) and “de novo parameter” and removed, then sequences with a relative abundance below  $5 \times 10^{-5}$  or present in only one sample were excluded. For ITS2 data, ITSx was used prior to affiliation to extract and select ITS2 sequences (Bengtsson-Palme et al., 2013). Finally, affiliation step was performed using SILVA (V138) and UNITE 8.2 fungi databases for 16S and ITS2 data, respectively. When species identification by blastn+ and identification was below 97%, affiliation was manually corrected to the genus. In the same manner, when sequences were multi-affiliated by FROGS, because the targeted V3-V4 region or ITS2 were unable to discriminate species, the resulting species level assignments were implemented into the final OTU table. OTUs affiliated to chloroplasts or mitochondrial sequences in the 16S data set were excluded.

### Biodiversity and Statistical Analyses

Processing and statistical analyses of microbial communities were performed using Phyloseq package (McMurdie and Holmes, 2013) under R software. For alpha and beta-diversity analyses, data were first normalized based on the sample that had the lowest number of sequences. Taxonomic composition and abundance distribution were then determined and alpha-diversity indexes (Chao1 and Shannon) calculated. Kruskal-Wallis test was used to compare values according to four variables: matrix, harvest period, olive type and fermentation stage. When differences were significant ( $P < 0.05$ ), the Wilcoxon test was performed to explore differences within the variable.

To analyze beta-diversity, unweighted Unifrac and weighted Unifrac distances were calculated. Principal Coordinate Analysis (PCoA) and Adonis test (999 permutations) in R vegan package (Oksanen et al., 2013), were then used to assess the impact of the same four variables than for alpha-diversity. Moreover, OTU abundance difference analysis under the same four variables was performed on the non-rarefied OTU count table using Deseq2 package (Love et al., 2014; McMurdie and Holmes, 2014; Safari et al., 2020). Differences were expressed as log2 fold changes and their significance levels were tested using Wald test followed by Benjamini-Hochberg False Discovery Rate correction with alpha value set at 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995). Taxonomic composition visualization for bacterial communities were obtained using Krona hierarchical data browser (Ondov et al., 2011) and ggplot2 package (Wickham, 2016).

## Biochemical Analyses

### Brine pH Measurements

Brine samples from each sampling point were analyzed for pH using a pH meter (Hanna Instruments HI 2020-02). Three independent measures were done for the four fermentations. The reported values are the average of three replicates per sampling point and condition.

### Detection and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Fruits

Oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol were identified and quantified in olive fruits by HPLC-Diode Array Detector. Extractions were performed from 2 g of olive pulp in DMSO as described by Crawford et al. (2018) except that extracts were not diluted in water before injecting. Analyses were performed on a HPLC Agilent 1100 series (Agilent technologies, Santa Clara, CA, United States) equipped with a Luna C18(2) column (5 μm, 4.6 mm × 150 mm) (Phenomenex Inc., Australia) and a diode-array detector (280 nm). All injection, elution and detection parameters were set as described by Crawford et al. (2018). For quantification, a standard mix of the three phenolic compounds at 1 mg/mL was prepared in methanol and the linear range built by injecting dilutions ranging from 0.1 to 100 μg/mL in duplicate. A 10 μg/mL dilution was used as quality control and injected regularly during analysis. Quantitative results were subjected to ANOVA analysis and Tukey's test for mean comparison ( $P < 0.05$ ).

### Organic Acid Quantification in Brine During Fermentation

#### Sample preparation

Eight organic acids were quantified in brines throughout fermentation. For each sample, 2 mL of brine were filtered on 0.45-μm cellulose acetate membrane and subjected to LC-MS and HPLC analyses by direct injection in the columns.

#### LC-MS analyses

Detection and quantification of four organic acids (gluconic, glucuronic, malic and succinic acids) were performed on a 1260 Infinity binary HPLC and a 6530 Accurate Mass LC-QToF-MS (Agilent Technologies). Compound separation was performed

on a Rezex ROA-Organic acid column (150 mm × 4.6 mm) (Phenomenex Inc., Australia) and the mass spectrometer operated in negative electrospray ionization mode. Analyses were performed under the following conditions: injection volume 5  $\mu$ L, flow at 0.3 mL/min, isocratic elution in H<sub>2</sub>O + 0.1 % formic acid and 15 min run time. Identification and quantification were achieved using standard solutions of the four organic acids mixed at concentrations ranging from 0 to 1 mg/mL. To determine the matrix effect, standards solutions were prepared in H<sub>2</sub>O + 0.1 % formic acid and in H<sub>2</sub>O + 5% NaCl to mimic brine and injected in triplicates for each concentration. As salt presence had a negative impact on the analyte response, only standard mixes prepared in salt (matrix matched calibration curve) were kept to build the linear range used for quantification. Furthermore, to ensure quantification, a standard mix at 20  $\mu$ g/mL was used as a quality control sample and injected regularly during the analyses. For each compound, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined based on the standard deviation of the analyte response and the standard deviation slope. Quantitative results were subjected to ANOVA analysis and Tukey's test for mean comparison ( $P < 0.05$ ).

#### HPLC analyses

Citric, oxalic, acetic and lactic acids were detected and quantified using an HPLC-RID Agilent 1200 system (Agilent technologies, Santa Clara, CA, United States). Briefly, 5  $\mu$ L of filtered brine were injected in a Rezex ROA-Organic acid column (150 mm × 4.6 mm) (Phenomenex Inc., Australia). Mobile phase was 0.01M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.6 mL/min and the run time was 25 min. Signals were recorded using a refractive index detector. Standards solutions of the four acids, first individually and then mixed at six different concentrations, were injected in duplicate in order to build a linear range. Quantification was based on the injection of an external standard mix of the four molecules at 1 mg/mL regularly during analysis. Quantitative results were subjected to ANOVA analysis and Tukey's test for mean comparison ( $P < 0.05$ ).

#### Volatile Compound Profile Analyses in Olive Fruit

Volatile profiles of olive fruits were obtained using Headspace GC-MS. Compound extraction was performed using a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment on 2.5 g of olive fruits placed in 22 mL vials. Analyses were performed according to methods previously described by Harlé et al. (2020). Prior to compound identification, data were processed using PerkinElmer Turbomass software, version 5.4.2.1617 and by converting the raw data to time- and mass-aligned chromatographic peak areas using the open-source XCMS package implemented with the R statistical language (Smith et al., 2006). Parameters were set as follows: full width at half maximum = 5, group bandwidth = 3, span = 0.2, signal to noise ratio = 5. Volatile compound identification was achieved by comparing the retention index and mass spectral values (1) from the NIST 2008 Mass Spectral Library (Scientific Instrument Services, Ringoes, NJ, United States) with a threshold set at 65 % and (2) when possible with those of authentic standards (Sigma Aldrich, France)

analyzed in the same system and those reported in the literature. Volatile profile changes between samples were investigated by comparing abundance of the identified compounds using PCA and ANOVA analyses under R software. Hierarchical clustering and correlation analyses of the compounds showing a significant difference throughout fermentation was performed using Ward's minimum variance linkage and Euclidean distance method under R software.

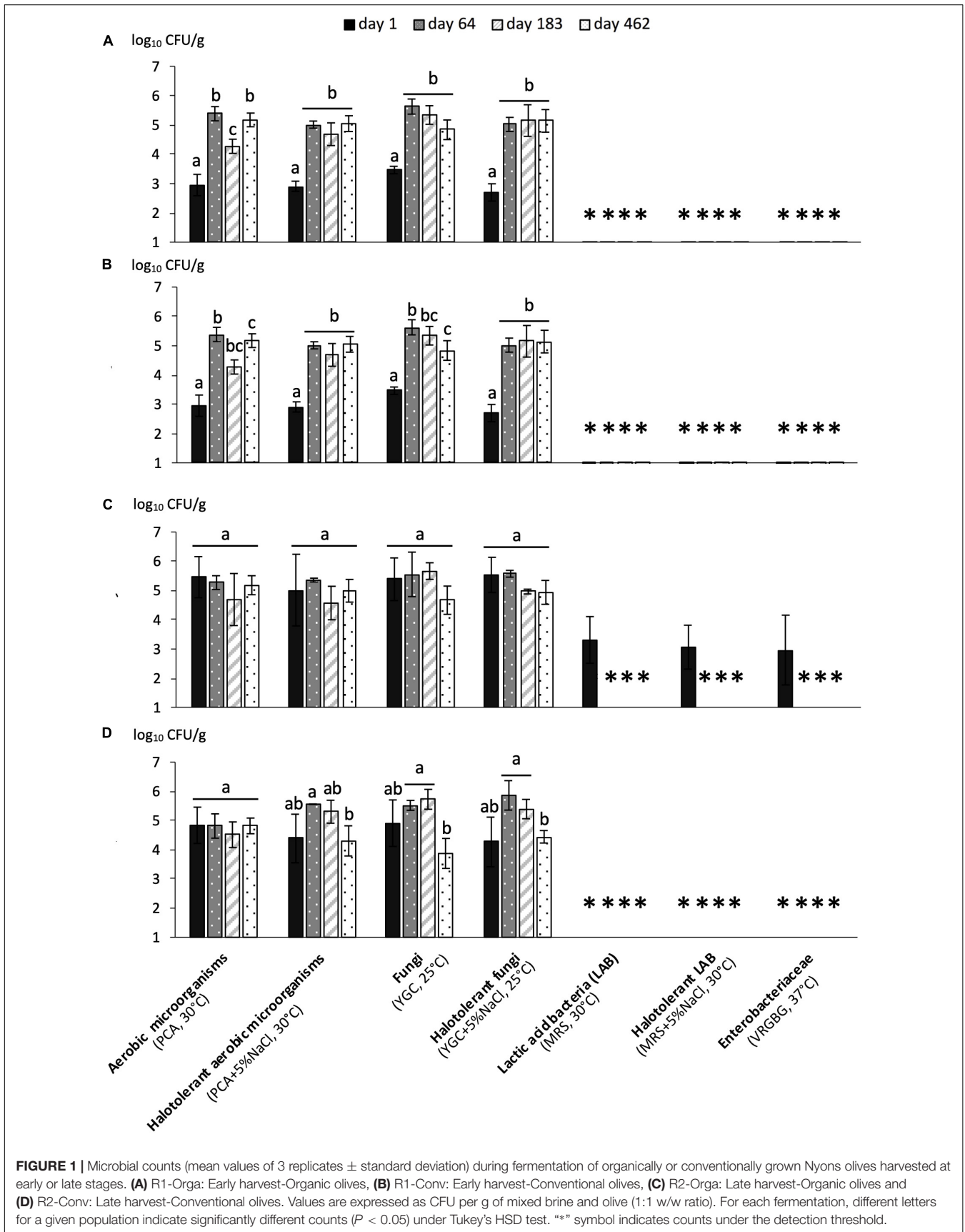
### Correlation Analyses Between Microbial and Biochemical Data

Correlation analyses were performed separately for brine and olive data. First, principal component analysis (PCA) was implemented to assess overall differences between samples using both culture-independent microbial data and biochemical data. Then, Spearman rank correlation  $\rho$  coefficients between microbial species (relative abundance obtained by culture-independent approach) and biochemical compounds were calculated.  $P$  values were adjusted using Benjamini-Hochberg correction and significance level was set at 0.05 (Benjamini and Hochberg, 1995). Results for species showing at least one significant correlation were visualized on a heat-map with hierarchical clustering using Ward's minimum variance linkage and Euclidean distance method. Correlations with  $P > 0.05$  were considered null and set to  $\rho = 0$ . All analyses were performed with R software using FactoMiner, Factoextra, Hmisc, Psych and gplots packages (Lê et al., 2008; Wickham, 2016).

## RESULTS

### Microbial Dynamics During Fermentation Through Culture-Dependent Approach

Microbial populations were monitored for the four fermentations – early harvest with organic olives (R1-Orga), early harvest with conventional olives (R1-Conv), late harvest with organic olives (R2-Orga) and late harvest with conventional olives (R2-Conv). Overall, fungal populations were found at the highest concentrations (nearly 5 log<sub>10</sub> CFU/g mixed olives and brine) and represented the main population during all fermentations (**Figure 1**). While no major difference in counts was observed between conventional and organic olives ( $P > 0.05$ ), some differences were observed between harvests. Initial microbial loads on fresh fruits were very different between early and late harvests, with up to  $\sim 3$  log<sub>10</sub> lower counts for fungal and total mesophilic and halotolerant populations for the early harvest ( $P < 0.05$ ). However, similar fungal and bacterial populations were reached by 64 days (around 5.6 log<sub>10</sub> CFU/g) and remained fairly stable, especially for early harvest fermentations, while a slight decrease in populations was observed (1–2 log<sub>10</sub>) for the late harvest (R2 samples) between day 183 and 482 ( $P < 0.05$ ). One other major difference was the presence, although at low concentrations, of LAB (3 log<sub>10</sub> CFU/g) and enterobacteria (2.9 log<sub>10</sub> CFU/g) on R2-Orga fresh fruits, while undetected in other samples. However, both LAB and



enterobacteria populations rapidly decreased to values below the detection limit (2.3 and 1 log<sub>10</sub> CFU/g, respectively) by day 64 and remained undetected for the rest of the fermentations regardless of harvest period or olive type. Overall, no major difference was observed between halotolerant and total microbial populations.

## Fungal Community Diversity and Dynamics During Fermentations

### Fungal Biodiversity Determined by Fungal Isolate Identifications

A total of 867 fungal isolates were cryopreserved, dereplicated and identified to assess fungal diversity and composition for each fermentation condition (**Figure 2A**). Similar trends were observed for all fermentations. Filamentous fungi dominated at the start of the fermentation and *Aureobasidium pullulans* was highly abundant and ranged from 20 to 100% in the monitored tanks. Minor species were also encountered such as *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus carnescens* and *Alternaria* sp. in 7 out of the 12 fermentation tanks. However, from day 64 onward, all of the species mentioned above were no longer detected and the fermentations were dominated by four yeast species, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia membranifaciens*, *C. nyonsensis* and *Zygorhynchus mrakii*, although individual abundances varied between replicates and according to olive types and harvest periods. For instance, *C. nyonsensis* abundance was particularly high in the late harvest R2 tanks representing, at day 64, 50% of fungi, before reaching 100% at day 183 for the R2-Conv fermentation. However, fungal dynamics shifted towards the end of fermentation. *Z. mrakii* was no longer detected in any fermentation while *C. nyonsensis* and *W. anomalus* abundances decreased. In the end, *P. membranifaciens* remained the dominant species. *Schwanniomyces etchellsii* and *Candida boidinii*, which were subdominant in the first fermentation stages, also increased and represented up to 40% abundance in the case of *C. boidinii*. Other species such as *Saccharomyces cerevisiae/paradoxus* and *Priceomyces carsonii*, were identified in multiple tanks, although they were not specific to one fermentation condition (i.e., olive type) or stage.

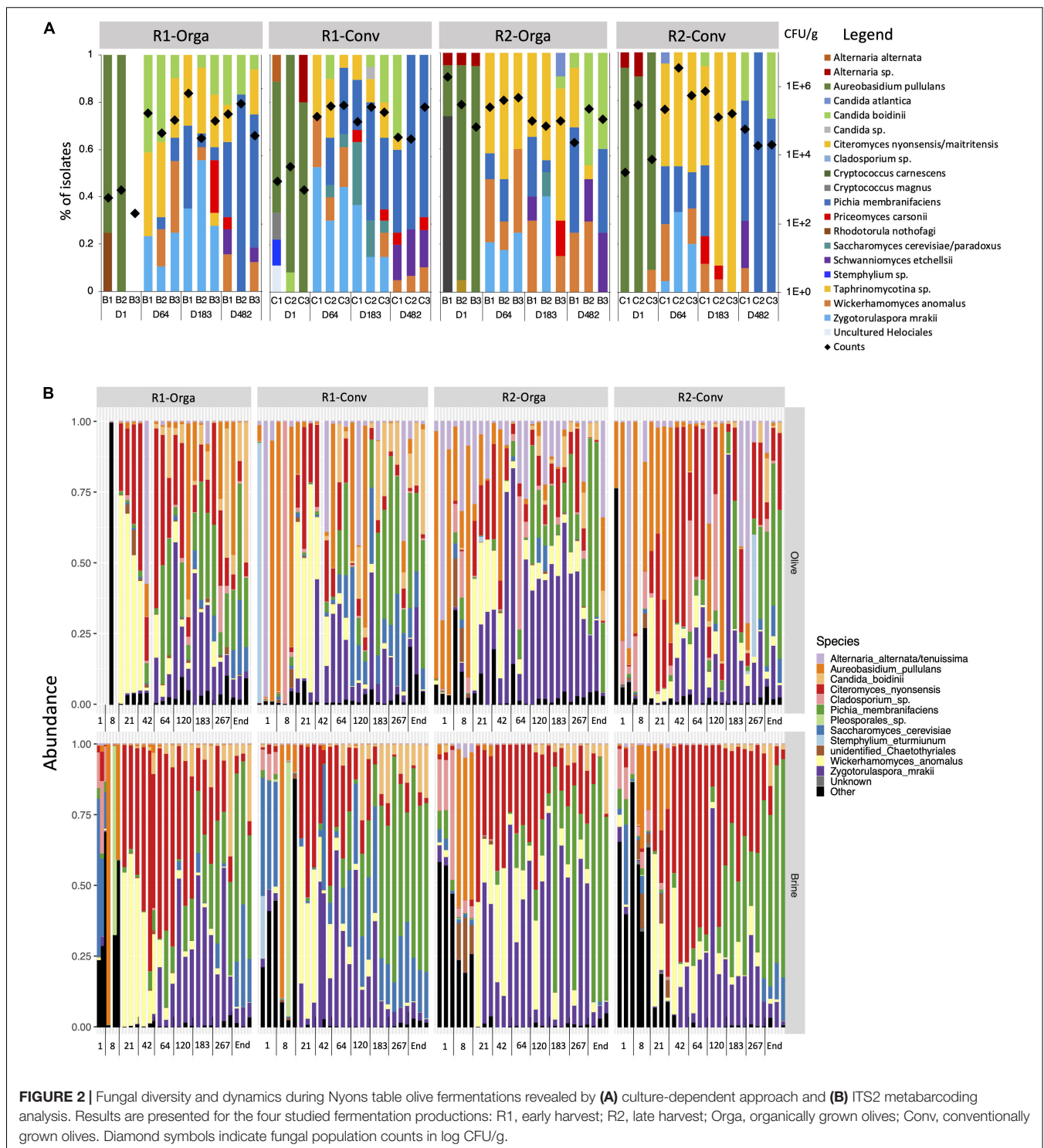
### Fungal Dynamics Using ITS2 Metabarcoding Analysis

A total of 6 010 233 quality-filtered contigs were obtained through ITS2 Illumina sequencing. After chimera and singleton removal, sequences were clustered into 134 OTUs belonging to Ascomycota (97%), Basidiomycota (2.5%) while 0.5% were unidentified (**Supplementary Figure 1**). After normalization, 1302 sequences per sample were kept for diversity analyses.

Alpha-diversity indexes (Chao1 for richness, Shannon for evenness) did not show any significant differences according to the harvest period or olive type and only a slight difference between olive fruits and brines (**Supplementary Figure 2**). However, Shannon index was significantly different according to fermentation stage ( $P < 0.05$ ) and when both matrix and fermentation stage were considered ( $P < 0.001$ ) for the two indexes. Thus, at day 1, Shannon index was higher in brines

compared to olive fruits. Both Chao1 richness and Shannon evenness indexes significantly decreased from day 1 to day 21 in brines and olive fruits ( $P < 0.01$ ). While richness remained stable until the end of fermentation, evenness in brine and olive samples significantly increased from day 42 until day 183.

These observations were further confirmed by beta-diversity analyses performed on unweighted Unifrac and weighted Unifrac distances. All four studied variables (i.e., matrix, harvest period, olive type and stage) were significantly different according to the Adonis test ( $P < 0.05$ ). However, for harvest period, type and matrix, the associated  $R^2$  values, which reflect the percentage of variance between distances explained by the tested variable, were very low ( $R^2 < 0.05$ ), hence implicating a weak difference overall. The impact of fermentation stage was, however, higher ( $R^2 > 0.5$  for weighted Unifrac) and could be visualized on PCoA plots (**Supplementary Figure 3**). A gradient following fermentation process could be seen along axis 1 for both unweighted Unifrac (19.8%) and weighted Unifrac (47.5%) plots, separating day 1 and day 8 samples from the other fermentation stages. Samples from day 21 to the end of fermentation were better separated by weighted Unifrac (axis 28.7%) compared to unweighted Unifrac distances. The major difference between the observed distances is due to the OTU relative abundances and composition. This implies that differences in fungal communities are rather qualitative in the early days of fermentation while fungal community profiles differed by OTU abundances during the later stages of fermentation. Further analyses were therefore done to investigate fungal community composition differences according to fermentation stage and matrix interactions (**Figure 2B**). Overall, the fungal community profile strongly differed between olive fruit samples and brines during the first days of fermentation (days 1 and 8). High genus diversity was observed in olive fruits and they mainly corresponded to plant-associated filamentous fungi (i.e., *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Leucosporidium*, *Penicillium* and *Filobasidium*) although *Aureobasidium pullulans* dominated in both matrices. From day 42 to the end of the fermentation, *Z. mrakii*, *W. anomalus* and *P. membranifaciens* abundances were significantly higher in brines compared to olive fruits ( $P < 0.001$ ), but the same shifts in species composition were observed in both matrices. For example, between days 8 and 21, *W. anomalus* and *C. nyonsensis* considerably increased and dominated the fermentation (log<sub>2</sub> fold change [13.3] and [10.6] in brines, respectively,  $P < 0.001$ ). However, *W. anomalus* progressively decreased from day 42 onward, while *C. nyonsensis* abundances decreased from day 64 to day 120. On the other hand, *Z. mrakii* increased in both olive and brine samples from day 42 and dominated until day 183. From day 183 to the end of the fermentation, *P. membranifaciens* dominated in both matrices and represented up to nearly 50 and 70% of the relative abundance in olives and brines, respectively. Noteworthy, early and late harvests significantly differed in abundances of two subdominant species. Indeed, *S. cerevisiae* (log<sub>2</sub> fold change [3.9],  $P < 0.001$ ) and *C. boidinii* (log<sub>2</sub> fold change [1.6],  $P < 0.001$ ), which abundances increased toward the end of fermentation, were higher in R2 than in R1 harvests.

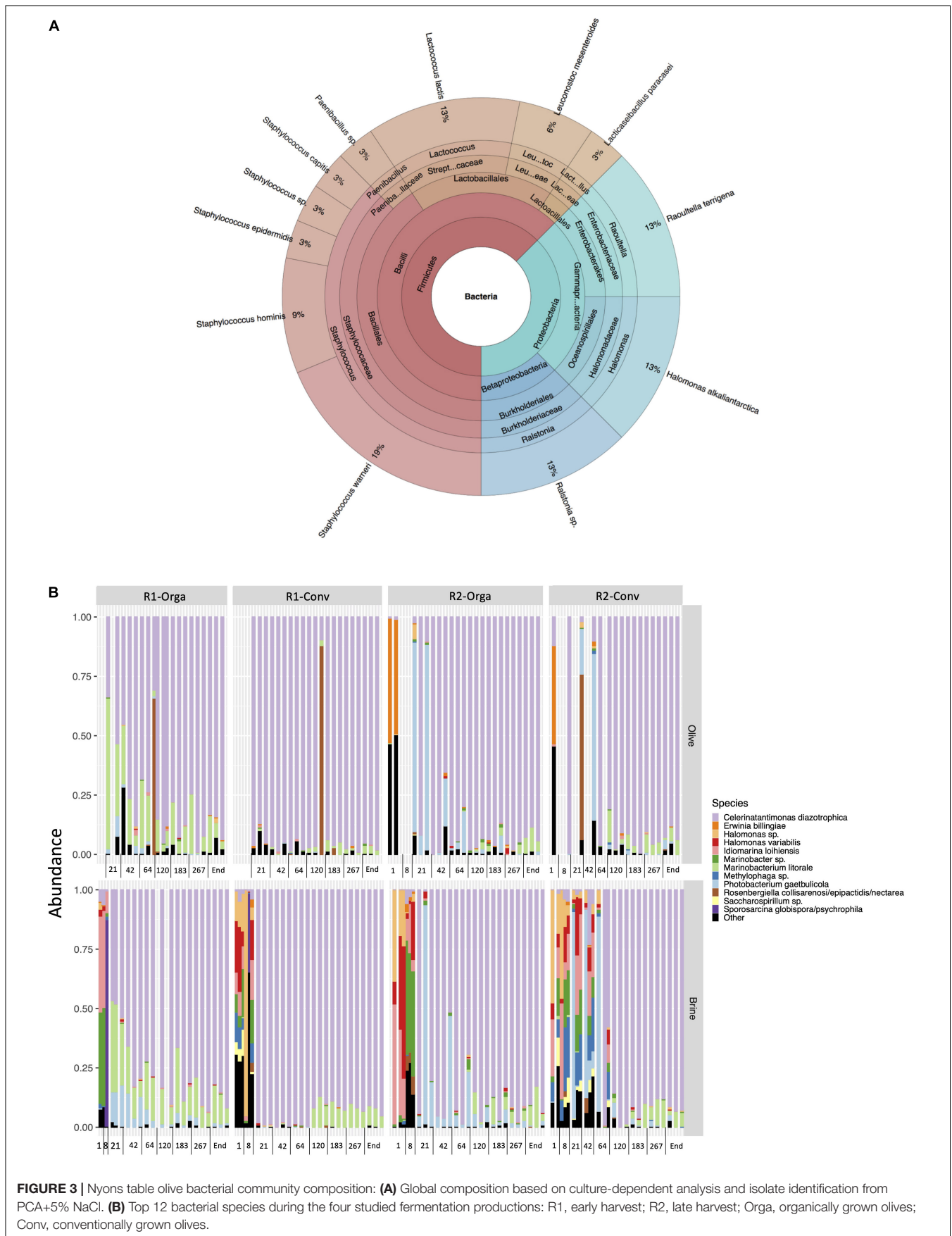


### Bacterial Community Succession in Olives and Brines During Fermentations

#### Bacterial Dynamics Using Culture-Dependent Analyses

As previously stated, bacterial populations were low compared to fungal populations and only a limited number of bacteria

were isolated, mainly from the early stages of fermentation (days 1 and 64). Coagulase-negative staphylococci were the most represented genus (*Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*), although all isolates were identified at day 64 (Figure 3A). Soil bacteria (*Ralstonia* and *Raoultella* genera) represented 26% of bacterial isolates while



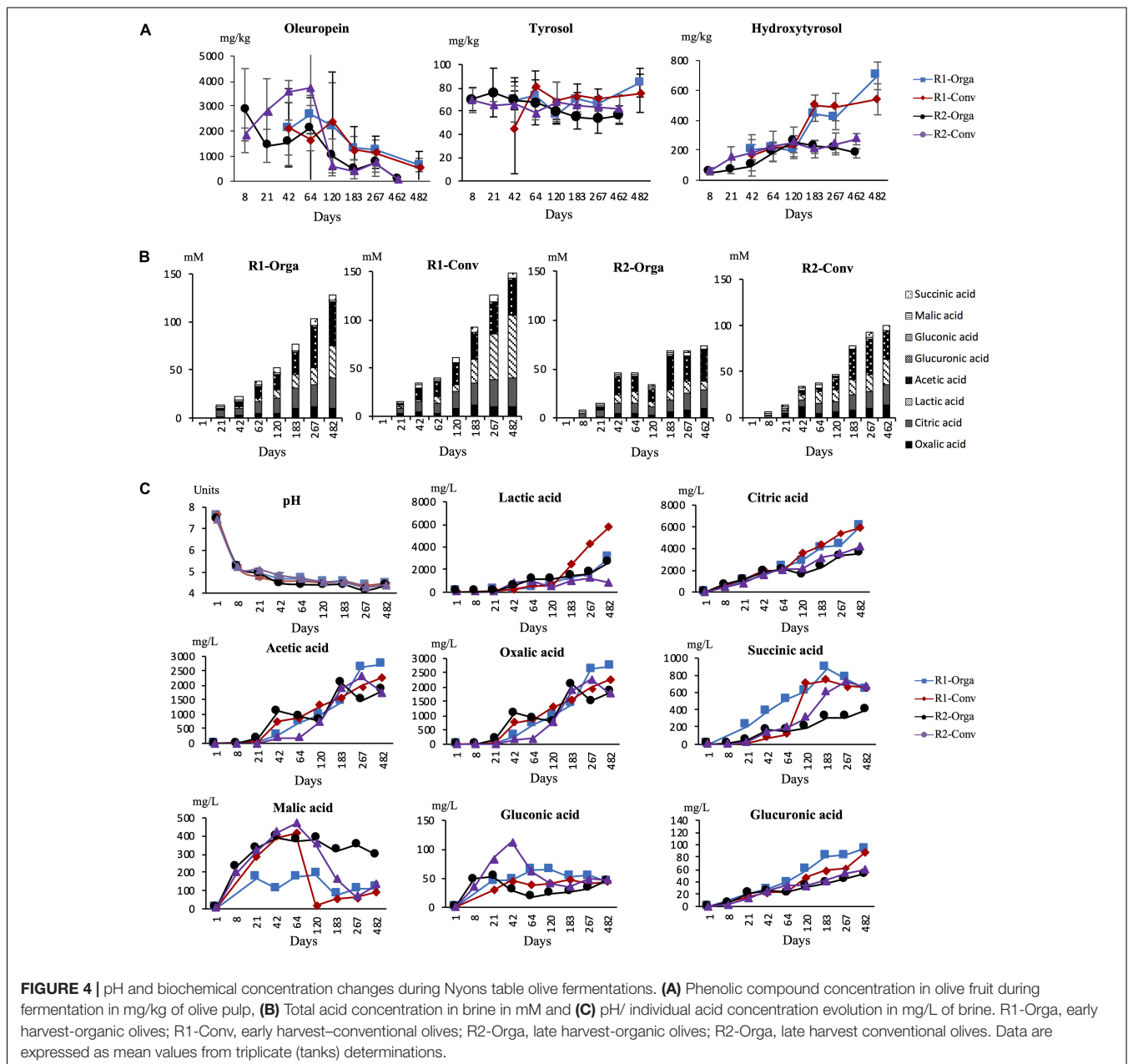
marine bacteria represented 13% (*Halomonas alkaliantartica*). Some LAB species, namely *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactiacaseibacillus paracasei*, were also identified (21% of all isolates) but only from organic fresh olive fruits and brine samples (**Supplementary Table 2**). Hygiene and safety criteria, i.e., coagulase-positive staphylococci levels, absence of pathogens, were satisfied at all sampling times considered including in the final product (data not shown).

2 828 839 sequences were left and clustered into 54 OTUs. Proteobacteria were the most represented phylum with 99.75 % of sequences, the remaining 0.25% belonging to Firmicutes. Among Proteobacteria, OTUs related to *Celerinatantimonas diazotrophica* were dominant (78% of sequences), followed by *Photobacterium gaetbulicola* (7%) and *Marinobacterium litorale*. Firmicutes mainly consisted of *Bacillus* sp. and LAB with *L. mesenteroides* (9%), *L. lactis* (9%) and *Lactiplantibacillus pentosus* (8%) (**Supplementary Figure 4**).

Sequence numbers per sample were very heterogeneous, especially for olive samples, thus samples with less than 200 sequences were excluded ( $n = 32$ ). All remaining samples were rarefied to 207 sequences per sample (corresponding to the

**Bacterial Dynamics Using Metabarcoding Analysis**

V3-V4 16S rDNA gene Illumina sequencing resulted in 7 941 784 reads which passed quality filters with an average length of 427 bp. After assignment and contaminant removal,



sample with the lowest sequence number) to conduct alpha and beta-diversity analyses. Neither matrix nor harvest had a significant impact on alpha-diversity or beta-diversity ( $R^2 < 0.01$ ) of bacterial communities. As for olive type, richness and evenness were significantly higher in the organic olive fermentations compared to conventional ones ( $P < 0.01$ ). *P. gaetbulicola* was found in higher abundances in organic olive fermentations when compared to conventional ones (log2 fold change |4|;  $P < 0.05$ ). Noteworthy, R1-Conv fermentation showing the lowest alpha-diversity indexes and differed significantly according to the fermentation stage. Fermentation stage was the variable with the most impact on bacterial communities. Based on weighted Unifrac distance, it explained most of the observed variance ( $R^2 = 0.26$ ). Both richness and evenness were highest during the first stages of fermentation (days 1 and 8) and this was further confirmed by beta-diversity analysis. PCoA plot based on weighted Unifrac matrix showed a clear opposition on axis 1 (54.3%) of brine at days 1 and 8 and all other fermentation stages (Supplementary Figure 5). The bacterial community composition plot (Figure 3B) revealed that these samples had a completely different profile. They were mainly composed by *Halomonas*, *Iodomarina*, *Marinobacter* and *Methylophaga* genera. Following day 8, alpha-diversity significantly decreased ( $P < 0.01$ ) and stabilized around 0.25 for Shannon index. All the previously mentioned species decreased in the following stages except for the late harvest conventional (R2-Conv) fermentation where they were identified until day 42. Overall, the composition of the bacterial communities was similar in all cases from day 21 to the end of fermentation. *C. diazotrophica* clearly dominated (between 45 and 99% abundances) while *M. litorale* abundances remained stable.

## Phenolic Compounds Changes During Fermentation

Changes in oleuropein concentrations, and its derivative compounds, tyrosol and hydroxytyrosol, were quantified at each sampling date and results are shown in Figure 4A. Overall, similar trends were observed for all three molecules regardless of the fermentation conditions. Oleuropein was found at high concentrations ranging from 1 to 4 g/kg of olives during the first months of fermentation, although at highly variable concentrations among the four fermentations. From day 120 to the end of the process, concentrations decreased progressively for both harvests, although this was only significant for the late harvest. As a consequence, concentrations significantly differed ( $P < 0.05$ ) at the final fermentation day. For the early harvest R1, from day 120 to 462, the concentration was divided by 5 (around 500 mg/kg olive). In comparison, the observed decrease started at day 64 for the late harvest R2 and the amount was 15–20 times lower, around 100 mg/kg olive, by the end of the fermentation. Inversely, the hydroxytyrosol concentration progressively increased, even though, once again, differences were pronounced between harvests. For early harvest R1, concentrations were significantly higher from day 183 onward and multiplied by 5 by the end of the fermentation (around 600 mg/kg) whereas for late harvest R2, the concentration

increased 2-fold between days 8 and 120 then was relatively stable until the end of the fermentation (around 200 mg/kg). Tyrosol concentration remained fairly stable ( $P > 0.05$ ) and was quantified at a lower concentration than the two other compounds, between 50 and 70 mg/kg olive. No significant differences were observed between either harvests or olive types.

## pH Evolution and Organic Acids Changes in Brine During Fermentation

For all fermentation tanks, pH was measured at regular time intervals. Initial brine pH was 7.7 units, then dropped during the first week of fermentation to 5.2 units. From day 8, pH declined slowly oscillating between 4.2 and 4.4 until the end of the fermentation regardless of the harvest or olive type.

In addition, eight organic acids known to be relevant in olive fermentations were monitored and quantified at different times in brine samples. Total acids produced during fermentation were calculated and are presented in Figure 4B. As expected, none of the acids were detected in brines at the start of fermentation (day 1). After day 8, total acids increased continuously to reach ~127, 148 and ~100 mM by the end of the fermentation for R1-Orga, R1-Conv and R2-Orga fermentations, respectively. However, the late harvest R2-Orga fermentation showed a different trend as, after a slight increase of total acids up to day 64 (40 mM), the concentration temporarily decreased before reaching 62 mM at the end of fermentation.

When considering individual acids, all of them significantly increased during fermentation (Figure 4C). Significant differences were observed for five out of eight acids between harvest periods R1 and R2 ( $P < 0.01$ ), while significant differences were only observed for lactic and succinic acids between conventional and organic olive fermentations ( $P < 0.05$ ) (Supplementary Table 3). Citric, acetic and lactic acids showed the highest concentrations, over 1 g/L of brine, during most of the fermentations. However, their concentrations were higher for the early harvest R1 samples. Indeed, citric acid was detected as early as 8 days in brine and continuously increased to reach ~6 g/L at the end of this fermentation versus ~3 g/L for late harvest R2 fermentations. Acetic acid was detected after 21 days in all fermentations except for the late harvest R2-Conv fermentation (detected at 42 days) and gradually increased to ~2 g/L by 267 days. Lactic acid concentrations differed between harvests and olive types. While this acid was detected by day 8 in early harvest R1 fermentations, it was only produced after 42 days for the late harvest R2 fermentations. Moreover, the levels reached were 3 to 6-fold significantly lower, especially for organic olives, by the end of fermentation. Succinic and oxalic acids were detected in the early stages of fermentation and concentrations ranged between 0.1 and 1 g/L during fermentation. For both acids, concentrations continuously increased during fermentation although it was only significantly different from earlier sampling times at around 120 days, except for the late harvest R2-Conv fermentation. Gluconic and glucuronic acids were detected at lower concentrations compared to other acids. Moreover, they did not exceed 30 mg/L brine and remained stable after an initial increase during the first



weeks of fermentation. In a similar manner, malic acid, despite higher levels in the early stages of fermentation (0.4 g/L), did not significantly evolve over time except for the early harvest R1-Conv fermentation where the concentration dropped between days 64 and 120.

## Changes in Volatile Profiles During Nyons Olive Fermentations

A total of 67 compounds were detected during fermentation belonging to different families: 27 esters, 11 aldehydes, 8 short fatty acids, 6 alcohols, 4 ketones, 4 phenols and 6 to other classes. Sample projection using Principal Component Analysis showed that the first dimension (40.8%) clearly separated the different sampling times, from day 1 on the left to the final day of fermentation on the right (**Supplementary Figure 6A**). In PCA plots and considering dimensions 1 and 3 (8.4%), samples belonging to harvest R1 were separated from harvest R2 (**Supplementary Figure 6B**). Results thus suggest that, in addition to fermentation stage, harvest period also impacted the volatile profile. Moreover, abundance significantly differed for 26 and 22 compounds between harvest periods and olive types, respectively, while 62 were impacted by fermentation stage (**Supplementary Table 4**). However, for compounds with significantly different abundances between harvest periods, the trends were similar throughout the fermentation.

To further investigate volatile compound dynamics, hierarchical clustering analysis with a heatmap representation was performed on the 62 compounds presenting significant differences in abundances during fermentation (**Figure 5**). Three main volatile clusters were distinguished and correlated with the different fermentation stages. Group I gathered 13 molecules, mainly aldehydes such as hexanal and benzaldehyde. Their abundances were higher during the early stages (day 1 and day 8) of fermentation and decreased afterward. Group II was composed of 23 compounds mostly belonging to esters ( $n = 10$ ) and alcohols ( $n = 4$ ) and their abundances increased during intermediate fermentation stages (from day 21 to 64) then remained high until the end of the fermentation. Finally, Group III was composed of 26 compounds mainly esters ( $n = 13$ ) and short-chain fatty acids ( $n = 5$ ) for which their respective abundances were the highest during the final stages of the fermentation.

## Correlation Between Biochemical Profile and Microbiota During the Fermentation

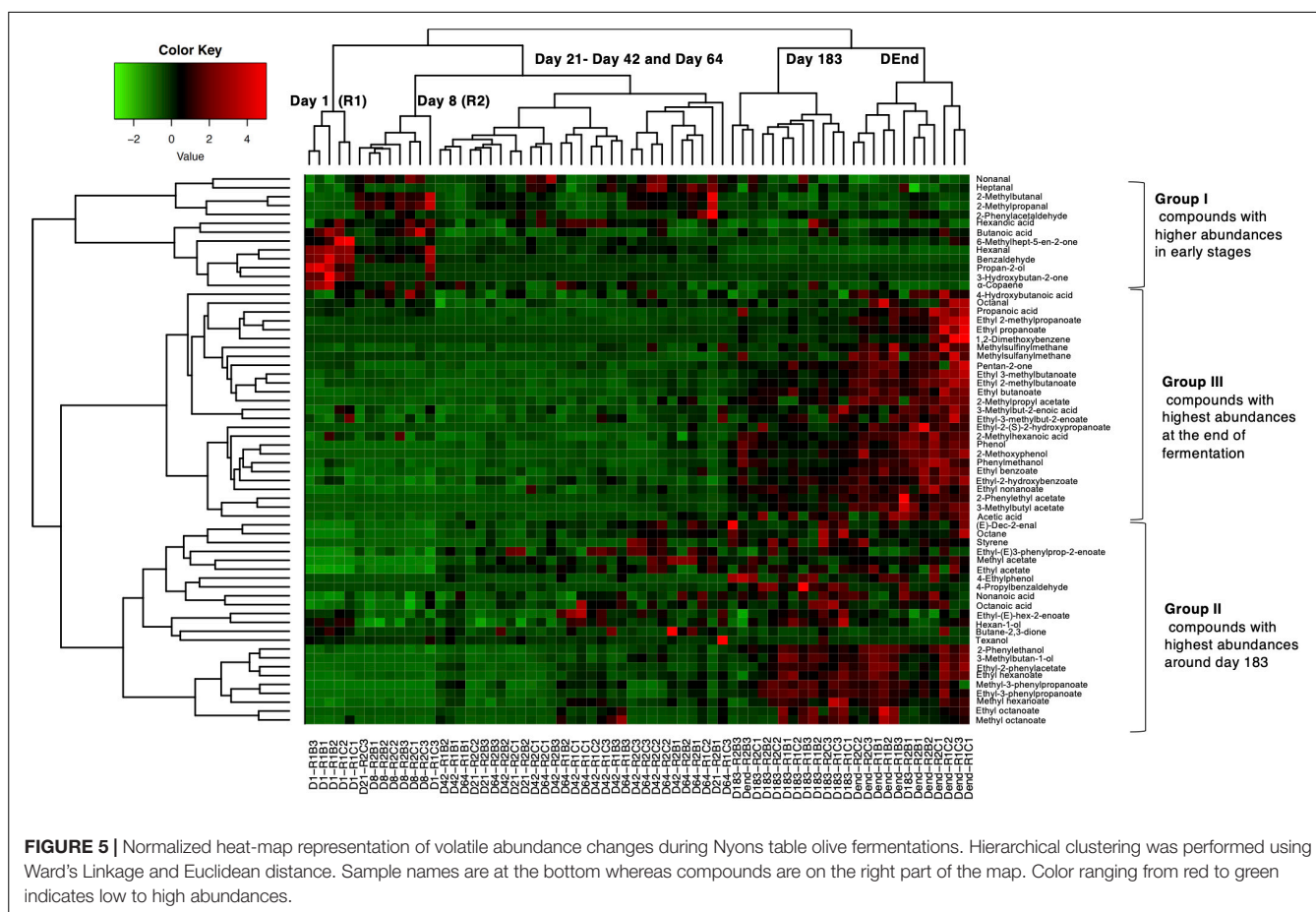
A principal component analysis was performed with all microbial and biochemical data to correlate temporal changes in microbial communities with biochemical profiles of brine (**Supplementary Figure 7A**) and olive fruits (**Supplementary Figure 7B**). Concerning brine, dimensions 1 and 4, which explained 18.9 and 6 % of the variance respectively, provided the best separation of samples according to fermentation stages. A clear opposition was seen between early stages of fermentation (day 1 and day 8) and final stages of fermentation (days 183 to end of fermentation). While early stages of fermentation were associated with most of the plant-associated species and

pH, four species, namely *C. diazotrophica*, *P. membranifaciens*, *C. boidinii* and *P. carsonii*, stood out in the final stages and were closely related to the production of most acids. Noteworthy, *C. nyonsensis* and *W. anomalus*, between days 21 and 42, were not related to any biochemical variable. Concerning olive fruit biochemical and microbial profiles, similar clustering was observed along dimensions 1 (28%) and 2 (10.1%) and the same four species stood out in regards to the formation of 14 esters, two ketones, two phenyl alcohols and one phenolic compound hydroxytyrosol. Interestingly, five compounds were closely related to axis 2 including oleuropein, however, without any link to a given species.

To get better insight into the potential links between aroma compounds and microorganisms, Spearman's correlations were also calculated between microbial species and organic acids, pH in brine (**Figure 6A**), and between phenolic and volatile compounds in olive fruits (**Figure 6B**). Regarding changes in brines, significant negative correlations were found between organic acids and 45 fungal and bacterial species. The strongest antagonisms ( $|\rho| > 0.6$ ) were observed for *Cladosporium* sp. and *A. pullulans* for fungi and *Halomonas* spp., *Iodimarina loihensis*, and *Alcanivorax borkuhmensis* for bacteria. Overall, eleven species showed at least one positive correlation with the acids. The strongest correlations were observed for *P. membranifaciens* with  $\rho$  values above 0.6 for citric, succinic, gluconic, oxalic acids and above 0.7 for acetic and lactic acids. The yeast *C. boidinii* and the bacterium *M. litorale* showed similar correlation levels for lactic, citric and succinic acids, while *Z. mrakii* and *C. diazotrophica* were well correlated with acetic, citric and lactic acids ( $0.4 < |\rho| < 0.6$ ). *W. anomalus* and *C. nyonsensis* were only positively correlated with malic acid ( $|\rho| \sim 0.45$ ), whereas no significant positive correlation was observed for *S. cerevisiae*. Strong positive correlations were also sporadically noticed between acids and sub-dominant species. For instance, *P. carsonii* showed a similar correlation profile as *C. boidinii*, while *S. etchellsii* and *Zygoascus hellenicus* were particularly well correlated to acetic acid.

Regarding phenolic compound changes in olive fruits, correlations were limited. Six species, namely *P. membranifaciens*, *Candida molendinolei*, *P. carsonii*, *S. etchellsii*, *Kuraishia cidri* and *Z. hellenicus*, showed a significant negative correlation with oleuropein ( $|\rho| < 0.4$ ;  $P < 0.05$ ) and positive correlation with hydroxytyrosol ( $|\rho| > 0.4$ ;  $P < 0.01$ ). *C. diazotrophica*, *S. cerevisiae* and *C. boidinii* were positively correlated with the increase of hydroxytyrosol ( $|\rho| > 0.6$ ). No significant correlation with tyrosol was determined.

Regarding volatile compounds, three correlation profiles could be distinguished. Some profiles, as observed for *A. pullulans*, associated positive correlations mainly with aldehydes (i.e., nonanal, benzaldehyde) and negative correlations with most volatiles especially esters. An opposite profile was observed for 14 species, i.e., strong negative correlations with aldehydes and strong positive correlations with esters, alcohols and phenolic compounds. Focusing on species with relative abundance  $> 0.5\%$  and strongest positive correlations ( $|\rho| > 0.6$ ), highest correlation numbers were observed for *P. membranifaciens* ( $n = 30$ ) and *C. boidinii*



**FIGURE 5 |** Normalized heat-map representation of volatile abundance changes during Nyons table olive fermentations. Hierarchical clustering was performed using Ward's Linkage and Euclidean distance. Sample names are at the bottom whereas compounds are on the right part of the map. Color ranging from red to green indicates low to high abundances.

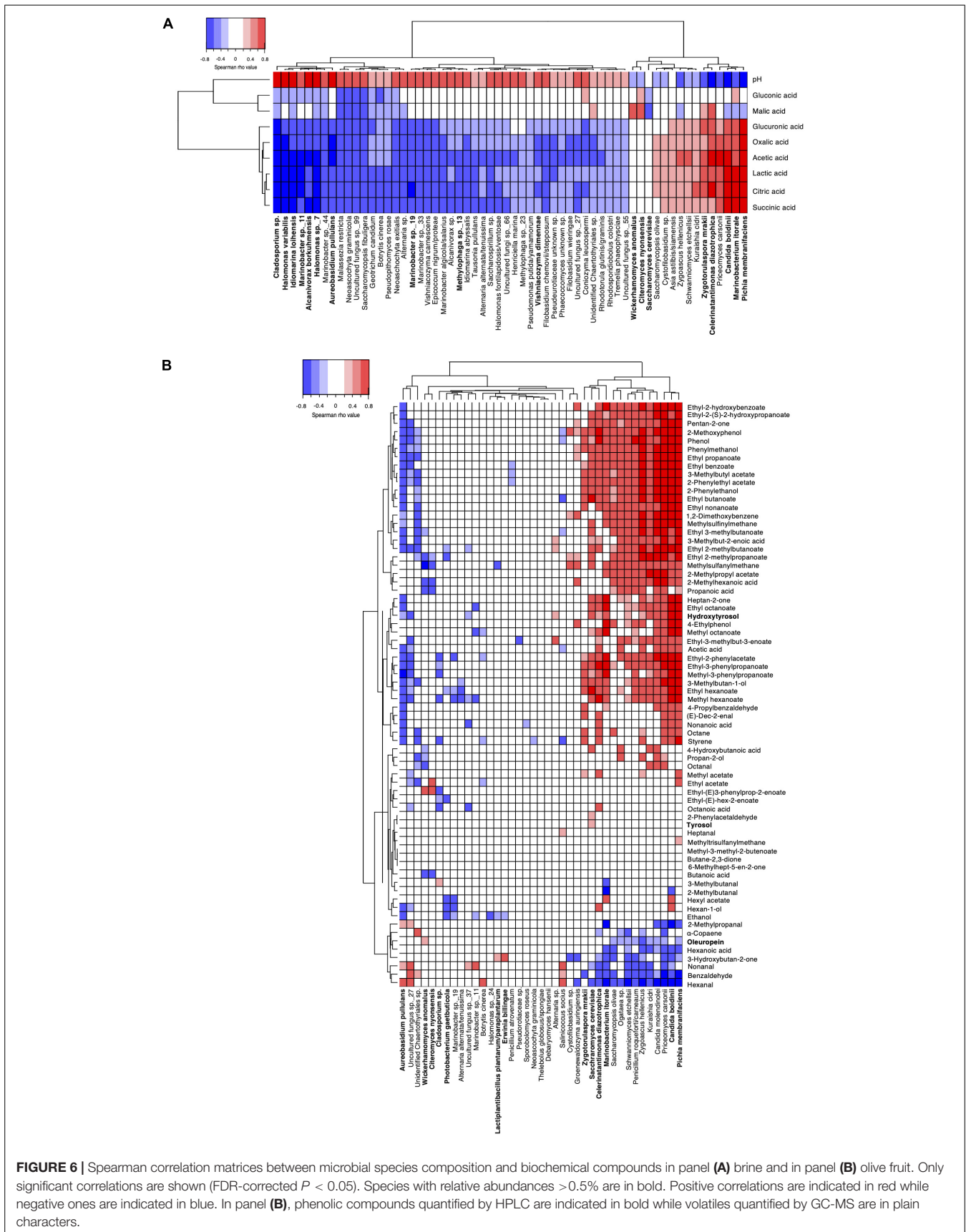
( $n = 27$ ). Correlation levels for both species were particularly high ( $|\rho| > 0.7$ ) with ethyl octanoate, ethyl benzoate, 2-methoxyphenol, ethyl 3-phenylpropanoate, 2-phenylethanol and phenol. However, *P. membranifaciens* showed further strong correlations with specific esters (ethyl propanoate, 3-methylacetate, ethyl nonanoate, 2-phenylethylacetate, methyl-3-phenylpropanoate), heptan-2-one, pentan-2-one and 3-methylbutan-1-ol. By comparison, *C. boidinii* showed the highest correlations with ethyl 2-phenylacetate and ethyl 2-hydroxybenzoate, all species considered. Two yeasts, *Z. mrakii* and *S. cerevisiae*, and two bacteria, *C. diazotrophica* and *M. litorale*, showed several significant correlations although levels were weaker ( $0.4 < |\rho| < 0.65$ ). *C. diazotrophica* was highly correlated with 2-methoxyphenol, phenol and best correlated with methyl hexanoate and acetic acid compared to other species. *M. litorale* was well correlated with four esters (methyl octanoate, ethyl octanoate, ethyl-2-phenylacetate and ethyl 3-phenylpropanoate) and heptan-2-one. As previously observed in brines, subdominant species such as *Z. hellenicus* and *C. molendinolei* showed high correlations ( $|\rho| > 0.6$ ) with eight and 11 compounds, respectively. In addition, *P. carsonii* showed a correlation profile similar to *C. boidinii* and was the species best correlated with ethyl(2S)-2-hydroxypropanoate, 1,2-dimethoxybenzene, ethyl 2-hydroxybenzoate and phenylmethanol. Noteworthy, for 22 species, including

*C. nyonsensis* and *W. anomalus*, only a few or weak correlations were found. Furthermore, 15 volatile compounds showed no significant positive correlation ( $P > 0.05$ ) with any of the species.

## DISCUSSION

Empirically, the olive fermentation process serves three purposes: reduce natural olive fruit bitterness, preserve it from spoilage by brining and, in doing so, enhance the organoleptic properties of the final product and hence make it edible. In this work, four complete productions of spontaneously fermented Nyons table olives were studied. The fermentation process in brine was monitored during 15 months for microbial and physicochemical changes to evaluate the impact of autochthonous microorganisms on product characteristics and determine their potential roles as fermentation drivers. The studied fermentations took into account two harvest periods and olive types: organic or conventional. At the end of fermentation, all table olive batches were tasted by the producer and satisfied PDO requirements.

In naturally brined black olives, debittering is essential as no lye treatment is applied. Oleuropein is the main compound responsible for the bitter taste of olive fruits. Its removal during fermentation can be achieved by three phenomena: osmotic diffusion from the olive pulp to the brine, chemical degradation



**FIGURE 6 |** Spearman correlation matrices between microbial species composition and biochemical compounds in panel **(A)** brine and in panel **(B)** olive fruit. Only significant correlations are shown (FDR-corrected  $P < 0.05$ ). Species with relative abundances  $>0.5\%$  are in bold. Positive correlations are indicated in red while negative ones are indicated in blue. In panel **(B)**, phenolic compounds quantified by HPLC are indicated in bold while volatiles quantified by GC-MS are in plain characters.

and enzymatic hydrolysis into by-products (Ozdemir et al., 2014). Previous research showed that oleuropein is degraded into non-bitter compounds via either endogenous olive esterase and beta-glucosidase activities (Ramírez et al., 2016) or from microbial enzymatic activities (Johnson and Mitchell, 2018). Among the non-bitter compounds generated, hydroxytyrosol is considered as the main marker of oleuropein degradation (Restuccia et al., 2011) while tyrosol is considered to be among the prevalent phenols in fermented olives. In our study, the monitoring of these compounds directly in olive fruits throughout fermentation revealed that Nyons table olives undergo a slow debittering process. Despite being harvested at full maturity, oleuropein levels were high in fresh fruits and only slowly decreased over time, mostly during the later stages of fermentation. In parallel, hydroxytyrosol concentration increased, confirming degradation of the bitter compound. However, hydroxytyrosol and tyrosol concentrations were relatively low compared to oleuropein decrease and no strong correlations were revealed between these phenolic compound changes and the dominant species (e.g., *P. membranifaciens*, *Z. mrakii*) in the later stages of fermentation. No correlation was neither found for *L. plantarum* and *W. anomalus* although both species were previously reported to possess active hydrolases during black olive fermentation (Bleve et al., 2014; Bonatsou et al., 2015). Based on our findings, debittering during Nyons olive fermentations is most likely due to diffusion and to endogenous enzymes.

Clear shifts in bacterial and fungal communities were observed following brining. Indeed, pH decrease was very fast (within the first weeks) and stabilized at a value below 4.5 units which satisfied PDO requirements. In the same period, olive-plant associated filamentous fungi and *Enterobacteriaceae*, which are two microbial groups found on fresh fruits and considered as common olive microbial spoilers (Medina-Pradas et al., 2017), disappeared. pH decrease was also concomitant with a rapid increase of acid concentrations in brines, especially citric and malic acids, as previously reported by Nychas et al. (2002). Interestingly, both acids were strongly and positively correlated with the dominant yeast species, *W. anomalus* and *C. nyonsensis*, and bacterial species, *C. diazotrophica*, when pH drops in brine. *C. nyonsensis* was first isolated from Nyons table olives (Casaregola et al., 2013) and since then has been identified in other olive fermentations (Arroyo-López et al., 2016) while *W. anomalus* is frequently identified in olive fermentations (Coton et al., 2006; Heperkan, 2013). OTUs related to *C. diazotrophica* dominated the fermentation early on, from 21 days, and remained among the most abundant bacterial species to the end of fermentation. It was first isolated from a high salt environment (Cramer et al., 2011) and, in this study, most likely came from the salt used for the brine. Noteworthy, this bacterium was previously identified in brines of spontaneous olive fermentations (Medina et al., 2016; Anagnostopoulos et al., 2020) with an increasing abundance throughout fermentation but was never the dominant species. However, little is known regarding its role or metabolism in olive fermentations. This species can assimilate glucose, fructose and galactose, which are the main sugars in olives, as well as malic acid and citric acid and also has a beta-glucosidase activity which makes it compatible with Nyons olive fermentation conditions. In our case, strongest

significant positive correlations were determined with citric, acetic and lactic acids in brine. The correlation with lactic acid is particularly interesting. Two other microorganisms, namely *P. membranifaciens* and *C. boidinii* were closely correlated to these compounds. However, if citric acid and acetic acid production by these two species is known, they are not reported to produce lactic acid. As a consequence, it can be hypothesized that *C. diazotrophica* contributes to its production. Strong positive correlations were also observed with volatile compounds such as hexan-1-ol, methyl hexanoate and phenol, however, it must be stressed they were weaker than the ones observed with yeast species. In addition, a phylogenetic analysis performed on OTU representative sequences of the metabarcoding dataset and those of type species from the *Celerinatantimonas* genus revealed that these OTUs formed a separate clade strongly supported by bootstrap values (data not shown). Based on these elements, more work is undeniably needed to better characterize and determine the role of this bacterium during olive fermentations, especially regarding lactic acid production. Unfortunately, *C. diazotrophica* growth conditions make it difficult to cultivate. In fact, its presence during fermentation was actually overlooked by the culture-dependent analyses used in this study. Besides this species, which population could not be quantified, bacterial populations were very low for the entire fermentation.

Most surprisingly, LAB populations were scarce throughout the fermentation. This is an unusual finding as it is well established that spontaneous black olive fermentations rely on both LAB and yeasts and the dominance of one group over the other often depends on the fermentation stage (Bleve et al., 2014). In our case, LAB were detected from olive samples in the first days of fermentation (fresh fruit) but did not persist throughout fermentation. Both culture-dependent and -independent analyses concurred to this conclusion. Population levels were below the detection limits and only three species, *L. lactis*, *L. mesenteroides* and *L. paraplantarum*, were detected in low abundances (<0.5% of total species). LAB presence and dominance are affected by high phenolic content and salt concentration above 8% (Tassou et al., 2002). Consequently, the high levels of oleuropein during most of the fermentation and the traditional PDO specifications using 10% salt brine for Nyons olives most probably explain these findings. Moreover, correlation analyses did not reveal any significant correlation between these LAB species and fermentation markers such as lactic acid concentration and pH decrease. These results suggest a limited input in Nyons olive fermentation.

Yeasts were thus clearly identified as the microorganisms having the strongest input during fermentation. In this study, a core mycobiota was identified and included five species, *W. anomalus*, *C. nyonsensis*, *Z. mrakii*, *C. boidinii* and *P. membranifaciens*. All of these species have been individually identified in diverse table olive preparations (Coton et al., 2006; Nisiotou et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2011; Alves et al., 2012). In our study, they were systematically present in all fermentations although their respective dominance fluctuated according to fermentation stage. The ability of yeast to enhance fermented olive final product aromas has often been pointed out (Arroyo-López et al., 2008; Aponte et al., 2010; Arroyo López et al., 2012) and this was confirmed in our study as strong

correlations were determined between yeast composition and volatile changes during fermentation. In summary, the Nyons olive fermentation could be dissociated into four phases. After an initial and fast decrease of plant-associated fungal and bacterial populations (phase I – day 1 to 8), the second fermentation phase (21–120 days) was dominated by *W. anomalus* and *C. nyonsensis* for fungi and *C. diazotrophica* for bacteria. As previously stated, it is highly probable that their main role during this phase is related to the pH decrease and malic acid production as no strong correlation was observed for these yeasts with any volatile compounds. The third phase of fermentation, between 120 and 183 days, was characterized by an increase in most acids, especially citric, lactic, succinic and acetic acids. This was linked to an increased abundance of *Z. mrakii*, *P. membranifaciens* and *C. boidinii*, as well as the highest abundances of 2-phenylethanol, methyl propanoate and octanoate esters. Both ester classes were previously linked to table olives (Tufariello et al., 2015) and positively impacted aroma by their characteristic sweet-fruity and acidic notes while 2-phenylethanol is characterized by a rose-like aroma and was shown to result from L-phenylalanine metabolism by yeast (Eshkol et al., 2009). The last months of fermentation (phase IV, between days 267 and 482) were correlated to an increase in ester and aromatic alcohol abundances. At this time, *P. membranifaciens* dominated and *C. boidinii* abundance further increased. These two species had the strongest correlations with numerous volatile compounds. Among them, ethyl propanoate, ethyl 2-methylbutanoate, phenylmethanol, 3-methylbutyl acetate and acetic acid were clearly identified and are considered as major aroma-active compounds in black table olives (Selli et al., 2018), thus supporting the key active roles of the two species.

These microbial dynamics were similar in the twelve monitored batches regardless of fruit maturity (two harvest periods) and cultivation practices (organic and conventional olives), thus highlighting the hardiness of the microbial fermentation process. No major differences were observed regarding aroma profiles between olive types so the use of conventionally or organically grown olives does not appear to favor any specific aroma compounds of the final product. Concerning harvest period, some differences were noticed. Acid content was higher for early compared to late harvest fermentations, whereas some volatile compound contents were higher in the late harvest fermentations. However, volatile compound differences could not be linked to any specific species presence or abundances. The observed differences in volatiles thus most likely derived from the fruit composition rather than microbial community variations. For instance, aldehydes are commonly retrieved in olive fruits as a result of endogenous lipid oxidation and their content was shown to increase with fruit maturity (Salas et al., 1999). As a result, the higher aldehyde content in the first weeks of late harvest fermentation is not surprising. Furthermore, if microbial community variations did not impact the fermentation process, as final olive characteristics were similar, a possible explanation would be that the distinctive microorganisms shared the same functionalities. An element to reinforce this hypothesis is that the aroma profile changes we observed for Nyons table olives were close to the ones recently described for Kalamata natural olive fermentations, although species diversity and dynamics differed as *S. cerevisiae*,

*W. anomalus* and LAB were the drivers of the fermentation (Bleve et al., 2015). More data are clearly needed to corroborate this hypothesis as only a little number of studies are currently available to compare findings.

Overall, results of the present study described the microbial dynamics of Nyons table olive natural fermentations and how the microbiota shapes the final fermented olive characteristics. The polyphasic approach implemented, that merged microbiological and biochemical data with metabarcoding analyses, allowed us to have an in-depth understanding about microbial species succession and potential functional roles during Nyons table olive fermentations and determine the key drivers of this process. Our data revealed complex fungal species diversity. The main microbial drivers could also be correlated with certain specificities of these olives and constituted a first step to better understand microbial functionalities involved in this fermentation process. With regards to the culture-dependent approach, it mainly identified the dominant fungal species but also some sub-dominant ones (*P. carsonii* and *S. etchellsii*) and provided information about viable microorganisms, thus confirming trends observed using metabarcoding. Moreover, a large working collection of isolates, belonging to both dominant and subdominant species and presenting interesting biochemical profiles, was established from different time points throughout the fermentation. These microbial resources are of great interest to further characterize the major fermentation drivers, assess their technological features and better understand their contribution during Nyons olive fermentation.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found below: <https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/>, PRJEB39897; <https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/>, PRJEB39898.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC, JM, S-MD, and HF obtained the funding and supervised the study, edited and proofread the manuscript. MC, JM, and MP designed the experiments. MP performed the experiments and analyzed all the data, drafted the manuscript. AP provided technical assistance for DNA extractions for metabarcoding and culture-dependent experiments and CL with microbiological analyses. MC, GV, and EP performed HPLC and LC-MS data acquisition and analyses while AT and M-BM assisted with GC-MS analyses. JM and HF provided technical support for metabarcoding analyses. All authors contributed to the article and approved the present version.

## FUNDING

This work, which was conducted in the framework of the ProMedFoods project “Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management

of microbial resources,” was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the following funding agencies: ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece), MIPAF (Italy), INIA (Spain) and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received funding from the European Union’s Seventh Framework Program for research, technological development and demonstration under grant agreement [618127].

## ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank our producer partner, Vignolis cooperative, for accepting to be part of our project, for welcoming us at their facilities and providing the samples. We also would

like to thank Geraldine Pascal and Olivier Rué for their technical support and advice for the FROGS bioinformatic pipelines. Finally, we are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.586614/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544. doi: 10.1093/nar/gky379
- Alves, M., Gonçalves, T., and Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives’ fermentations. *Food Contr.* 23, 363–368. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.07.033
- Anagnostopoulos, D. A., Kamilari, E., and Tsalas, D. (2020). Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. *Front. Microbiol.* 11: 1128. doi: 10.3389/fmicb.2020.01128
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., et al. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol.* 27, 162–170. doi: 10.1016/j.fm.2009.09.010
- Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Bautista Gallego, J., Rodriguez Gomez, F., Jimenez Diaz, R., Garcia Garcia, P., et al. (2012). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing. *Front. Microbiol.* 5:34. doi: 10.3389/fmicb.2012.00161
- Arroyo-López, F. N., Medina, E., Ruiz-Bellido, M. Á, Romero-Gil, V., Montes-Borrego, M., and Landa, B. B. (2016). Enhancement of the Knowledge on Fungal Communities in Directly Brined Aloreña de Málaga Green Olive Fermentations by Metabarcoding Analysis. *PLoS One* 11:e0163135. doi: 10.1371/journal.pone.0163135
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 189–196. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 89–96. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., et al. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods Ecol. Evol.* 4, 914–919. doi: 10.1111/2041-210X.12073
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. Royal Stat. Soc. Ser B* 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A., Mita, G., et al. (2015). Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamata table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiol.* 46, 368–382. doi: 10.1016/j.fm.2014.08.021
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F. A., Grieco, F., et al. (2014). Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives. *Front. Microbiol.* 5:570. doi: 10.3389/fmicb.2014.00570
- Bonatsou, S., Benítez Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E., and Arroyo-López, F. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiol.* 46, 66–73. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.011
- Casaregola, S., Jacques, N., Louis-Mondesir, C., Coton, M., and Coton, E. (2013). *Citeromyces nyonsensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from black olive brine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3086–3090. doi: 10.1099/ijs.0.0492964.9290
- Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., and Piga, A. (2020). Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods* 9:514. doi: 10.3390/foods9040514
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 130–135. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., et al. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1:93. doi: 10.1093/femsec/fix048
- Cramer, M. J., Haghshenas, N., Bagwell, C. E., Matsui, G. Y., and Lovell, C. R. (2011). *Celerinatantimonas diazotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium representing a new family in the Gammaproteobacteria, *Celerinatantimonadaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1053–1060. doi: 10.1099/ijs.0.01790517900
- Crawford, L. M., Holstege, D. M., and Wang, S. C. (2018). High-throughput extraction method for phenolic compounds in olive fruit (*Olea europaea*). *J. Food Compos. Anal.* 66, 136–144. doi: 10.1016/j.jfca.2017.12.013
- Edgar, R. C. (2013). UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. doi: 10.1038/nmeth.2604
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791
- Eshkol, N., Sendovski, M., Bahalul, M., Katz-Ezov, T., Kashi, Y., and Fishman, A. (2009). Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J. Appl. Microbiol.* 106, 534–542. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04023.x
- Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., et al. (2020). Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiol.* 89:103410. doi: 10.1016/j.fm.2019.103410
- Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Front. Microbiol.* 4:143. doi: 10.3389/fmicb.2013.00143
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2009). Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiol.* 26, 827–833. doi: 10.1016/j.fm.2009.05.010
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiol.* 31, 1–8. doi: 10.1016/j.fm.2012.01.006

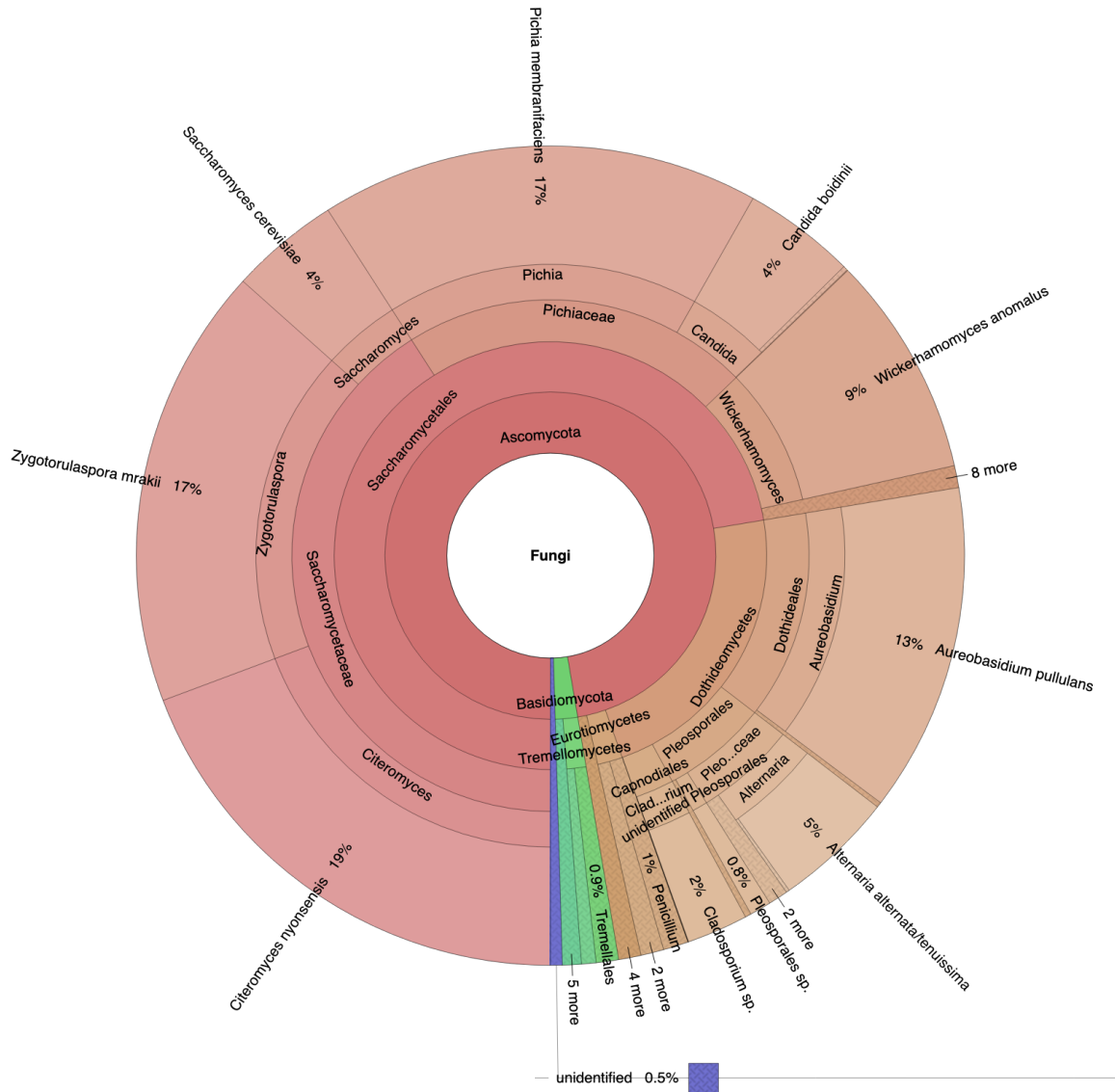
- International Olive Council (2019). *Economic Affairs and Promotion Unit "World Table Olives Exports & Imports" International Olive Council Website*. Available online at: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2020/04/HO-W901-29-11-2019-P.pdf> (accessed August, 2020).
- Jacques, N., Louis-Mondesir, C., Coton, M., Coton, E., and Casaregola, S. (2014). Two novel *Saccharomycopsis* species isolated from black olive brines and a tropical plant. *Description of Saccharomycopsis olivae f. a., sp. nov. and Saccharomycopsis guyanensis f. a., sp. nov. Reassignment of Candida amapae to Saccharomycopsis amapae f. a., comb. nov., Candida lassenensis to Saccharomycopsis lassenensis f. a., comb. nov. and Arthroascus babjevae to Saccharomycopsis babjevae f. a. comb. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2169–2175. doi: 10.1099/ij.s.0.06041860410
- Johnson, R. L., and Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *J. Food Q.* 2018:e3193185.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucl. Acids Res.* 41:e1. doi: 10.1093/nar/gks808
- Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1216–1223. doi: 10.1128/jcm.35.5.1216-1223.1997
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Statist. Soft.* 25, 1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Gen. Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550558
- Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *Peer J.* 3:e1420. doi: 10.7717/peerj.1420
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8:e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLoS Comput. Biol.* 10:e1003531. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003531
- Medina, E., Ruiz-Bellido, M. A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Montes-Borrego, M., Landa, B. B., et al. (2016). Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 236, 47–55. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.014
- Medina-Pradas, E., Pérez-Díaz, I. M., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2017). "Chapter 9 - Review of Vegetable Fermentations With Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage," in *The Microbiological Quality of Food Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, eds Edn, eds A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia (Cambridge: Woodhead Publishing), 211–236. doi: 10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E., and Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 396–405. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x
- Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., and Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Lett. Appl. Microbiol.* 34, 173–177. doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01077.x
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., et al. (2013). Vegan: Community Ecology Package. *R Package Ver.* 2(9), 1–295.
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., and Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12:385. doi: 10.1186/1471-2105-12385
- Ozdemir, Y., Guven, E., and Ozturk, A. (2014). Understanding the characteristics of oleuropein for table olive processing. *J. Food Process. Technol.* 5, 1–5.
- Panagou, E. Z., and Tassou, C. C. (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. *Conservolea green olives*. *Food Microbiol.* 23, 738–746. doi: 10.1016/j.fm.2006.02.005
- Ramírez, E., Brenes, M., García, P., Medina, E., and Romero, C. (2016). Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chem.* 206, 204–209. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.03.061
- Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., and Caggia, C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of *Nocellara Etnea* table olives. *Food Microbiol.* 65, 136–148. doi: 10.1016/j.fm.2017.01.022
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C. L., Caggia, C., and Spagna, G. (2011). An alkaline  $\beta$ -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Res.* 11, 487–493. doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00738.x
- Romeo, F. V. (2012). "Microbiological Aspects of Table Olives," in *Olive Germplasm - The Olive Cultivation. Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*, I. Muzzalupo (Lisbon: In tech). doi: 10.5772/51479
- Safari, Z., Bruneau, A., Monnoye, M., Mariadassou, M., Philippe, C., Zatloukal, K., et al. (2020). Murine Genetic Background Overcomes Gut Microbiota Changes to Explain Metabolic Response to High-Fat Diet. *Nutrients* 12:287. doi: 10.3390/nu12020287
- Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., and Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 1163–1168. doi: 10.1007/s11746-999-0090-7
- Selli, S., Kelebek, H., Kesen, S., and Sonmezdag, A. S. (2018). GC-MS olfactometric and LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of key odorants and phenolic compounds in black dry-salted olives. *J. Sci. Food Agric.* 98, 4104–4111. doi: 10.1002/jsfa.8927
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. doi: 10.1021/ac051437y
- Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiol.* 19, 605–615. doi: 10.1006/fmic.2002.0480
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS One* 7:e40863. doi: 10.1371/journal.pone.0040863
- Tufariello, M., Durante, M., Ramires, F. A., Grieco, F., Tommasi, L., Perbellini, E., et al. (2015). New process for production of fermented black table olives using selected autochthonous microbial resources. *Front. Microbiol.* 6:1007. doi: 10.3389/fmicb.2015.01007
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). "38 - AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS," in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego: Academic Press), 315–322. doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd Edn. Berlin: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-24277-4

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Penland, Deutsch, Falentin, Pawtowski, Poirier, Visenti, Le Meur, Maillard, Thierry, Mounier and Coton. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

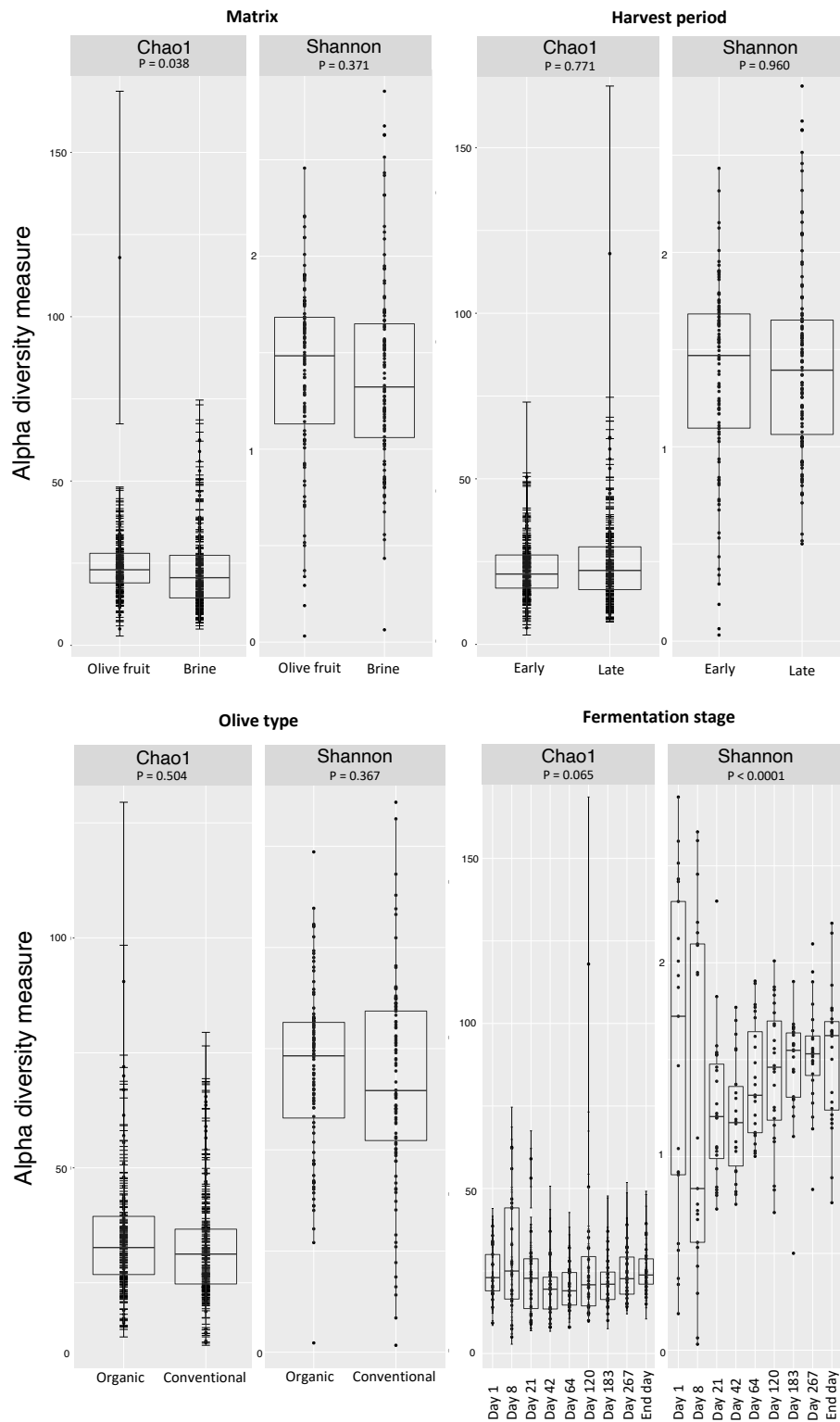
# Supplementary Material article 2

## 1. Supplementary Figures



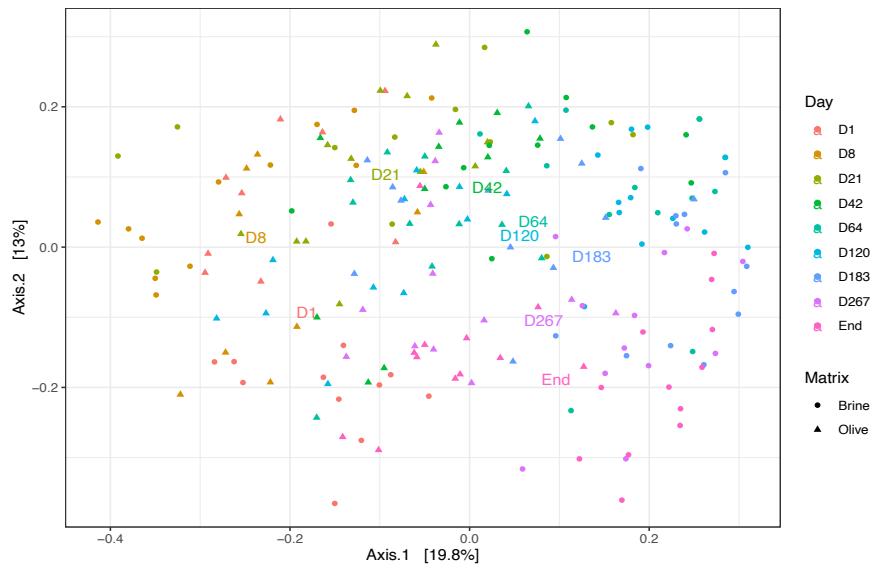
**Supplementary Figure S1.** Global fungal community composition of Nyons table olives based on ITS2 metabarcoding sequencing data.





**Supplementary Figure S2.** Alpha-diversity indexes of fungal communities based on ITS2 metabarcoding sequencing data. Pvalues based on Kruskal-Wallis test (threshold 0.05) are given under each index.

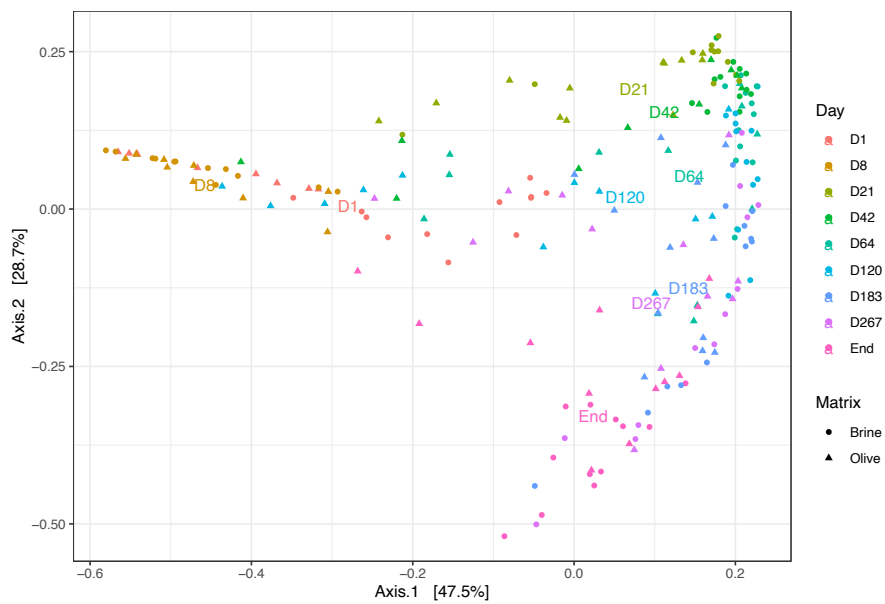
A



Adonis test

Stage	Matrix
P = 0.001	P = 0.001
R <sup>2</sup> = 0.26	R <sup>2</sup> = 0.05

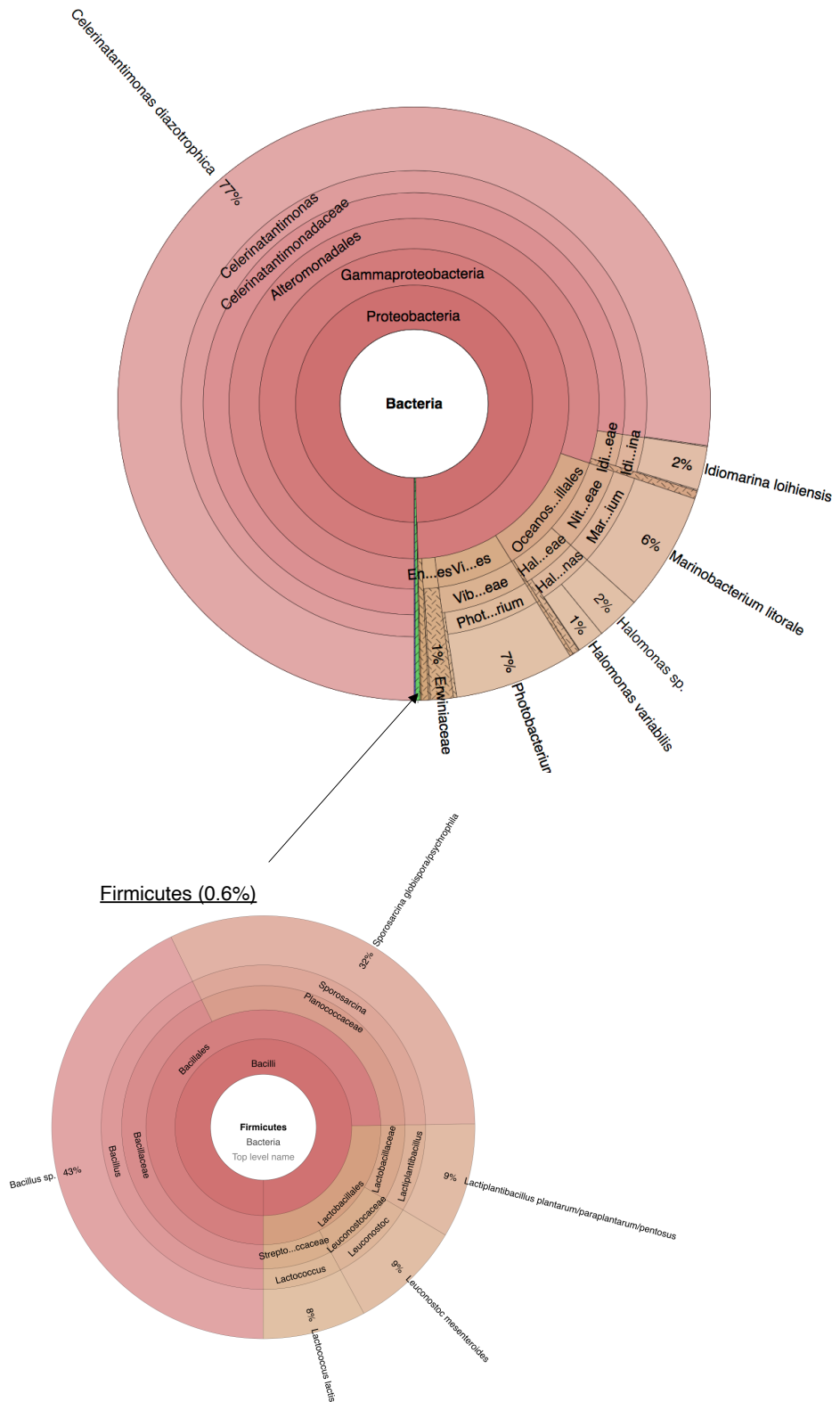
B



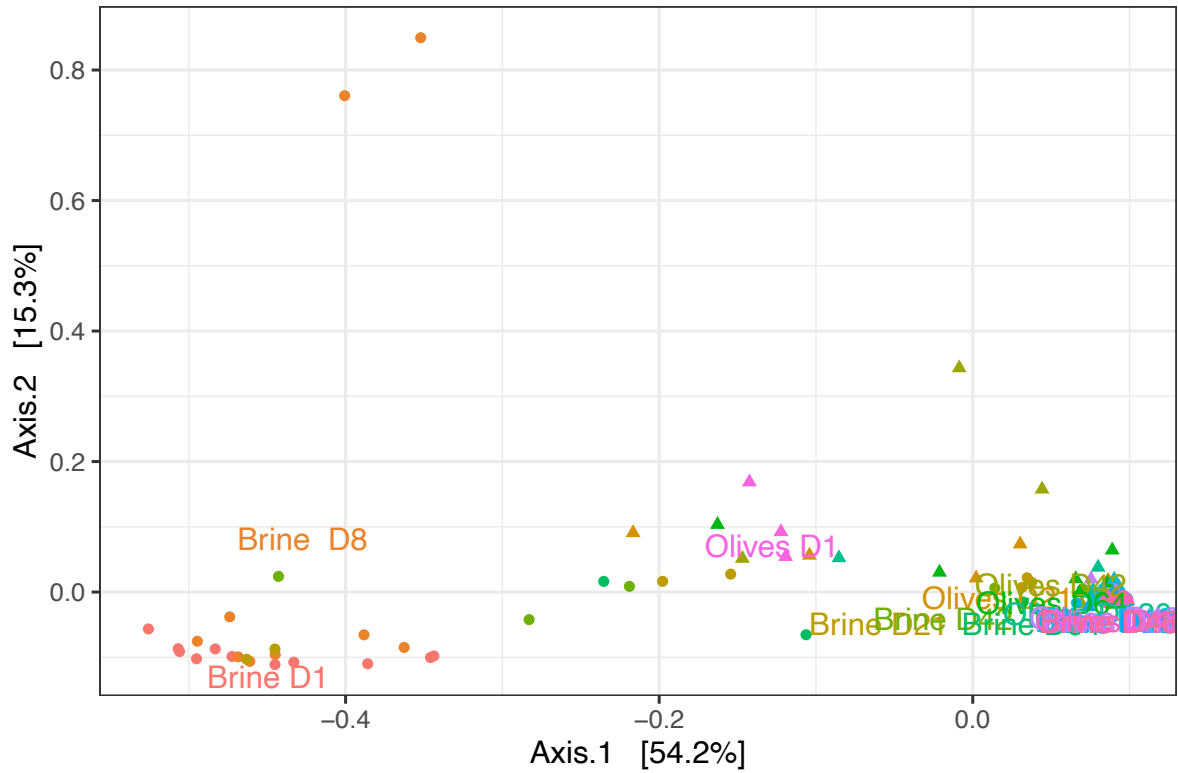
Adonis test

Stage	Matrix
P = 0.001	P = 0.001
R <sup>2</sup> = 0.54	R <sup>2</sup> = 0.02

**Supplementary Figure S3.** Principal Coordinates analysis (PCoA) based on (A) unweighted Unifrac and (B) weighted Unifrac distances between fungal communities. P and R<sup>2</sup> values were obtained using Adonis test with 999 permutations for significance testing and partitioning of variance according to fermentation stage and matrix (Brine VS Olive) factors.



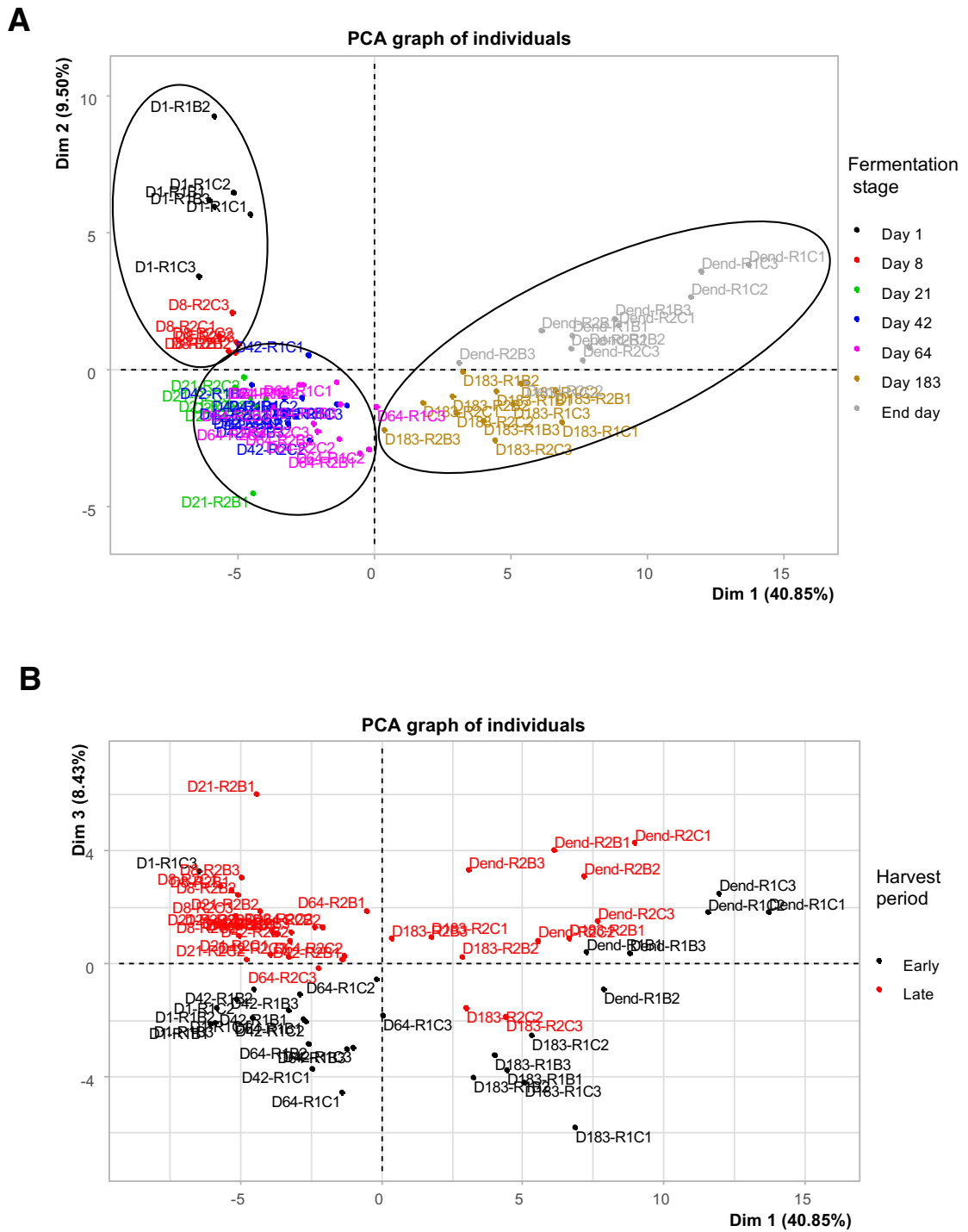
**Supplementary Figure S4.** Global bacterial community composition of Nyons table olives based on V3-V4 region of 16S rRNA gene metabarcoding sequencing data.



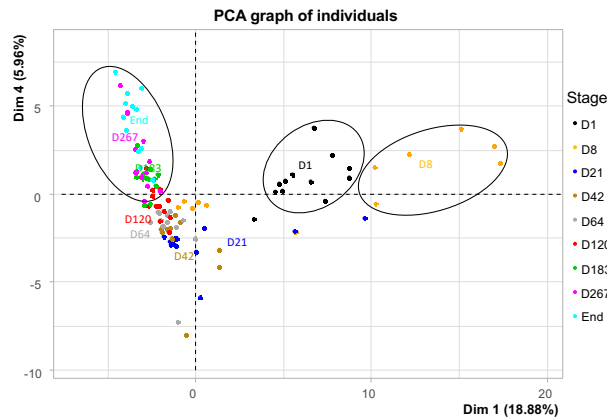
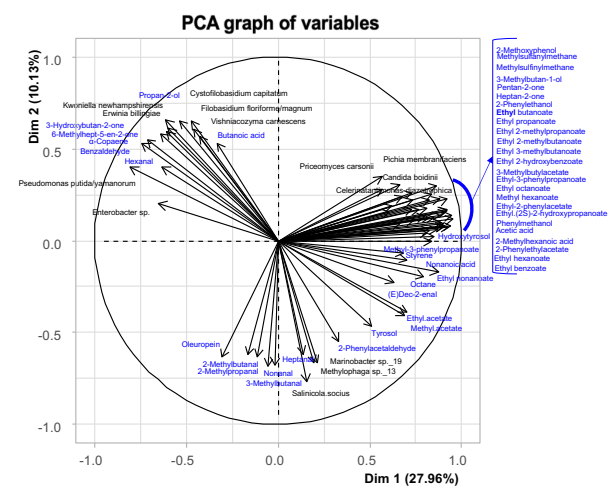
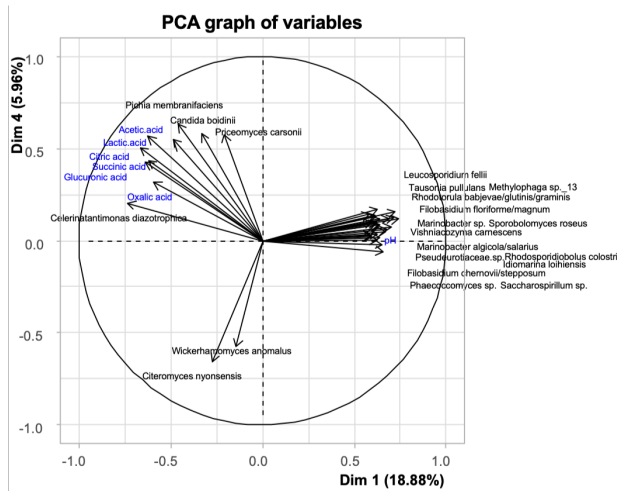
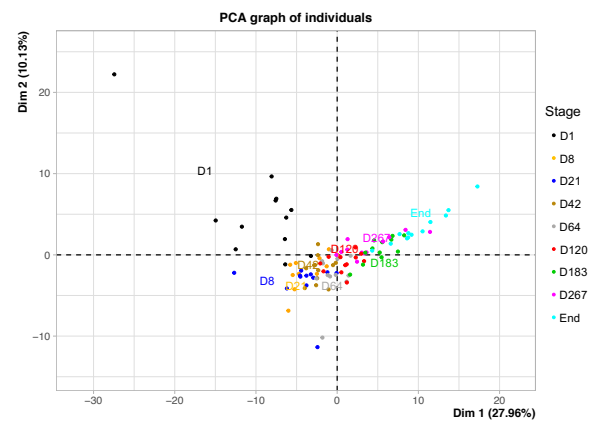
Adonis test

Stage	Matrix
P = 0.001	P = 0.001
R <sup>2</sup> = 0.26	R <sup>2</sup> = 0.03

**Supplementary Figure S5.** Principal Coordinates analysis (PCoA) based on unweighted Unifrac distances between bacterial communities. P and R<sup>2</sup> values were obtained using Adonis test with 999 permutations for significance testing and partitioning of variance according to fermentation stage and matrix (Brine VS Olive) factors.



**Supplementary Figure S6.** PCA plots of volatile compounds from the 67 volatile compounds detected during Nyons table olive fermentations. The first 3 dimensions explained 58.78% of the total variance. (A) PCA score plot showing principal component 1 (Dim1) versus 2 (Dim2); (B) PCA score plot showing principal component 1 (Dim1) versus 3 (Dim3).

**A****B**

**Supplementary Figure S7.** Principal component analyses of microbial culture-independent and biochemical data (acids and volatile compounds in blue) throughout fermentation in brine (**A**) and in olive fruit (**B**). For both matrices, individual and variable plots are presented with sampling times considered as individuals. Variable plots considered species abundances (black) and organics acid concentration for brine and volatile compounds for olive fruit (blue).

## 2. Supplementary tables

**Supplementary Table S1.** Primers used in this study

Primer	Sequence	Target	Reference
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS region	White et al. (1990)
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
Bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3'	$\beta$ -tubulin gene	Glass and Donaldson (1995)
Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'		
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	D1-D2 domain	Kurtzman and Robnett (1997)
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'		
fD1	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	16S rRNA gene	Weisburg et al. (1991)
rP2	5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'		
S-D-Bact-0341-b-S-17	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'	V3-V4 region of 16S rDNA gene	Klindworth et al. (2013)
S-D-Bact-0785-a-A-21	5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'		
ITS3f	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'	ITS2 region	Toju et al. (2012)
ITS4_Kyo1	5'-TCCTCCGCTTWTGWTGTC-3'		

**Supplementary Table S2.** Identification based on 16S rRNA gene sequencing of bacteria isolated from Nyons table olives during fermentation

Taxonomy						Fermentation*	Number of isolates			
Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species		Day 1	Day 64	Day 183	Total
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	R1-Orga	0	1	0	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	R1-Orga ; R1-Conv ; R2-Orga ; R2-Conv	0	0	1	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	R1-Orga ; R1-Conv ; R2-Orga ; R2-Conv	2	2	2	6
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	R1-Orga ; R2-Conv	0	2	1	3
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus</i> sp.	R2-Conv	0	0	1	1
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>	R1-Conv	0	0	1	1
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Lactobacillaceae	<i>Lacticaseibacillus</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	R2-Orga	1	0	0	1
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	R1-Orga	2	0	0	2
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	R2-Orga	4	0	0	4
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	R1-Conv ; R2-Corga ; R2-Conv	0	4	0	4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Raoultella</i>	<i>Raoultella terrigena</i>	R1-Orga ; R2-Orga	4	0	0	4
Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Ralstonia</i> sp.	R1-Conv ; R2-Corga ; R2-Conv	0	4	0	4
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Oceanospirillales	Halomonadaceae	<i>Halomonas</i>	<i>Halomonas alkaliantarctica</i>	R1-Conv ; R2-Conv	4	0	0	4

\*R1-Orga: Early harvest-Organic olives; R1-Conv: Early harvest-Conventional olives ; R2-Orga: Late harvest-Organic olives; R2-Conv: Late harvest-Conventional olives.



**Supplementary Table S3.** Organic acid quantification during Nyons table olive fermentations using LCMS and HPLC. Mean values of 3 replicates  $\pm$  standard deviation are given. Means with different letters in each column and each fermentation are significantly different (Tukey's test  $p < 0.05$ ).

Sampling day	pH	Total acid (mM)	Acetic acid	Citric acid	Gluconic acid	Glucuronic acid	Lactic acid	Malic acid	Oxalic acid	Succinic acid
<b>pvalue</b>										
Harvest	-	-	0.16	< 0.0001	0.911	0.002	0.006	< 0.0001	0.794	< 0.0001
Olive type	-	-	0.39	0.14	0.149	0.237	< 0.0001	0.74	0.016	0.279
Stage	-	-	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<b>R1-Orga</b>										
day 1	7.58 $\pm$ 0.04	0	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
day 21	4.95 $\pm$ 0.11	12.90	47.1 $\pm$ 9.8ab	1052.6 $\pm$ 181.8ab	46.3 $\pm$ 13.2ab	20.5 $\pm$ 7.2ab	113.8 $\pm$ 152.5a	167.6 $\pm$ 160.3a	177.4 $\pm$ 47.4ab	213.4 $\pm$ 183.1ab
day 42	4.68 $\pm$ 0.08	22.00	291.2 $\pm$ 140.3ab	1495.9 $\pm$ 451.3abc	46.7 $\pm$ 19.4bc	28.5 $\pm$ 12.1ab	196.2 $\pm$ 141.7ab	110.2 $\pm$ 127.1a	246.2 $\pm$ 108ab	383.2 $\pm$ 135.6bc
day 64	4.66 $\pm$ 0.08	38.38	708.7 $\pm$ 201.8ab	2307.6 $\pm$ 777.7bc	64.5 $\pm$ 24.9bcd	39.7 $\pm$ 19.2abc	340.3 $\pm$ 163.5ab	175.3 $\pm$ 119a	410.8 $\pm$ 170.9b	518.2 $\pm$ 100.9bcd
day 120	4.52 $\pm$ 0.03	52.52	988.5 $\pm$ 182.2ab	2829 $\pm$ 581.3cd	65.2 $\pm$ 12.4cde	60.2 $\pm$ 18.2bcd	783.8 $\pm$ 196.8ab	185.8 $\pm$ 182.3a	486.6 $\pm$ 74.6bc	614.1 $\pm$ 102.8cde
day 183	4.56 $\pm$ 0.05	77.05	1417.5 $\pm$ 133.2bc	4113.6 $\pm$ 634.7d	53.1 $\pm$ 8.8cde	81.5 $\pm$ 22.7cd	1275 $\pm$ 429.7ab	74.7 $\pm$ 37.9a	829.4 $\pm$ 114.6cd	876.5 $\pm$ 183.7cde
day 267	4.36 $\pm$ 0.02	103.07	2613.1 $\pm$ 1340.5c	4368.6 $\pm$ 848.3de	55.1 $\pm$ 5.5cde	82.9 $\pm$ 17cd	1583.5 $\pm$ 724b	106.4 $\pm$ 76.2a	1012.7 $\pm$ 204.2d	766.4 $\pm$ 110.8cde
day 482	4.47 $\pm$ 0.04	127.69	2719.4 $\pm$ 119.1c	6015.9 $\pm$ 833.5e	44 $\pm$ 5.5e	94.6 $\pm$ 19.4d	3020.8 $\pm$ 1110.1c	110.8 $\pm$ 48.2a	960.4 $\pm$ 232.4d	632.3 $\pm$ 97e
<b>R1-Conv</b>										
day 1	7.67 $\pm$ 0.02	0.00	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
day 21	4.75 $\pm$ 0.11	13.16	53.1 $\pm$ 5.2a	1119 $\pm$ 133.2ab	29.3 $\pm$ 0.5ab	15.6 $\pm$ 0.2ab	160.6 $\pm$ 146.9a	284 $\pm$ 15.7b	193.1 $\pm$ 124.2a	21.1 $\pm$ 12a
day 42	4.57 $\pm$ 0.04	33.36	751.2 $\pm$ 172.6ab	1986.5 $\pm$ 483.9bc	45.7 $\pm$ 14.2b	23.3 $\pm$ 4.5ab	221.7 $\pm$ 22.4a	393.5 $\pm$ 67.3b	373.1 $\pm$ 157.9ab	72.6 $\pm$ 6.9a
day 64	4.56 $\pm$ 0.03	39.77	877.3 $\pm$ 242.6ab	1987.9 $\pm$ 540.5bc	39.2 $\pm$ 19.4b	24.6 $\pm$ 8.2ab	613.8 $\pm$ 75.5a	414.3 $\pm$ 81.6b	326.1 $\pm$ 132.2ab	113.6 $\pm$ 44.7a
day 120	4.49 $\pm$ 0.06	60.75	1293.8 $\pm$ 601.1bc	3538.1 $\pm$ 524.2cd	41.8 $\pm$ 14b	47.1 $\pm$ 15.9abc	589 $\pm$ 92.7a	15.3 $\pm$ 26.2a	691.3 $\pm$ 55.2bc	708.5 $\pm$ 96.2b
day 183	4.51 $\pm$ 0.02	92.97	1557.4 $\pm$ 322.8bcd	4298.2 $\pm$ 864.8de	47.7 $\pm$ 10.7b	58.7 $\pm$ 25.6bc	2353.1 $\pm$ 726.1b	53.7 $\pm$ 26.3a	1020.1 $\pm$ 173.1c	740.2 $\pm$ 197.2b
day 267	4.37 $\pm$ 0.05	124.74	1974.5 $\pm$ 520.9cd	5443.3 $\pm$ 1091e	41.8 $\pm$ 14b	62.5 $\pm$ 29.4bc	4192 $\pm$ 313.2c	60.7 $\pm$ 39.3a	929.5 $\pm$ 232.5c	670.8 $\pm$ 127.2b

day 482	4.46 ± 0.06	148.98	2274 ± 339.9d	5901 ± 635.3e	43.8 ± 9.8b	87.4 ± 36.8c	5736.4 ± 451.3d	ND	883.9 ± 239.7c	654.6 ± 124.2b
<b>R2-Orga</b>										
day 1	7.42 ± 0.02	0.00	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
day 8	5.26 ± 0.02	5.72	0 a	706 ± 64.8ab	49 ± 0.7a	5.7 ± 0.9a	0	228.5 ± 15.3a	0 a	7.6 ± 1.9a
day 21	4.91 ± 0.21	14.10	176.5 ± 352.7ab	1166.2 ± 658.1ab	52.8 ± 20.3a	21.1 ± 3.4a	0 ± 0a	332.3 ± 75.2a	167.3 ± 151.7a	44 ± 26.7a
day 42	4.47 ± 0.06	46.09	1093.9 ± 150.5abc	1811.1 ± 681.5ab	29.7 ± 8.3a	25.4 ± 8a	828.8 ± 257.6ab	389.9 ± 111a	422.6 ± 413.4a	161 ± 38.8a
day 64	4.4 ± 0.03	46.01	913.2 ± 705.6abcd	2075.5 ± 1050.3ab	18.5 ± 6.4ab	22.2 ± 11.8a	990.4 ± 437.4ab	372.3 ± 181a	422 ± 121.9a	157.2 ± 43.5ab
day 120	4.38 ± 0.03	34.16	777.9 ± 582.5bcde	1598 ± 841.5ab	24.7 ± 10.4abc	32.6 ± 19.6a	427.5 ± 207.9ab	382.7 ± 226.8a	301.9 ± 203.1a	194.3 ± 88.2abc
day 183	4.39 ± 0.03	69.21	2098.1 ± 247.6cde	2313.7 ± 1063.4ab	27.2 ± 13.3bc	37.5 ± 24a	942.4 ± 371.3a	317 ± 304.7a	576.7 ± 460.1a	315.2 ± 109.6bc
day 267	4.13 ± 0.06	68.56	1488.1 ± 404.5de	3288.6 ± 1481.4b	33 ± 19.8bc	44 ± 28.5a	1223 ± 297.5a	350.2 ± 307.9a	670.5 ± 459a	310.9 ± 93bc
day 462	4.35 ± 0.08	74.20	1828.2 ± 307.5e	3526.5 ± 1765.7b	46.1 ± 23.2c	53.4 ± 37.3a	836.5 ± 613.8a	295.2 ± 192.9a	903.4 ± 891.9a	397.6 ± 127.9c
<b>R2-Conv</b>										
day 1	7.44 ± 0.04	0.00	0 a	0 a	0 a	0a	0a	0a	0 a	0 a
day 8	5.22 ± 0.02	4.10	0 a	464.2 ± 53.2ab	35 ± 6.3ab	3.8 ± 0.7ab	0 ± 0a	198.5 ± 47.4a	0 a	0.9 ± 0.4a
day 21	5.1 ± 0.01	12.88	0 a	826.7 ± 157.4abc	83.6 ± 29.6cd	12.7 ± 3.8abc	56.1 ± 52.3a	318.6 ± 98.3a	434.5 ± 173ab	30.4 ± 11.7a
day 42	4.83 ± 0.12	33.67	182.9 ± 28.2a	1593.2 ± 391bcd	113 ± 23.8d	25.2 ± 6.8abcd	538.6 ± 113.8b	418.5 ± 148.1a	1017.6 ± 467.1ab	144.9 ± 38.6a
day 64	4.69 ± 0.05	37.10	191 ± 38.3a	2085.2 ± 639.2cde	62.5 ± 15.1bc	33.1 ± 13.6bcde	1126.4 ± 281c	467.9 ± 156.8a	445.9 ± 282abc	192.9 ± 7.7a
day 120	4.54 ± 0.03	47.69	749.9 ± 440.3ab	2190 ± 354.3de	41 ± 14.3abc	33.6 ± 7.1bcde	1106.3 ± 171.1c	352.8 ± 305.5a	526.8 ± 94.9bc	313.6 ± 194.2ab
day 183	4.5 ± 0.04	78.86	1893 ± 746bc	3159.3 ± 722.1ef	35.4 ± 3ab	41.7 ± 11cde	1390.1 ± 110.5cd	164.5 ± 282.6a	781.6 ± 374.2bc	609.7 ± 281.6bc
day 267	4.28 ± 0.06	92.45	2279.5 ± 943.8bc	3563.4 ± 579f	48.7 ± 11.1bc	54.6 ± 14.3de	1668.9 ± 95.3d	68.3 ± 52a	919.2 ± 273bc	728.6 ± 130.1bc
day 462	4.39 ± 0.07	100.58	1752.5 ± 16.2c	4152 ± 619.2f	46.8 ± 7.1bc	59.6 ± 19.8e	2629.6 ± 331.1e	133.7 ± 94.1a	1208.7 ± 119c	664.5 ± 140.9c

R1-Orga: Early harvest-Organic olives; R1-Conv: Early harvest-Conventional olives ; R2-Orga: Late harvest-Organic olives; R2-Conv: Late harvest-Conventional olives.

**Supplementary Table S4.** Volatile compounds identified during Nyons table olive fermentation using HS-GC-MS

Family	Compound	N° Pubchem	LRI <sup>a</sup>	EIC (m/z)	Identification <sup>b</sup>	Pvalue <sup>c</sup>			Group <sup>d</sup>	Odor descriptor <sup>e</sup>
						Harvest	Olive type	Stage		
<i>Alcohols</i>	Ethanol	702	931	45	RI, DB, S	8.48E-02	1.00E-01	9.31E-01	-	Alcoholic
	Hexan-1-ol	8103	1382	56	RI, DB	<b>3.95E-07</b>	<b>1.61E-09</b>	<b>9.54E-08</b>	III	Green, fruity, pear
	3-Methylbutan-1-ol	31260	1222	55	RI, DB, S	3.13E-01	<b>1.37E-02</b>	<b>2.52E-21</b>	III	Fermented, fruity, pungent
	Phenylmethanol	244	-	108	DB	8.16E-02	7.59E-01	<b>4.05E-20</b>	III	Floral, rose, phenolic
	2-Phenylethanol	6054	-	91	DB	6.21E-01	7.61E-01	<b>1.15E-10</b>	II	Floral, sweet, rosey
	Propan-2-ol	3776	923	59	RI, DB	5.73E-01	9.90E-01	<b>2.29E-25</b>	I	Alcoholic
<i>Aldehydes</i>	Benzaldehyde	240	1518	106	RI, DB, S	<b>5.79E-03</b>	<b>2.05E-03</b>	<b>4.84E-30</b>	I	Almond
	(E)-Dec-2-enal	5283345	1638	83	RI, DB, S	7.92E-01	2.25E-01	<b>4.33E-19</b>	III	Fatty, green
	Hexanal	6184	1083	56	RI, DB	<b>7.09E-03</b>	5.43E-01	<b>2.12E-26</b>	I	Fatty, green, leafy
	Heptanal	8130	1185	70	RI, DB, S	1.18E-01	1.16E-01	<b>8.42E-04</b>	I	Tallowy, green
	2-Methylbutanal	7284	905	57	RI, DB, S	<b>2.43E-06</b>	1.29E-01	<b>3.54E-02</b>	II	Malty, nutty
	3-Methylbutanal	11552	909	44	RI, DB, S	<b>2.08E-03</b>	9.58E-01	2.58E-01	-	Malty
	2-Methylpropanal	6561	801	72	RI, DB, S	<b>6.97E-08</b>	6.87E-01	<b>2.91E-04</b>	I	Cooked-caramel
	Octanal	454	1284	84	RI, DB, S	5.01E-01	7.05E-02	<b>6.97E-04</b>	III	Fatty, green
	2-Phenylacetaldehyde	998	1642	91	RI, DB	6.15E-01	1.93E-01	<b>2.22E-02</b>	-	Honey, floral rose, fermented,
	4-Propylbenzaldehyde	120047	-	148	DB	<b>2.10E-02</b>	9.37E-02	<b>1.10E-15</b>	II	-
	Nonanal	31289	1392	98	RI, DB	<b>3.39E-02</b>	5.80E-01	<b>3.24E-03</b>	I	Fatty, waxy
	<i>Esters</i>	Ethyl acetate	8857	876	61	RI, DB, S	8.79E-01	<b>1.53E-02</b>	<b>3.21E-19</b>	II
Ethyl benzoate		7165	1664	105	RI, DB	8.23E-02	3.81E-01	<b>1.01E-20</b>	III	Mild, fruity, cooked
Ethyl butanoate		7762	1033	71	RI, DB, S	3.56E-01	1.07E-01	<b>5.11E-25</b>	III	Sweet, fruity
Ethyl hexanoate		31265	1233	88	RI, DB, S	<b>2.99E-03</b>	<b>1.44E-02</b>	<b>9.21E-08</b>	II	Sweet fruity
Ethyl (E)-hex-2-enoate		5364778	1342	97	RI, DB	<b>3.86E-05</b>	<b>3.38E-03</b>	<b>9.14E-03</b>	II	Rum, fruity, juicy
Ethyl 2-hydroxybenzoate		8365	-	120	DB	4.54E-01	4.97E-01	<b>3.00E-12</b>	III	Minty
Ethyl (2S)-2-hydroxypropanoate		92831	1346	75	RI, DB	3.85E-01	1.31E-01	<b>3.79E-20</b>	III	Fruity
Ethyl 2-methylbutanoate		24020	1050	57	RI, DB	<b>1.93E-02</b>	<b>7.51E-03</b>	<b>3.93E-21</b>	III	Sweet, fruity
Ethyl 3-methylbutanoate		7945	1069	115	RI, DB, S	4.36E-01	1.79E-01	<b>1.45E-17</b>	III	Sweet, fruity
Ethyl 3-methylbut-2-enoate		12516	1222	128	RI, DB	8.15E-02	<b>2.87E-02</b>	<b>8.05E-05</b>	III	-
Ethyl 2-methylpropanoate		7342	956	101	RI, DB	1.98E-01	<b>3.25E-04</b>	<b>2.55E-20</b>	III	Ethereal, fruity
Ethyl octanoate		7799	1436	88	RI, DB	<b>1.51E-09</b>	9.56E-01	<b>5.13E-20</b>	II	Fruity, winey
Ethyl nonanoate		31251	1537	101	RI, DB	<b>5.96E-03</b>	3.21E-01	<b>6.95E-17</b>	III	Fruity, rose, rum, wine
Ethyl 2-phenylacetate		7590	1805	91	RI, DB	<b>2.47E-09</b>	7.71E-02	<b>4.77E-25</b>	II	Sweet, floral honey
Ethyl 3-phenylpropanoate		16237	-	91	DB	<b>1.71E-03</b>	<b>2.11E-03</b>	<b>2.95E-23</b>	II	Floral, hyacinth, rose, honey
Ethyl (E)-3-phenylprop-2-enoate		637758	-	131	DB	5.69E-01	3.53E-01	<b>4.23E-08</b>	II	Fruity, balsamic
Ethyl propanoate		7749	947	102	RI, DB	6.90E-01	1.02E-01	<b>7.74E-16</b>	III	Fruity, winey
Hexyl acetate		8908	1272	56	RI, DB	<b>2.23E-07</b>	<b>2.07E-04</b>	1.22E-01	II	Fresh, sweet, floral, green
Methyl acetate		6584	814	74	RI, DB	6.82E-02	4.76E-01	<b>3.46E-18</b>	II	-
3-Methylbutyl acetate		31276	1134	87	RI, DB	<b>3.88E-03</b>	5.17E-01	<b>8.37E-28</b>	III	fruity, green ripe
Methyl hexanoate		7824	1188	74	RI, DB, S	<b>1.28E-07</b>	<b>8.41E-04</b>	<b>5.30E-15</b>	II	Fruity, pineapple, banana
Methyl octanoate		8091	1389	74	RI, DB, S	<b>2.27E-10</b>	8.59E-01	<b>8.69E-13</b>	II	Apple, apricot
Methyl 3-phenylpropanoate		7643	-	104	DB	<b>3.30E-02</b>	<b>6.00E-05</b>	<b>2.25E-22</b>	II	Honey, fruity, wine
2-Methylpropyl acetate	8038	1012	43	RI, DB	2.90E-01	2.25E-01	<b>8.08E-04</b>	III	Banana, apple	
2-Phenylethyl acetate	7654	-	104	RI, DB	2.34E-01	2.17E-01	<b>8.93E-26</b>	III	Sweet, honey, floral rosy	
Texanol	6490	-	71	DB	3.15E-01	4.41E-01	<b>1.30E-02</b>	II	Plastic	
<i>Fatty acids</i>	Acetic acid	176	1457	60	RI, DB, S	2.32E-01	1.40E-01	<b>1.47E-06</b>	III	Pungent, vinegar
	Butanoic acid	264	1637	73	RI, DB, S	1.30E-01	3.07E-01	<b>2.44E-07</b>	I	Acidic, buttery
	Hexanoic acid	8892	-	73	RI, DB	1.05E-01	<b>2.94E-03</b>	<b>2.03E-04</b>	I	Fruity, fatty sour
	4-Hydroxybutanoic acid	10413	1624	42	RI, DB	5.80E-01	<b>2.90E-03</b>	<b>1.56E-06</b>	II	-
	3-Methylbut-2-enoic acid	10931	-	82	RI, DB	5.75E-01	<b>5.73E-03</b>	<b>1.76E-07</b>	III	Green, phenolic
	2-Methylhexanoic acid	20653	1673	74	RI, DB	5.41E-01	9.60E-01	<b>8.38E-07</b>	III	Oily, creamy
	Nonanoic acid	8158	-	129	DB, S	2.42E-01	9.95E-01	<b>4.34E-06</b>	II	Fatty
	Octanoic acid	379	-	101	DB, S	3.91E-01	5.65E-01	<b>4.13E-05</b>	II	Oily, rancid, capric
	Propanoic acid	1032	1548	74	RI, DB, S	9.89E-01	4.60E-01	<b>2.15E-17</b>	III	Acidic, dairy, fruity
	Butane-2,3-dione	650	977	86	RI, DB, S	6.46E-01	<b>4.32E-02</b>	<b>4.97E-02</b>	-	Buttery
	Heptan-2-one	8051	1182	58	RI, DB, S	<b>1.64E-02</b>	9.56E-02	6.32E-02	-	Fruity, green banana
	3-Hydroxybutan-2-one	179	1279	88	RI, DB, S	3.84E-01	9.80E-01	<b>5.02E-12</b>	I	Sour milk
6-Methylhept-5-en-2-one	9862	1334	108	RI, DB	7.65E-01	1.20E-01	<b>6.53E-07</b>	I	Green, citrus	
Pentan-2-one	7895	967	86	RI, DB	<b>9.08E-03</b>	5.53E-01	<b>4.59E-17</b>	III	-	
1,2-Dimethoxybenzene	7043	1727	138	RI, DB	8.70E-02	1.10E-01	<b>1.40E-20</b>	III	Spicy, vanilla	
<i>Phenols</i>	4-Ethylphenol	31242	-	107	DB	<b>4.75E-02</b>	<b>4.95E-04</b>	<b>4.45E-11</b>	II	Phenolic, smoky
	2-Methoxyphenol	460	-	109	DB	7.61E-01	<b>3.54E-02</b>	<b>5.54E-21</b>	III	Phenolic, woody
<i>Others</i>	Phenol	996	-	94	DB	8.41E-01	<b>1.99E-02</b>	<b>8.17E-24</b>	III	Phenolic
	α-Copaene	19725	1483	119	RI, DB, S	<b>5.15E-03</b>	4.65E-01	<b>2.13E-04</b>	I	Woody, spicy, honey
	Methylsulfanylmethane	1068	736	62	RI, DB	1.74E-01	2.82E-01	<b>1.67E-06</b>	III	Sulfury
	Methylsulfinylmethane	679	1559	63	RI, DB	<b>7.28E-03</b>	1.79E-01	<b>2.99E-12</b>	III	Fatty, oily, salty
	(Methyltrisulfanyl)methane	19310	1368	126	RI, DB	6.69E-01	9.12E-01	9.74E-01	-	Sulfury
	Octane	356	786	85	RI, DB, S	1.16E-01	<b>1.42E-02</b>	<b>2.09E-24</b>	II	-
	Styrene	7501	1250	78	RI, DB	<b>8.00E-05</b>	<b>1.13E-02</b>	<b>5.62E-22</b>	II	Sweet, balsam, floral

<sup>a</sup> LRI = Linear Retention index on polar GC column - calculated based of retention time of n-alkane mixture injected in the column

<sup>b</sup> Identification performed based the following criteria: RI—comparison of LRI calculated with data published in the literature and in intern; DB—comparison of mass spectral data with those of NIST 2008 library ; and S—comparison of LRI with those of authentic standards injected in the same GC- MS system

## **IV. Étude 2 – Influence de l’environnement de production sur le microbiote des olives de Nyons**

### **▪ Contexte et objectif de l’étude**

La précédente étude a mis en évidence une communauté fongique complexe avec cinq espèces retrouvées systématiquement d’une fermentation à l’autre (*core* microbiote).

Ces cinq espèces étaient présentes en très faibles abondances, voir non détectées sur les olives fraîches, ce qui pose la question de l’origine de cette diversité.

Comme évoqué en introduction bibliographique, il a été démontré dans le cadre d’autres fermentations alimentaires, comme le fromage, que l’environnement de production pouvait être une source de micro-organismes pour la fermentation. De plus, les fermentations naturelles, par opposition à la plupart des fermentations industrielles, n’incluent pas d’étape de stérilisation ou de pasteurisation. De fait, elles sont plus exposées aux micro-organismes présents dans l’atmosphère, sur des surfaces ou des fluides au sein des locaux de production. Ces sources potentielles peuvent constituer un réservoir de micro-organismes désirables tout comme abriter des micro-organismes d’altération. Une contamination microbienne engendrant une altération peut être à l’origine de gaspillage, de pertes économiques et dans le pire des cas, représenter un danger pour la santé du consommateur selon la nature de l’agent microbien impliqué. Appréhender les vecteurs de contamination de l’environnement de production et identifier les sources de micro-organismes pour mieux les préserver peut permettre une meilleure conduite de la fermentation et une meilleure maîtrise des flux microbiens.

L’objectif de cette étude est donc d’évaluer l’influence de l’environnement de production et des matières premières en tant que sources de micro-organismes sur la composition des communautés microbiennes des olives de Nyons.

### **▪ Stratégie expérimentale et prélèvements d’environnement**

Cette étude a été menée en deux temps. Dans un premier temps, sept échantillons issus de fermentations d’olives de Nyons présentant une altération ont été analysés par analyse métagénomique et culture-dépendante pour énumérer des populations microbiennes majeures (levures, LAB, populations halotolérantes, enterobactéries). Les échantillons provenaient de

la coopérative Vignolis et présentaient le même profil d'altération : une forte odeur de fruit trop mûr et d'acide acétique se dégageait à l'ouverture, la saumure présentait un aspect trouble et plus visqueux que des échantillons conformes. Les communautés microbiennes de ces échantillons ont été comparées à celles d'olives de Nyons conformes (issues de l'étude 1) afin d'identifier les micro-organismes impliqués dans cette altération.

Dans un second temps, seize échantillons environnementaux issus d'une campagne de prélèvement au sein de la coopérative ont été analysés par analyse métagénomique. Les prélèvements avaient été effectués au cours des suivis de fermentation rapportés en étude 1, sur des surfaces de matériaux, des machines et des fluides stagnants autour des cuves et comprenaient également des intrants assimilables à des matières premières tel que le sel sec utilisé pour la préparation de la saumure. Le détail des différents échantillons et leur zone de prélèvement au sein des locaux sont donnés en **Tableau 1** de l'**article 3**. Les résultats obtenus ont été utilisés pour comparer la composition des communautés avec celle des échantillons d'olives de Nyons conformes et altérés. L'outil SourceTracker a ainsi été utilisé pour identifier les sources des micro-organismes parmi les échantillons prélevés, complété par une analyse qualitative pour évaluer l'influence globale de l'environnement sur les fermentations d'olives de Nyons.

**Ces travaux ont fait l'objet de l'article 3 (soumis) présenté en partie V du présent chapitre et dont les résultats majeurs sont rapportés ci-après.**

- Caractéristiques des communautés microbiennes des échantillons altérés

Les échantillons altérés ont tous montré des caractéristiques microbiennes similaires. Ils présentaient une forte population lactique avec des niveaux atteignant 3.8-4.8 log<sub>10</sub> CFU/g contrairement aux fermentations conformes (sous le seuil de détection). Ceci s'est confirmé suite à l'analyse métagénomique. Les communautés bactériennes des échantillons altérés ont montré une plus forte diversité et complexité que les fermentations classiques, que ce soit dans la saumure ou les olives avec plus de 79 OTUs bactériens spécifiques à ces échantillons. Parmi ces OTUs se trouvaient les espèces dominantes des échantillons altérés : *Lentilactobacillus parafarraginis* et *Lentilactobacillus buchneri* dans la saumure et *Pediococcus parvulus* dans les olives.

Des différences ont également été mises en évidence au niveau des communautés fongiques portant sur des différences d'abondances de micro-organismes entre produit conforme et altéré. De manière générale, les échantillons altérés se caractérisaient par une dominance plus

marquée de *P. membranifaciens*. D'autres espèces comme *Penicillium carneum*, *Candida spencermartinsiae* et *Botrytis* sp. ont également été identifiées dans ces échantillons à des abondances significativement supérieures aux échantillons conformes.

▪ Impact de l'environnement et des matières premières sur les communautés fongiques des olives.

La composition fongique des échantillons environnementaux a montré que les levures successivement dominantes au cours de la fermentation étaient aussi largement présentes dans l'environnement de production. L'analyse SourceTracker menée sur les différents échantillons a révélé une forte contribution de certains échantillons environnementaux, de la saumure et du sel sec à la diversité observée dans les olives de Nyons conformes mais également altérées. Étonnamment, la contribution des olives fraîches semblait limitée en comparaison, soulignant le rôle de l'environnement dans la formation des communautés microbiennes rencontrées au cours de la fermentation.

▪ Impact de l'environnement et des matières premières sur les communautés bactériennes des olives

Les résultats de l'analyse SourceTracker ne se sont pas révélés informatifs en raison d'un trop faible nombre de séquences pour certains échantillons environnementaux. Une approche qualitative a été employée alternativement en comparant les OTUs communément retrouvés dans les différents catégories d'échantillons (matières premières, environnement de production, échantillons altérés et conformes). Les résultats ont souligné la faible diversité bactérienne (< 15 OTUs) des matières premières comparée à celle rencontrée dans les échantillons d'environnement (jusqu' à 73 OTUs dans certains échantillons). Les résultats les plus intéressants concernaient les espèces partagées entre toutes les catégories (matières premières, environnement de production, olives conformes et altérées). *C. diazotrophica* était ainsi retrouvée dans de nombreux prélèvements environnementaux. Par ailleurs, les bactéries lactiques précédemment identifiées dans les échantillons altérés, *L. parafarraginis*, *L. buchneri*, *P. parvulus*, ont été retrouvées dans certains échantillons d'environnement et, dans une moindre mesure, dans les matières premières. *Pediococcus ethanolidurans*, *Ligilactobacillus acidiscipis* et *Secundilactobacillus paracollinoides* également abondamment présentes dans les échantillons altérés n'étaient présentes que dans les échantillons d'environnement et non dans les matières premières.

## ▪ Conclusion à l'issue de l'étude 2

Cette étude a montré les impacts, positif et négatif, de l'environnement de production sur la fermentation des olives de Nyons. Les micro-organismes considérés comme dominants au cours de la fermentation sont omniprésents dans l'environnement de production et celui-ci constitue donc un réservoir important de la diversité microbienne associée aux olives fermentées. Concernant l'altération étudiée, les bactéries lactiques normalement absentes des fermentations conformes des olives de Nyons ont été identifiées comme agent responsable. Ce résultat nuance la notion établie que les bactéries lactiques jouent un rôle dans la fermentation des olives, puisque dans le cas des olives de Nyons, elles sont associées à un défaut de qualité. Ceci souligne d'autant plus les spécificités microbiennes associées aux différents produits artisanaux pour un même aliment. Il est par ailleurs intéressant de noter que les espèces impliquées ont été retrouvées, bien qu'en faible abondance, uniquement dans l'environnement de production pour certaines espèces ou également dans les matières premières pour d'autres. Il apparaît donc que l'origine de cette altération est probablement liée à un défaut de conduite de la fermentation plutôt qu'à une contamination ponctuelle, ayant conduit les bactéries lactiques à supplanter les flores bactériennes habituellement retrouvées.

## **V. Article 3 soumis à Food Research International**

**Penland M.**, Mounier J., Pawtowski A., Treguer S., Deutsch S. and Coton M., 2020. Use of metabarcoding and source tracking to identify desirable or spoilage autochthonous microorganism sources during black olive fermentations. *Submitted to Food Research International.*



1 **Use of metabarcoding and source tracking to identify desirable or spoilage**  
2 **autochthonous microorganism sources during black olive fermentations**

3 Marine Penland<sup>1,2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup>, Audrey Pawtowski<sup>1</sup>, Sylvie Treguer<sup>1</sup>, Stéphanie-Marie  
4 Deutsch<sup>2</sup> & Monika Coton<sup>1\*</sup>

5 <sup>1</sup>Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280  
6 Plouzané, France

7 <sup>2</sup>STLO, INRAE, Institut Agro, 35042, Rennes, France

8

9 **\*Corresponding author:** Monika Coton

10 E-mail: [monika.coton@univ-brest.fr](mailto:monika.coton@univ-brest.fr)

## 11 **Abstract**

12 This study aimed at investigating the influence of process environment and raw materials as  
13 sources of microorganisms during fermentations of Nyons black natural table olives, by  
14 considering good quality fermentations and spoiled ones as sinks. Sampling was performed  
15 in one artisanal facility and consisted in 7 spoiled fermentation samples, 8 good quality  
16 (control) fermentations samples, 6 samples of raw materials including fresh olives, dry salt  
17 and 12 process environment samples collected all around the facility. Microbial diversity of  
18 all samples was analyzed using 16S and ITS2 amplicon sequencing and SourceTracker tool  
19 was used to investigate links between environment, raw materials and fermentation samples.  
20 First, comparison of microbial diversity in control and spoiled fermentations revealed striking  
21 differences in bacterial composition with an overall higher diversity in spoiled fermentations  
22 especially concerning lactic acid bacteria with *Lentilactobacillus buchneri*, *Lentilactobacillus*  
23 *parafarraginis* and *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus ethanolidurans* dominating in brine  
24 and olive fruit respectively. Fungal communities were similar in composition although higher  
25 abundances of *Pichia membranifaciens* and *Penicillium carneum/roqueforti* were observed  
26 in spoiled samples. Secondly, Process environment samples were characterized by a high  
27 bacterial and fungal diversity especially compared to fresh olive fruits. Overall, control  
28 fermentation dominant fungal species were widespread across the environment samples  
29 revealing a “house mycobiota”. SourceTracker analysis further highlighted the contribution  
30 of brine and the water out of optical sorter as a source of fungi. Most interestingly, spoilage  
31 fungi and mostly bacteria were retrieved in brine and environment samples while others such  
32 as *P. ethanolidurans* were only found in environment samples indicating that the studied  
33 spoilage originated from a fermentation deviation rather than a punctual contamination.  
34 Taken altogether, results highlighted the positive and negative influence of the process  
35 environment and emphasized the relevance of studying it to better understand microbial  
36 vectors occurring during food fermentations, specially artisanal ones.

37

38 **Keywords:** spontaneous fermentation, quality defect, metagenetics, process environment,  
39 Lactic acid bacteria, SourceTracker

40

## 41 1. Introduction

42 Table olives are among the most consumed fermented vegetables worldwide with nearly  
43 2.6 million tons produced in 2019 (International Olive Council, 2019). Although native to the  
44 Mediterranean region, they are produced and consumed worldwide. Table olives are highly  
45 appreciated by consumers for their pleasant tastes and aromas as well as for their health  
46 benefits (Conte et al., 2020). Table olives can be prepared under three main processes  
47 described as either the Spanish-style process (lye treated green olives prior to fermentation in  
48 brine), Californian-style preparation (ripe olives chemically oxidized) or Greek-style process  
49 (naturally fermented black olives in brine) (Romeo, 2012).

50 Nyons table olives are black table olives with PDO status produced in southern France.  
51 They are prepared using the Greek-style process and according to PDO specifications: Tanche  
52 variety olives, harvested at full maturity during the winter season, are directly submerged in  
53 10% salt brine and slowly fermented for up to 1.5 years. Nyons table olives microbiota was  
54 recently explored (Penland et al., 2020) and as often observed in many spontaneous or natural  
55 fermentations, harbored a very rich and complex microbiota. A core mycobiota, composed of  
56 *Wickerhamomyces anomalus*, *Citeromyces nyonsensis*, *Zygorhizula mrakii*, *Pichia*  
57 *membranifaciens* and *Candida boidinii*, was determined while the bacterial microbiota were  
58 less complex and dominated by *Celerinatantimonas diazotrophica* throughout all the studied  
59 fermentations.

60 Although the complex microbial diversity of naturally fermented table olives is often  
61 related to complex organoleptic characteristics, it can also harbour unwanted microorganisms  
62 which may compromise both product safety and quality. Bacteria-associated defects in  
63 fermented olives are most frequently linked to off-flavours and off-odors (Lanza, 2013) while  
64 fungal defects are often associated with visual defects such as cloudy brines or gas pocket  
65 formations under the olive skin, especially when fermentative yeast abundances are too high  
66 (Arroyo-López et al., 2012). So far, three main sensorial spoilage phenomena have been  
67 described in table olives: “Zapateria”, putrid and butyric defects which are linked to  
68 *Propionibacterium*, *Desulfovibrio* and *Clostridium* genera metabolisms, respectively.

69 Process environment has also been shown to be a major reservoir of microorganisms involved  
70 in the fermentation process of many foods. This has been particularly explored in cheese. It  
71 has now been well established that vats, milking materials and ripening trays all harbour  
72 microbial biofilms that can enrich the cheese microbiota (Calasso et al., 2016; Montel et al.,  
73 2014). In line with this, (Bokulich & Mills, 2013) also showed that dairy-plant surfaces

74 contributed to the cheese microbiota. In addition, artisanal and/or spontaneous fermentation  
75 processes imply higher exposition to contaminants through the process environment  
76 compared to automated industrial ones. Investigating the links between the microbial  
77 communities encountered during fermentation and the in-house microbiota is clearly of  
78 interest to better manage and control the fermentation process. Despite this fact, and to our  
79 best knowledge, no study has yet investigated the influence of the processing environment on  
80 olive table fermentations.

81 Recent studies on microbial communities in many foods have greatly benefited from state-  
82 of-the-art DNA-based and Next Generation Sequencing (NGS) techniques. Indeed, they  
83 provide in-depth and accurate data on microbial composition in a given sample and at a given  
84 time during fermentation without the fastidious need to cultivate microorganisms on a wide  
85 range of media and identify massive numbers of individual isolates. Thus, these techniques  
86 are used more frequently to compare food communities, monitor microbial changes during  
87 fermentation but also investigate potential microbial vectors. SourceTracker (Knights et al.,  
88 2011) is a relatively recent bioinformatic tool that aims at predicting the source of microbial  
89 communities in designated sink samples. It actually traces and proposes sources of  
90 microorganisms.

91 In this context, our study aimed at (i) identifying microbial species linked to spoiled Nyons  
92 table olives by comparing spoiled and control fermentation samples and (ii) investigating the  
93 impact of the raw materials and process environment on these samples using high-throughput  
94 screening (HTS) metagenetic analyses and SourceTracker tool.

95

## 96 **2. Material & methods**

### 97 **2.1. Sampling**

98 All samples used in this study and their codes are summarized in **Table 1**.

#### 99 **2.1.1. Control and spoiled Nyons table olive fermentation samples**

100 Control samples corresponded to both olive and brine samples from previously studied Nyons  
101 olive fermentations as reported by Penland et al. (2020). These samples were chosen as  
102 controls since they were fully characterized and the fermentation outcomes were consistent  
103 with PDO requirements and thus representative of typical Nyons table olive fermentations.  
104 These samples came from one harvest period (January 2018), from two different batches and

105 corresponded to raw materials at day 1 (fresh olive fruits and fresh brine) and fermentation  
106 samples at day 64, day 283 and day 483 (end of fermentation).

107 Spoiled samples corresponded to seven different olive batches from the 2016 harvest period.  
108 All batches presented similar spoilage profiles. They were characterized by a strong acetic  
109 and overripe-fruit smell. Brines were thicker and cloudier, while olive fruits were more friable  
110 or brittle (when cut) than control fruits. No visual defects such as discoloration or gas pockets  
111 were noticeable on the fruits.

112 All control and spoiled fermentation tanks were prepared with the traditional process  
113 described by PDO requirements: fresh olive fruits were washed in water, sorted on treadmills  
114 before being put in vats (300 kg) and submerged by 10% salt brines (200 L). Tanks were then  
115 closed with a heavy lid for the remaining of the fermentation.

116

### 117 **2.1.2. Raw materials and process environment samples**

118 Sampling was performed at different places in the production and storage facilities to track  
119 potential microbial sources. These samples were collected at the start (day 8) of the 2018  
120 harvest fermentations (control fermentations) from different zones in the Nyons olive  
121 production facility. Four surfaces were also analyzed by streaking swabs moistened with  
122 Tryptone Salt diluent (TS) over a 71 cm<sup>2</sup> area in different working zones. Finally, two dry  
123 sea salt samples, used as raw materials for brine preparation, were taken. All samples were  
124 analyzed according to the protocol described below and within 24h.

125

### 126 **2.2.Fermentation sample brine pH measurement**

127 pH value were measured for each fermentation sample using a pH meter (Hanna Instruments  
128 HI 2020-02).

129

### 130 **2.3.Microbial monitoring by culture-dependent approach**

#### 131 **2.3.1. Enumeration of microbial populations in spoiled and control fermentations** 132 **or environmental samples**

133 Microbial populations of interest were monitored for both control and spoilage samples. Brine  
134 and olive fruits were treated together in a 1:1 ratio (w/w): 12.5 g of olives flesh and 12.5 mL

135 of brine were mixed with 225 mL Buffered Peptone Water and blended with a stomacher for  
136 3 min at high speed. Serial dilutions were then prepared in Tryptone Salt diluent (TS; sodium  
137 chloride 8.5 g/L, tryptone 1 g/L) and plated on seven different media to enumerate: total  
138 fungal populations (Yeast extract Glucose Chloramphenicol medium (YGC, 25°C, 5 days),  
139 halotolerant fungi (YGC+5 % NaCl, 25°C, 5 days), total microbial populations (PCA, 30°C,  
140 72h), halotolerant microbial populations (PCA+5% NaCl, 30°C, 72h), enterobacteria  
141 (VRBG,30°C, 48h), lactic acid bacteria (LAB) (MRS+0.01% cycloheximide, 30°C, 48h ;  
142 anaerobiosis) and halotolerant lactic acid bacteria (MRS+5% NaCl + 0.01% cycloheximide,  
143 30°C, 48h ; anaerobiosis).

144 In addition, hygiene and safety quality of both control and spoiled olives was assessed in  
145 compliance with EC Regulation n°2073/2005 (Commission Regulation (EC) No 2073/2005  
146 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs , 2005). *Escherichia coli*  
147 (TBX, 42°C, 24h) and coagulase-positive staphylococci (Baird Parker supplemented with  
148 Rabbit Plasma Fibrinogen, 37°C, 48h) were enumerated while *Listeria monocytogenes* and  
149 *Salmonella* spp. absence in 25 g was verified, following ISO 11290-1:2017 and ISO 6579-  
150 1:2017 guidelines, respectively.

151 Regarding environmental samples, mesophilic aerobic microorganisms were enumerated on  
152 PCA (30°C, 72 h) and fungi on YGC (25°C; 5 days) after initial serial dilutions in Tryptone-  
153 Salt diluent.

154

## 155 **2.4. Microbial community analyses using metagenetics**

### 156 **2.4.1. DNA extraction**

157 DNA was extracted from both brine and olive fruit samples for control and spoiled  
158 fermentations. Cell pellets were prepared as described in Penland et al. (in press). Regarding  
159 environmental samples, pellets were obtained from liquid samples by centrifuging 1 mL  
160 (9000 g, 15 min, 4°C), whereas for surface samples, swabs were placed in 1 mL of TS diluent  
161 prior to centrifugation (9000 g, 15 min, 4°C) to obtain cell pellets. All DNA extractions were  
162 performed using NucleoSpin Soil DNA kit (Macherey-Nagel, Germany) following the  
163 protocol previously described in Penland et al. (2020). DNA extracts were stored at -20°C.

### 164 **2.4.2. Amplification and sequencing**

165 DNA extracts were used to study bacterial and fungal diversity in all samples. DNA extracts

166 were first submitted to PCR amplification. For bacteria, V3-V4 region of the 16S rDNA gene  
167 was targeted using S-D-bact-0341-b-S-17 and S-D-BAct-0785-a-A-21 primers and using  
168 PCR conditions described by (Klindworth et al., 2013). For fungi, ITS3f/ITS4\_Kyo1 primers  
169 targeting ITS2 region and PCR conditions as described by (Toju et al., 2012) were used.  
170 Sequencing was performed at GATC sequencing platform (Eurofins, Germany). All ITS2 and  
171 V3-V4 amplicons were sequenced in the same run using Illumina Miseq PE300 technology  
172 generating 2x300 bp reads.

### 173 **2.4.3. Bioinformatics**

174 Sequences were pre-processed for quality and length using the following parameters:  
175 amplicon size between 370 and 490 bp for V3-V4 contigs and 100-530 bp for ITS2 contigs,  
176 mismatch rate was set at 0.1 and sequences with NNN were filtered out for both data types.  
177 Sequencing data were then analyzed using the FROGS pipelines as developed by (Escudié et  
178 al., 2018) under Galaxy (Afgan et al., 2018). Parameters and steps were as described in  
179 Penland et al., (2020). Regarding the final affiliation step, it was performed using SILVA  
180 (V138) and UNITE 8.2 fungi databases for 16S and ITS2 data, respectively. When species  
181 identification by blastn+ and identification was below 97%, affiliation was manually  
182 corrected to the genus. In the same manner, when sequences were multi-affiliated by FROGS,  
183 because the targeted V3-V4 region or ITS2 were unable to discriminate species, the resulting  
184 species level assignments were implemented into the final OTU table. OTUs affiliated to  
185 chloroplasts or mitochondrial sequences in the 16S data set were excluded.

186

### 187 **2.5. Metagenetic statistical data analyses**

188 Processing and statistical analyses of microbial communities were performed using Phyloseq  
189 package (McMurdie & Holmes, 2013) under R software. Alpha and beta-diversity analyses  
190 were performed on control and spoiled fermentation sample datasets. Data were first  
191 normalized based on the sample that had the lowest number of sequences. Taxonomic  
192 composition and abundance distribution were then determined and alpha-diversity indexes  
193 (Observed, Chao1 and Shannon) calculated. Kruskal-Wallis test was used to compare values  
194 between spoiled and control fermentation samples. When differences were significant  
195 ( $P < 0.05$ ), the Wilcoxon test was performed to explore differences within the variable.  
196 Weighted UniFrac distance and Bray-Curtis distance were calculated to analyze beta-

197 diversity with fungal and bacterial communities, respectively. Multidimensional Scaling  
198 (MDS) and Adonis test (999 permutations) in R vegan package (Oksanen et al., 2013), were  
199 then used to assess the impact of the same variables than for alpha-diversity. Moreover, OTU  
200 abundance difference analysis between control and spoiled samples was performed on the  
201 non-rarefied OTU count table using Deseq2 package (Love et al., 2014; McMurdie &  
202 Holmes, 2014; Safari et al., 2020). Differences were expressed as log<sub>2</sub> fold changes and their  
203 significance levels were tested using Wald test followed by Benjamini-Hochberg False  
204 Discovery Rate correction with alpha value set at 0.05 (Benjamini & Hochberg, 1995).

## 205 **2.6.Source Tracker analyses**

206 SourceTracker algorithm (Knights et al., 2011) was used to investigate possible sources of  
207 contamination (environmental sources and raw materials, i.e. salt, olive fruits, brine) in  
208 spoiled and unspoiled brines and olives during fermentation. The analysis was carried out on  
209 samples with more than 1000 reads at a rarefaction depth of 1159 reads for 16S rRNA and  
210 1961 for ITS amplicons, with 100 burn-ins and 10 restarts.

## 211 **2.7.Statistical analyses**

212 Representations were obtained using R ggplot2 package (Wickham, 2016) and Venn  
213 diagrams were built from non-rarefied OTU tables using jvenn online tool (Bardou et al.,  
214 2014).

215 Statistical tests (ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon and Adonis test) were performed under  
216 R software using FactoMiner and Hmisc packages (Lê et al., 2008; Harrell and Dupont, 2014)  
217 and XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France).

## 218 **3. Results**

### 219 **3.1. Microbiota of spoiled and control Nyons table olive fermentations**

#### 220 **3.1.1. Microbial populations and pH determinations in control and spoiled** 221 **fermentations**

222 Safety and hygienic quality of both control and spoiled olive fermentation samples at the end  
223 of fermentations were tested according to EU regulation 2073/2005. All criteria were  
224 satisfied: no *Salmonella* or *Listeria* were detected in 25 g of sample, *Escherichia coli*,  
225 coagulase-positive staphylococci and enterobacteria populations were below detection level  
226 (<100 CFU/g) in all samples.



227 Based on the microbial populations enumerated and pH values determined for samples, major  
228 differences were observed between spoiled and control fermentations (**Table 2**). At the end  
229 of fermentation, pH values were significantly lower ( $P<0.001$ ) for spoiled samples, with  
230 values near  $\sim 3.8$  versus  $\sim 4.4$  in control samples. Moreover, lactic acid bacteria (LAB) and  
231 halotolerant LAB were at significantly higher counts in spoiled samples. Levels reached 4.5  
232 to 5 log CFU/g in the analysed brine/olive mixtures while they were undetected ( $<2.3 \log_{10}$   
233 CFU/g) during control fermentations ( $P<0.001$ ). No significant differences in fungal counts  
234 were observed. Populations ranged between 3.85-4.80  $\log_{10}$  CFU/g in spoiled samples and  
235 were close to 4.5  $\log_{10}$  CFU/g in control samples at the end of fermentation.

236

### 237 **3.1.2. Comparison of fungal communities between spoiled and control** 238 **fermentations**

239 A total of 1 478 832 quality-filtered contigs (average length of 291 bp) were obtained through  
240 ITS2 Illumina sequencing. After chimera and singleton removal, sequences were clustered  
241 into 165 OTUs belonging to Ascomycota (94.2%), Basidiomycota (5.6%) while 0.2% were  
242 unidentified. After normalization, 1961 sequences per sample were kept for diversity  
243 analyses.

244 Alpha-diversity indexes (Observed and Chao1 for richness, Shannon for evenness) did not  
245 show any significant differences between spoiled and control fermentation samples regardless  
246 of the matrix type (brine or olive fruit). The only significant difference was observed for  
247 Shannon evenness index between olives and brines ( $P<0.05$ ) with higher values observed for  
248 olive fruits compared to brine samples (**Supplementary Fig. S1**).

249 Beta-diversity analysis based on weighted UniFrac distance MDS showed different results  
250 (**Fig. 1**). This analysis explained the highest variance with nearly 71% on the first two  
251 dimensions compared to weighted UniFrac (37.4%) and Bray Curtis distances (42.3%). Axis  
252 1 (38.6%) clearly separated spoiled fermentation samples (no distinction was made between  
253 the type of sample: brine, dry salt, and olive samples) from the control samples, while on axis  
254 2 (32.3%), raw materials and control fermentation samples were opposed. Interestingly,  
255 process environment samples were not homogeneously distributed with most of the surface  
256 samples grouped close to control fermentations along axis 2. Adonis tests performed on the  
257 different variables (category and type of samples) confirmed these observations with

258 significant differences ( $P < 0.001$  and  $R^2 = 0.47$ ) between communities from spoiled and control  
259 fermentations. Overall, alpha and beta-diversity suggested that fungal communities from  
260 spoiled fermentations differed more by the relative abundances of shared OTUs rather than  
261 the presence of OTUs specific to one community.

262 Further analyses were therefore performed to investigate differences in fungal community  
263 compositions between spoiled and control samples as well as according to matrix type (brine  
264 versus olive fruits). Based on the relative species abundances observed between samples (**Fig.**  
265 **2**) and differences in species OTU abundances determined by Deseq analysis, similar  
266 conclusions could be made. Similarities in species composition were identified in all samples  
267 at the end of fermentation and *Pichia membranifaciens* dominated in all cases. However,  
268 control fermentations were also dominated by *Candida boidinii* and *Saccharomyces*  
269 *cerevisiae* while these species were subdominant in spoiled fermentations. In spoiled  
270 samples, higher abundances of some fungal species such as *Botrytis* sp. were also identified.  
271 Focusing on olive fruit communities, Deseq analyses were performed to determine OTU  
272 abundance differences and strong differences were observed for nine species with log<sub>2</sub> fold  
273 change values ranging from 5 to 32 (**Fig. 3**). For instance, *Pichia membranifaciens* (log<sub>2</sub> fold  
274 change |32|,  $P < 0.001$ ), *Candida spercermartinsiae* (log<sub>2</sub> fold change |24|,  $P < 0.001$ ) and  
275 *Penicillium carneum/roqueforti* (log<sub>2</sub> fold change |7|,  $P < 0.001$ ) were at significantly higher  
276 abundances in spoiled fermentation samples as compared to control ones by the end of  
277 fermentation. Similar results were observed in brines for *P. membranifaciens* (log<sub>2</sub> fold  
278 change |24|,  $P < 0.001$ ) and *Penicillium carneum/roqueforti* (log<sub>2</sub> fold change |24|,  $P < 0.001$ )  
279 although it was less pronounced in brines. In addition, other species, mostly filamentous fungi  
280 were found at significantly higher abundances, i.e., *Neosascochyta graminicola* (log<sub>2</sub> fold  
281 change |41|,  $P < 0.001$ ), *Alternaria* sp. (log<sub>2</sub> fold change |35|,  $P < 0.001$ ), *Botrytis* sp. (log<sub>2</sub> fold  
282 change |31|,  $P < 0.001$ ) and *Epicoccum hordei/nigrum/proteae* (log<sub>2</sub> fold change |39|,  
283  $P < 0.001$ ). However, for these latter species, it should be noted that although their relative  
284 abundances were significantly higher, most of them remained, overall, subdominant (<0.3%  
285 in average) in the spoiled brine and olive fruit fungal communities.

### 286 **3.1.3. Bacterial community comparison between spoiled and control** 287 **fermentations**

288 V3-V4 16S rDNA gene Illumina sequencing resulted in 1 556 969 reads which passed quality  
289 filtering with an average length of 427 bp. After assignment and contaminant removal, 524  
290 958 sequences were left and clustered into 144 OTUs that were assigned at the genus or  
291 species level (96% sequences with a coverage at 100% and identity between 95 and 100%).  
292 However, sequence numbers highly differed between samples and were particularly low for  
293 environmental and raw material samples. For this reason, control and spoilage fermentations  
294 sample diversity analysis was conducted separately from environment samples. Alpha and  
295 beta-diversity analyses were performed after rarefaction at 1159 sequences per sample.

296

297 Alpha-diversity analysis revealed significant differences within bacterial communities of  
298 spoiled and control fermentations (**Supplementary Fig. S2**). All three calculated indexes  
299 were significantly higher in spoiled olives and brines compared to their respective control  
300 counterparts ( $P < 0.05$  for observed richness and  $P < 0.01$  for Chao1 and Shannon indexes).  
301 Overall, the highest alpha-diversity values, all indexes considered, were observed for spoiled  
302 fermentation brines indicating that these samples were characterized by a more diverse and  
303 evenly distributed species community compared to control fermentations.

304 Beta-diversity was analyzed using MDS analysis on both Bray-Curtis and weighted UniFrac  
305 distances. MDS analysis based on Bray-Curtis distances showed a clear separation of spoiled  
306 and control fermentation samples on axis 1 and further separated spoiled brines and olives on  
307 axis 2 thus explaining 79.7% of variance on the first two dimensions (**Fig.4**). Complementary  
308 Adonis test confirmed that the bacterial community structure in spoiled and control  
309 fermentations was significantly different ( $P < 0.001$ ;  $R^2 = 0.55$ ). However, differences between  
310 brines and olive fruits were not statistically significant and associated with a low  $R^2$  value,  
311 therefore showing a lower impact of this variable on the bacterial communities ( $P = 0.12$ ;  $R^2 =$   
312 0.07).

313 Differences in bacterial community profiles between control and spoiled samples were further  
314 explored by composition and OTU abundance difference analyses. Bacterial community  
315 composition at the species- and OTU-level confirmed trends observed through MDS analysis.  
316 Striking differences were observed with these two analyses. Communities from spoiled  
317 samples differed from control fermentations by both the species present and the dominant  
318 species abundances (**Fig. 5**). In control samples, the bacterial community composition was  
319 constant during fermentation (days 64, 183 and End) for both olive fruits and brines and  
320 largely dominated by *Celerinatantimonas diazotrophica* (relative abundances ranging from  
321 85 to 100%) followed by *Marinobacterium litorale*.

322 Although both species were identified in spoiled fermentation samples, they were sub-  
323 dominant and instead lactic acid bacteria (LAB) species dominated. In olive fruits,  
324 *Pediococcus parvulus* was clearly the most abundant LAB (30 to 85 %), followed by  
325 *Lentilactobacillus buchneri* and *Lentilactobacillus parafarraginis*. Other LAB including  
326 *Pediococcus ethanolidurans*, *Lactiplantibacillus pentosus/plantarum* as well as *Suttonella*  
327 *indologenes* (from the Proteobacteria phylum) were also found in most samples, but at lower  
328 abundances. In spoiled brines, bacterial communities were dominated by *L. parafarraginis*  
329 except for two samples. The previously identified species in olive fruit, namely *P. parvulus*  
330 and *L. buchneri* were the second and third most dominant species. Overall, higher species  
331 diversity was observed in spoiled versus control samples.

332 Interestingly, comparison of OTU abundances revealed significantly higher abundances for  
333 79 and 31 OTUs (log2 change values between 8 and 31) in spoiled brine and olive fruit,  
334 respectively, when compared to control counterparts (data not shown). When looking at the  
335 OTU distribution for the different conditions, differences between control and spoiled  
336 samples were even more striking as most OTUs were completely absent in control  
337 fermentations (**Supplementary Fig. S3**). This included the dominant LAB species observed  
338 in spoiled fermentation samples as well as other species such as *Escherichia coli* and *S.*  
339 *indologenes*. Overall, bacterial communities in spoiled fermentations strongly differed in  
340 species composition and diversity, especially for LAB which were dominant in spoiled  
341 fermentations, and in significant variations in the abundances of dominant species found in  
342 brines and olive fruits.

343

## 344 **3.2. Tracking of microbial sources in process environment and raw materials**

### 345 **3.2.1. Fungal diversity analysis**

346 Mycobiota in process environment samples and raw materials collected during control olives  
347 fermentations were analyzed by metagenetic analyses. The 25 most abundant species that  
348 were identified in the different samples are presented in **Fig. 6**. High fungal diversity was  
349 encountered in the process environment for both surface and liquid samples in comparison to  
350 raw materials. Highest OTU diversity was observed in liquid samples such as the  
351 Optixal\_water sample (77 OTUs detected) which was also previously identified as a main  
352 contributor in fermentation samples as well as on the surface of the draining systems. Among  
353 raw materials, salt used to prepare brines showed the highest diversity.

354 Focusing on the distribution of fungal species, some of the most dominant throughout  
355 fermentation were *Pichia membranifaciens*, *Zygorhizula mrakii*, *Wickerhamomyces*  
356 *anomalus*, *Citeromyces nyonsensis* and *Candida boidinii*. They were widespread among  
357 environmental samples (i.e., liquids, surfaces) and brines for raw materials. Fungal  
358 communities encountered in process environment samples were mostly dominated by  
359 filamentous fungi. *Penicillium* and *Cladosporium* genera were particularly represented as  
360 well as some yeast species such as *Candida spencermartinsiae* and *Candida norvegica*. Both  
361 *Candida* species were present at high abundances in several surface and liquid process  
362 environment samples.

363 For raw materials, high diversity was observed in salt samples used for brines as more than  
364 30 OTUs were identified. Highest species abundances mainly corresponded to the dominant  
365 yeasts encountered during fermentation. Interestingly, the fungal community profile observed  
366 in dry salt samples slightly differed from the one identified in fresh brines. This might be  
367 related to the microbiota potentially present in tap water used for brines or from another  
368 material source from the processing environment such as the fresh brine storage tank itself.

369 In comparison, fungal diversity on fresh olive fruits mainly consisted of *Alternaria*  
370 *alternata/tenuissima* and *Aureobasidium pullulans*. Neither species was found in high  
371 abundances in olives during fermentation.

372 Using the SourceTracker tool and ITS2 metagenetic data, nine potential sources were  
373 analyzed and seven were shown to contribute to fungal community composition of at least  
374 one sample (**Fig. 7**). Moreover, the percentage of unknown sources ranged from 0.07%  
375 (C2017\_Brine) to 15.4% (C2016\_Brine). Overall, the salt used for brining was identified as  
376 the main contributor to the fungal communities as observed in the different fermentation  
377 samples regardless of whether they were spoiled and the matrix type (brines versus olive  
378 fruits). Surprisingly, the second potential contributor that was identified corresponded to the  
379 draining system grids, especially for control fermentations. For these samples, in particular  
380 during the intermediary stages of fermentation (day 64 and day183 samples), stagnant water  
381 near the optical sorting treadmill was also identified as an important microbial source (2 to  
382 70% depending on the samples). In general, fresh fruits did not seem to impact fermentation  
383 mycobiota and their contribution was restricted to three fermentation samples. Considering  
384 the low diversity and the species identified by metagenetic analysis, this result is not  
385 surprising.

### 386 **3.2.2. Bacterial diversity analysis**

387 Bacterial composition was analyzed for process environment and raw material samples.  
388 Different profiles, based on the 35 most abundant species, are shown in **Fig. 8**. As illustrated,  
389 higher species diversity was clearly observed among process environment samples when  
390 compared to raw materials. More precisely, among process environment samples, up to 73  
391 OTUs were identified in draining systems and 17 on the optical sorter surface, while less than  
392 15 OTUs were identified in either raw materials (**Supplementary Table S1**). Regarding  
393 bacterial community profiles, although *C. diazotrophica* represented a high percentage of  
394 sequences in the different samples, high variability between surface and liquid samples was  
395 observed. A major sequence fraction corresponded to enterobacteria such as *E. coli* and  
396 *Enterobacter* sp. as well as to other species belonging to the *Halomonas* and  
397 *Pseudoalteromonas* genera. Bacterial diversity in raw materials was lower with less than 15  
398 OTUs identified in salt samples and fresh olive fruits. Surprisingly, salt and fresh fruits had  
399 very similar profiles composed of *C. diazotrophica*, *Enterobacter* sp. and, to a lesser extent,  
400 *E. coli*; these three species being the most frequently identified in these samples. However, a  
401 main difference between both sample types was the presence of *Lactiplantibacillus*  
402 *pentosus/paraplantarum* in fresh olive fruits. In contrast, among raw material samples, higher  
403 diversity was observed in fresh brines as observed for *Idiomarina*, *Marinobacter* and  
404 *Alcanivorax* species.

405 SourceTracker was also implemented on 16S metagenetic data to determine potential  
406 bacterial sources in the process environment and among raw materials. However, most  
407 samples that could be considered as potential sources had insufficient read numbers to include  
408 them in the SourceTracker analysis. As a result, among the proposed microbial sources, none  
409 were identified to contribute to half of the studied fermentation samples (mainly spoiled  
410 samples) while stagnant water samples from the storage zones in the production facility were  
411 identified as the unique microbial contributor to all control fermentation samples  
412 (**Supplementary Fig. S4**).

413

### 414 **3.3. Qualitative overview of environmental and fermentation microbiota**

415 To study further the relationships between the in-house and spoiled and unspoiled olive  
416 microbiota, bacterial and fungal taxa (OTUs affiliated at the genus or species level) that were  
417 specific or shared among the different samples, i.e. process environment, raw materials,  
418 control fermentations and spoiled fermentations, were represented using Venn diagrams (**Fig.**  
419 **9**).

420 Regarding fungal distribution (**Fig. 9A**), and as previously observed, highest diversity was  
421 found (represented by 148 OTUs) in process environment samples followed by spoiled  
422 fermentation samples (102 OTUs). In the case of raw materials and control samples, around  
423 80 OTUs were observed when considering all samples in each group. Process environment  
424 was characterized by 31 specific OTUs, while for the other studied components, this number  
425 was lower. For instance, only 1 and 5 specific OTUs were observed in control and spoiled  
426 samples, respectively. When all components were considered, 42 OTUs were common.  
427 Interestingly, among these OTUs, the dominant yeasts (e.g. *W. anomalus*, *C. nyonsensis*, *Z.*  
428 *mrakii*, *C. boidinii*) were found throughout control fermentations as well as *P.*  
429 *membranifaciens*, *P. carneum* and *C. spercermartinsiae*, previously found in higher  
430 proportions in spoiled samples (see 3.1.2). In addition, 28 OTUs were found to be common  
431 to process environment samples as well as control and spoiled fermentations. Twelve other  
432 OTUs were only common to spoiled fermentations and process environment samples and  
433 included *Rhodosporidiobolus colostri* and *Starmerella apicula*. Both were found in  
434 significant abundances in the spoiled fermentation samples. Finally, 28 OTUs were shared  
435 by both control and spoiled fermentations and were mostly affiliated to the dominant species  
436 involved in control fermentations.

437

438 Regarding the distribution of bacterial species, as shown in **Fig. 9B**, a high number of OTUs  
439 (n=40) were specific to process environment samples although they mainly belonged to  
440 subdominant species. On the other hand, no specific OTUs were identified for raw material  
441 and control fermentation samples. Twenty-seven OTUs were shared by all four components  
442 and included bacteria found in control fermentations, namely *C. diazotrophica* and *M.*  
443 *litorale*, but also some LAB identified as dominant species in spoiled fermentations,  
444 especially *P. parvulus*, *L. parafarraginis*, *L. buchneri* and *S. indologenes*. Most interestingly,  
445 31 OTUs were only shared between spoiled fermentation samples and those from the  
446 processing environment. Among these OTUs, *P. ethanolidurans*, *L. acidipiscis* and *L.*  
447 *paracollinooides* were identified. Finally, 12 OTUs (specific to spoiled fermentations) and  
448 three OTUs (shared by control and spoiled fermentations) were not found among the studied  
449 raw materials and environmental samples.

#### 450 **4. Discussion**

451 Food spoilage is responsible for safety and quality defects that lead to important food losses  
452 for the producers. In the case of traditional and artisanal fermented foods, process conditions

453 are often less standardized than industrial ones, especially for small scale productions, and  
454 often involve indigenous microorganisms. These productions are thus more at risk to potential  
455 microbial contaminants and/or variations in microbial community structure (Capozzi et al.,  
456 2017). Microbial contaminations can be linked to environmental origins although it should  
457 be emphasized that environmental sources can be both beneficial (potential reservoir of  
458 microorganisms for fermentations) or detrimental (food spoilers) (Hernández et al., 2018). In  
459 this study, both aspects were investigated for spoiled and unspoiled PDO Nyons table olives  
460 produced in the same facility.

461 Previous work on microbial dynamics during Nyons table olive fermentation revealed that  
462 the process was dominated by yeast populations and characterized by a rapid pH decrease in  
463 the first weeks of fermentation around 4.4 (Penland et al., 2020). Table olives are most often  
464 linked to microbial spoilers that increase brine pH and this is typically caused by yeast or  
465 filamentous fungi growth (Lanza, 2013). On the contrary, in the present study, spoiled  
466 fermented olives were characterized by a significant decrease in pH that was approximately  
467 0.6 units lower than control fermentations as well as acidic sensory attributes (i.e. strong  
468 acetic/acidic odors). These findings corroborated to the microbial markers identified in  
469 bacterial communities. Indeed, high LAB counts were found in all spoiled fermentations  
470 while they were below the detection limit in control fermentations. Similarly, low levels of  
471 LAB were already observed in other batches of Nyons table olives produced at two different  
472 harvesting times. Using 16S rRNA metagenetic analyses, diversified LAB populations were  
473 identified in spoiled olives and included *P. parvulus* and *P. ethanolidurans* in brines and *L.*  
474 *parafarraginis* (ex- *Lactobacillus parafarraginis*) and *L. buchneri* in olive fruits. These  
475 species undeniably dominated bacterial communities of spoiled samples and completely  
476 supplanted the species usually found, namely *C. diazotrophica* and *M. litorale*. It is not clear  
477 why these two species were inhibited in spoiled samples but a more acidic pH associated with  
478 higher organic acid concentrations as well as competition-exclusion could be responsible,  
479 among other factors, for this inhibition.

480 In most table olive preparations, LAB are usually considered as the main microorganisms  
481 responsible for the fermentation process and ensure rapid acidification in brines via lactic  
482 acid production (Hurtado et al., 2012). Some of the identified LAB species, such as *L.*  
483 *plantarum*, are commonly observed in table olives. *P. parvulus* was already identified in  
484 natural green olive fermentations after 6 months although as a subdominant species (Abriouel  
485 et al., 2012) as well as *P. ethanolidurans* (Lucena-Padrós et al., 2014). Nevertheless, in our  
486 study, their presence and known metabolisms corroborate with observed sensory defects.



487 Indeed, *P. parvulus* has been previously associated to wine-making and cider-making defects  
488 due to its ability to produce exopolysaccharides (Dols-Lafargue & Lonvaud-Funel, 2009;  
489 Ibarburu et al., 2010) and, in the current spoilage scenario, can be linked to the abnormal  
490 viscosity of spoiled brine samples (Wade et al., 2019). Regarding *L. parafarraginis* and *L.*  
491 *buchneri* species, their presence or spoilage activity has not been reported to date for table  
492 olives. However, these two heterofermentative LAB were associated with quality defects in  
493 cucumber fermentations (Franco et al., 2012). *L. buchneri* was shown to degrade lactic acid  
494 into acetic and propionic acids during cucumber fermentation (Johanningsmeier et al., 2012)  
495 and the same metabolism was reported for *L. parafarraginis* in silage (Xu et al., 2017).  
496 Considering the high levels of lactic acid previously quantified during Nyons table olive  
497 fermentations (Penland et al., 2020), this scenario is highly probable. Moreover,  
498 Johanningsmeier et al. (2012) further demonstrated that these metabolic activities were highly  
499 dependent on pH but also salt concentration as the lactic acid degradation increased as salt  
500 content decreased to 4 or 6% NaCl. For Nyons table olives fermented in brines, the salt  
501 concentration is set to 10% as stipulated by PDO requirements. However, it is possible for  
502 this concentration to decrease over time as the salt in brines slowly diffuses into olive fruits.  
503 Regarding fungal communities in spoiled samples, counts were similar and the same species  
504 were identified although at different abundances. For example, *P. membranifaciens*  
505 dominated in spoiled samples as well as several other filamentous fungi including *Penicillium*  
506 *carneum/roqueforti*, thus suggesting that these species were particularly adapted to the  
507 acidified environment. *P. membranifaciens* is known to grow at low pH, around 4 (Aguiar &  
508 Lucas, 2000), and is also resistant to high acetate concentrations (Oliveira et al., 2004).  
509 Although some fungal species appear to be linked to spoilage in our study, complementary  
510 analyses would be necessary to confirm spoilage is possible (by artificially inoculating these  
511 species during fermentation) and to pinpoint the environmental determinants and outcomes.  
512 For the latter, salt quantification in brines could indicate if a strong deviation from usual salt  
513 concentration is the cause. Determination of volatile profiles of olive fruits could also be  
514 performed and compared to control fermentations in order to clearly identify spoilage  
515 biochemical markers. However, using the data obtained in the present study, source tracking  
516 analyses and the distribution of the different species in spoiled and control samples provided  
517 some leads.

518 Metagenetic analyses and source tracking were performed to identify potential microbial  
519 sources among raw materials, including fresh fruits, brine and dry salt, and process  
520 environment samples from different zones in the factory. Microbiota distribution among

521 samples was then compared to microbial communities encountered in both control and  
522 spoiled fermentations. The obtained results revealed a “house microbiota” as the dominant  
523 yeast and bacterial species encountered during Nyons table olive fermentations were widely  
524 spread in the process environment (on surfaces, draining systems) and, for collected raw  
525 materials, in brines and salt. Surprisingly, fresh olive fruits only weakly contributed to both  
526 bacterial and fungal communities of Nyons table olives, although it was more pronounced for  
527 fungi than bacteria. Noteworthy, the highest diversity was observed in the process  
528 environment. Many OTUs and species, specific to these samples, showed that only a minority  
529 of microorganisms from the environment were able to settle in the fermentation. Interestingly,  
530 when comparing microbial distributions, most spoilage-associated LAB were present in raw  
531 materials (salt) and the process environment, although at low frequencies. *P. ethanolidurans*  
532 was only found in process environment thus highlighting the contribution of this species in  
533 shaping the microbiota, both positively and negatively. This also further reinforces the  
534 hypothesis that inappropriate fermentation conditions could be linked to the observed quality  
535 defects rather than punctual microbial contaminations. Finally, the sources of some  
536 microorganisms remained unknown. This can be linked to either technical or sampling biases.  
537 Indeed, metagenetic analyses could be biased if too low sequence numbers are obtained to  
538 efficiently perform the analysis while a more thorough sampling campaign could be  
539 conducted to investigate other environmental sources.

540 Overall, the present study highlighted the positive and negative impact on the process  
541 environment and raw materials in shaping Nyons table olive microbial communities. On one  
542 hand, the revealed “house microbiota” was composed of the main microorganisms found in  
543 Nyons table olives. On the other hand, lactic acid bacteria, usually regarded as beneficial in  
544 table olive fermentations were associated with spoilage, and were found in low abundances  
545 in the environment. This further adds to the specificity of table olives microbiota existing  
546 from one preparation to another. It also further strengthens the importance of studying the in-  
547 house microbiota as potential microbial vectors linked to spoilage. In our case, it was clearly  
548 relevant to better comprehend fermentation outcomes, provide more knowledge about these  
549 microbial vectors and could help adjust the fermentation process in the future without  
550 compromising the traditional character of this process.

## 551 **5. Conflict of Interest**

552 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
553 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

554 **6. Author contribution**

555 MC, JM and SD obtained the funding and supervised the study. MC, JM and MP designed  
556 the experiments. MP performed the experiments and analyzed all the data except for  
557 SourceTracker analysis that was performed by JM. AP and ST provided technical assistance  
558 for microbiological analyses. MP drafted the manuscript and MC, JM and SD edited and  
559 proofread the manuscript.

560 All authors contributed to the article and approved the present version.

561

562 **7. Acknowledgments**

563 We would like to thank our table olive producer partner for accepting to be part of our project,  
564 for welcoming us at their facilities for collecting environmental samples and providing the  
565 samples throughout the fermentations. We would like to thank Geraldine Pascal and Olivier  
566 Rué for their technical support and advice for the FROGS bioinformatic pipelines. Finally,  
567 we are grateful to the INRAE MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020.  
568 Migale bioinformatics Facility, doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing  
569 computing and storage resources.

570 **8. Funding**

571 This work, which was conducted in the framework of the ProMedFoods project ‘Promotion  
572 of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and management of  
573 microbial resources’, was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the following funding  
574 agencies: ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece), MIPAF (Italy),  
575 INIA (Spain) and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received funding from the  
576 European Union’s Seventh Framework Programme for research, technological development  
577 and demonstration under grant agreement [618127].

578 **9. References**

579 Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez-Pulido,  
580 R., & Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-  
581 fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32(2),  
582 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.006>

583 Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., Chilton, J.,  
584 Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J.,  
585 Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko,  
586 A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and  
587 collaborative biomedical analyses : 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1),  
588 W537-W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>

589 Aguiar, C., & Lucas, C. (2000). *Yeasts killer/sensitivity phenotypes and halotolerance*.  
590 <http://repositorium.sdum.uminho.pt/>

591 Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-  
592 Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in  
593 table olive processing : Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal*  
594 *of Food Microbiology*, *160*(1), 42-49.  
595 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003>

596 Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., & Klopp, C. (2014). jvenn : An interactive  
597 Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, *15*(1), 293. [https://doi.org/10.1186/1471-](https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293)  
598 [2105-15-293](https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293)

599 Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical  
600 and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*.  
601 *Series B (Methodological)*, *57*(1), 289-300. JSTOR.

602 Bokulich, N. A., & Mills, D. (2013). Facility-Specific « House » Microbiome Drives  
603 Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and environmental*  
604 *microbiology*, *79*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00934-13>

605 Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis,  
606 M., & Gobbetti, M. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas  
607 during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food*  
608 *Microbiology*, *54*, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.008>

609 Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., & Spano, G. (2017).  
610 Spontaneous Food Fermentations and Potential Risks for Human Health.  
611 *Fermentation*, *3*(4), 49. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040049>

612 Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological  
613 criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance), Pub. L. No. 32005R2073, 338 OJ  
614 L (2005). <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/eng>

615 Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., & Piga, A. (2020). Table Olives : An  
616 Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods*, *9*(4).

617 <https://doi.org/10.3390/foods9040514>

618 Dols-Lafargue, M., & Lonvaud-Funel, A. (2009). Polysaccharide Production by Grapes,  
619 Must, and Wine Microorganisms. In H. König, G. Uden, & J. Fröhlich (Éds.),  
620 *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (p. 241-258). Springer.  
621 [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_13)

622 Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S.,  
623 Hernandez-Raquet, G., Combes, S., & Pascal, G. (2018). FROGS : Find, Rapidly,  
624 OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(8), 1287-1294.  
625 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>

626 Franco, W., Pérez-Díaz, I. M., Johanningsmeier, S. D., & McFeeters, R. F. (2012).  
627 Characteristics of Spoilage-Associated Secondary Cucumber Fermentation. *Applied*  
628 *and Environmental Microbiology*, 78(4), 1273-1284.  
629 <https://doi.org/10.1128/AEM.06605-11>

630 Hernández, A., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M. J., Villalobos, M. C.,  
631 Martín, A., & Córdoba, M. G. (2018). Spoilage yeasts : What are the sources of  
632 contamination of foods and beverages? *International Journal of Food Microbiology*,  
633 286, 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>

634 Ibarburu, I., Aznar, R., Elizaquível, P., García-Quintáns, N., López, P., Munduate, A.,  
635 Irastorza, A., & Dueñas, M. T. (2010). A real-time PCR assay for detection and  
636 quantification of 2-branched (1,3)- $\beta$ -d-glucan producing lactic acid bacteria in cider.  
637 *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), 26-31.  
638 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.023>

639 Johanningsmeier, S. D., Franco, W., Perez-Diaz, I., & McFeeters, R. F. (2012). Influence of  
640 sodium chloride, pH, and lactic acid bacteria on anaerobic lactic acid utilization  
641 during fermented cucumber spoilage. *Journal of Food Science*, 77(7), M397-404.  
642 <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02780.x>

643 Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O.  
644 (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and  
645 next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1),  
646 e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

647 Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E. S., Zaneveld, J., Mozer, M. C., Collman, R. G.,  
648 Bushman, F. D., Knight, R., & Kelley, S. T. (2011). Bayesian community-wide  
649 culture-independent microbial source tracking. *Nature Methods*, 8(9), 761-763.  
650 <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>

- 651 Lanza, B. (2013). Abnormal fermentations in table-olive processing : Microbial origin and  
652 sensory evaluation. *Frontiers in Microbiology*, 4.  
653 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00091>
- 654 Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and  
655 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.  
656 <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 657 Lucena-Padrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., & Ruiz-Barba, J. L.  
658 (2014). Microbial diversity and dynamics of Spanish-style green table-olive  
659 fermentations in large manufacturing companies through culture-dependent  
660 techniques. *Food Microbiology*, 42(Supplement C), 154-165.  
661 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.020>
- 662 McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq : An R Package for Reproducible Interactive  
663 Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217.  
664 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- 665 McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not : Why Rarefying Microbiome  
666 Data Is Inadmissible. *PLOS Computational Biology*, 10(4), e1003531.  
667 <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- 668 Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D. A., Desmasures, N., &  
669 Berthier, F. (2014). Traditional cheeses : Rich and diverse microbiota with associated  
670 benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136-154.  
671 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- 672 Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Simpson, G.,  
673 Solymos, P., Stevens, M., & Wagner, H. (2013). Vegan : Community Ecology  
674 Package. R Package Version. 2.0-10. *CRAN*.
- 675 Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A.,  
676 Fernandes, I., Gordo, F., & Peres, C. (2004). Biotechnology of olive fermentation of  
677 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites*, 55(3), 219-226.  
678 <https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i3.169>
- 679 Penland, M., Deutsch, S.-M., Falentin, H., Pawtowski, A., Poirier, E., Visenti, G., Le Meur,  
680 C., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., & Coton, M. (2020). Deciphering  
681 Microbial Community Dynamics and Biochemical Changes During Nyons Black  
682 Olive Natural Fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 11.  
683 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.586614>
- 684 Romeo, F. V. (2012). Microbiological Aspects of Table Olives. *Olive Germplasm - The Olive*

685            *Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. <https://doi.org/10.5772/51479>  
686 Safari, Z., Bruneau, A., Monnoye, M., Mariadassou, M., Philippe, C., Zatloukal, K., &  
687 Gérard, P. (2020). Murine Genetic Background Overcomes Gut Microbiota Changes  
688 to Explain Metabolic Response to High-Fat Diet. *Nutrients*, 12(2), 287.  
689 <https://doi.org/10.3390/nu12020287>  
690 Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for  
691 the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental  
692 Samples. *PLOS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>  
693 Wade, M. E., Strickland, M. T., Osborne, J. P., & Edwards, C. G. (2019). Role of *Pediococcus*  
694 in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25(1), 7-24.  
695 <https://doi.org/10.1111/ajgw.12366>  
696 Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2<sup>e</sup> éd.). Springer  
697 International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>  
698 Xu, Z., He, H., Zhang, S., & Kong, J. (2017). Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and  
699 *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial  
700 communities of corn stover silage. *Scientific Reports*, 7.  
701 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1>  
702  
703

**Table 1. Description of the samples used in this study**

<b>Sample type</b>	<b>Sample code</b>	<b>Description</b>
<b>Control fermentations</b>		Normal fermentations with final product characteristics complying with PDO and producer requirements
	<b>C1_D64</b>	Batch C1 - Olive fruits (O) and brine (B) at day 64
	<b>C2_D64</b>	Batch C2 - Olive fruits (O) and brine (B) at day 64
	<b>C1_D183</b>	Batch C1 - Olive fruits (O) and brine (B) at day 183
	<b>C2_D183</b>	Batch C2 - Olive fruits (O) and brine (B) at day 183
	<b>C1_End</b>	Batch C1 - Olive fruits (O) and brine (B) on final day of fermentation
	<b>C2_End</b>	Batch C2 - Olive fruits (O) and brine (B) on final day of fermentation
	<b>C2017_End</b>	Brine sample from a previous harvest period (2016/2017)
	<b>C2016_End</b>	Brine sample from a previous harvest period (2015/2016)
<b>Spoiled fermentations</b>		
	<b>S1_End</b>	Batch S1 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S2_End</b>	Batch S2 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S3_End</b>	Batch S3 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S4_End</b>	Batch S4 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S5_End</b>	Batch S5 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S6_End</b>	Batch S6 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S7_End</b>	Batch S7 - Spoiled brine (B) and olives fruit (O)
	<b>S2016_End</b>	Batch S2016 - Spoiled brine from previous harvest period (2015/2016)
<b>Raw materials</b>		
	<b>Salt_A</b>	Organic dry sea salt (1/10 diluted)
	<b>Salt_B</b>	Conventional dry sea salt (1/10 diluted)
	<b>FF_1</b>	Batch C1 - Fresh olives fruits
	<b>FF_2</b>	Batch C2 - Fresh olives fruits
	<b>FB_1</b>	Batch C1 - Fresh brine (10% salt)
	<b>FB_2</b>	Batch C2 - Fresh brine (10% salt)
<b>Process environment</b>		
	<b>Optical_sorter_surf</b>	Optical sorter surface
	<b>PF_treadmill_surf</b>	Post-fermentation sorting treadmill
	<b>Wall_surf</b>	Wall surface
	<b>DrainingS_A</b>	Draining sytem grill A
	<b>DrainingS_B</b>	Draining sytem grill B
	<b>Cond_treamill</b>	Conditionning sorting treadmill
	<b>Filtered_brine</b>	Filtered brine used for olive packaging
	<b>St_water_A</b>	Stagnant water in storage area A
	<b>St_water_B</b>	Stagnant water in storage area B
	<b>Optical_water</b>	Water on optical sorter
	<b>DS_water</b>	Water from draining system in tank preparation area
	<b>Washing-water</b>	Washing water



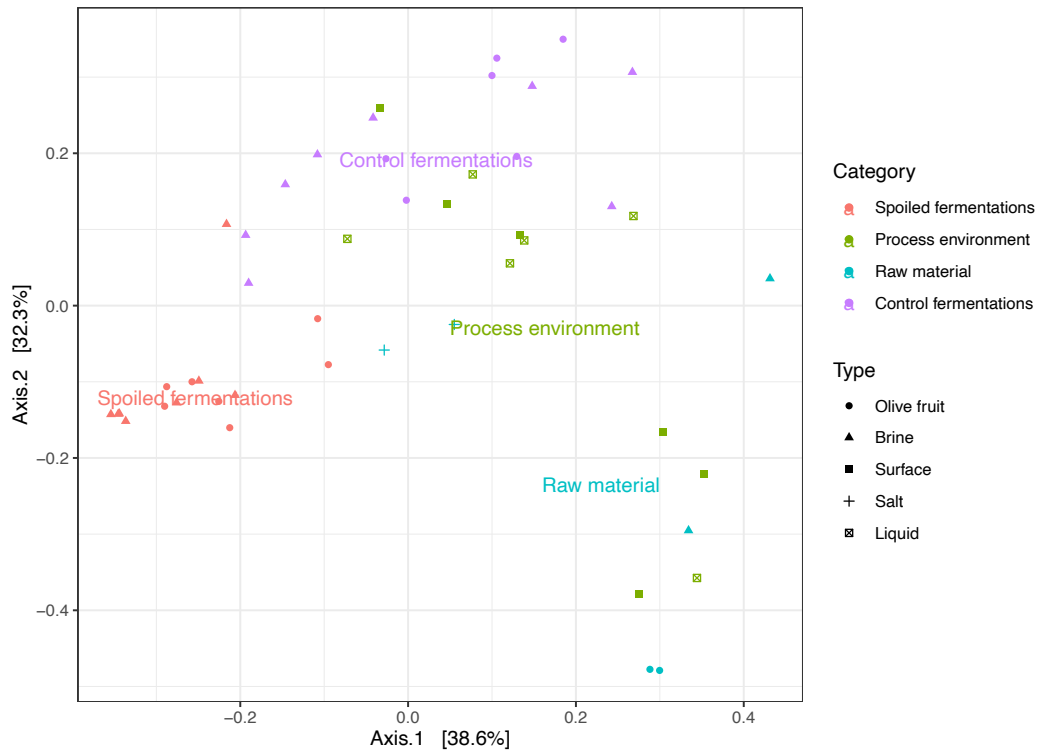
**Table 2. Microbial population counts (log<sub>10</sub> CFU/g of mixed olive and brine) and pH (Units) in spoiled and control fermentations samples.**

For control or spoiled samples, different letter in a row indicates a significant difference (P<0.05) according to Tukey's LSD test.

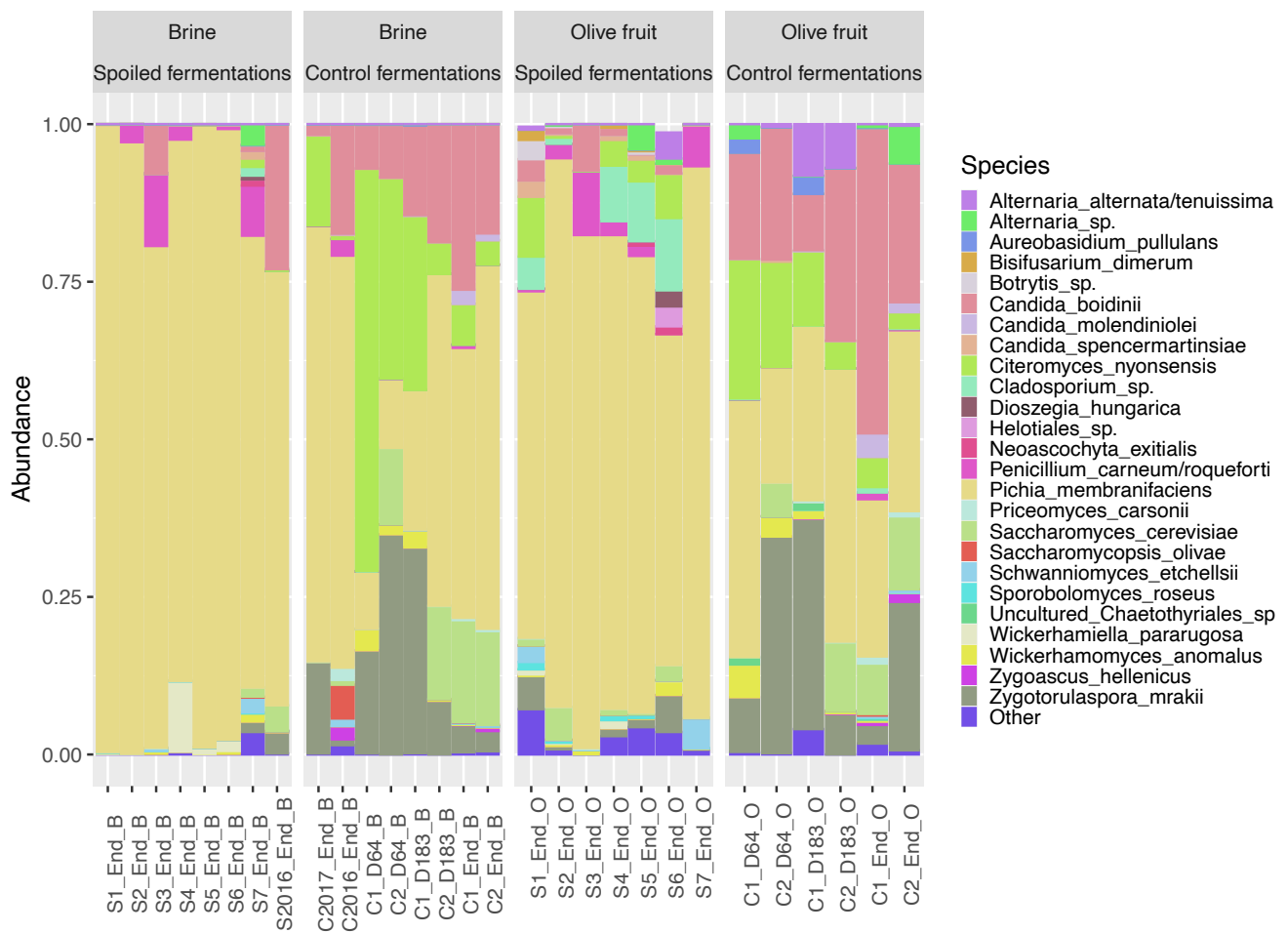
Code	pH in brine	Mesophilic aerobic microorganisms	Halotolerant aerobic microorganisms	Anaerobic LAB*	Halotolerant anaerobic LAB*	Fungi	Halotolerant fungi	Enterobacteria
<b>P value</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.02</b>	0.08	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	-
<b>Control samples</b>								
FF_1 & FB_1	7.53 a	2.79 a	2.79 a	<DT a	<DT	3.01 a	2.3 a	<DT
FF_2 & FB_2	7.64 a	3.63 a	3.88 a	<DT a	<DT	3.92 a	3.71 a	<DT
C1_D64	4.56 b	5.39 b	4.91 a	<DT a	<DT	5.36 d	5.07 b	<DT
C2_D64	4.58 b	5.63 b	5.13 a	<DT a	<DT	5.68 d	5.48 b	<DT
C1_D183	4.5 b	4.1 b	4.57 a	<DT a	<DT	5.19 dc	5.04 b	<DT
C2_D183	4.54 b	5.29 b	5.25 a	<DT a	<DT	5.56 dc	5.46 b	<DT
C1_End	4.49 b	4.69 b	4.44 a	<DT a	<DT	4.42 bc	4.53 b	<DT
C2_End	4.43 b	4.86 b	4.67 a	<DT a	<DT	4.87 bc	4.62 b	<DT
<b>Spoiled samples</b>								
S1_End	3.79 c	4.54 b	3.78 a	5.84 b	5.94 b	4.06 b	3.85 b	<DT
S2_End	3.83 c	5.19 b	4.95 a	6.06 b	5.92 b	4.91 b	4.78 b	<DT
S3_End	3.78 c	5.3 b	5.26 a	6.08 b	6.16 b	4.86 b	4.58 b	<DT
S4_End	3.78 c	5.11 b	4.96 a	6.05 b	6.1 b	4.48 b	4.34 b	<DT
S5_End	3.72 c	4.84 b	4.09 a	5.91 b	5.96 b	4.85 b	4.19 b	<DT
S6_End	3.85 c	5.49 b	5.33 a	5.93 b	5.97 b	4.31 b	4.39 b	<DT
S7_End	4.41 c	5.55 b	5.65 a	6.22 b	6.21 b	4.45 b	4.41 b	<DT

Abbreviations: LAB Lactic acid bacteria - DT Detection threshold (no colony on plate at the lowest dilution)

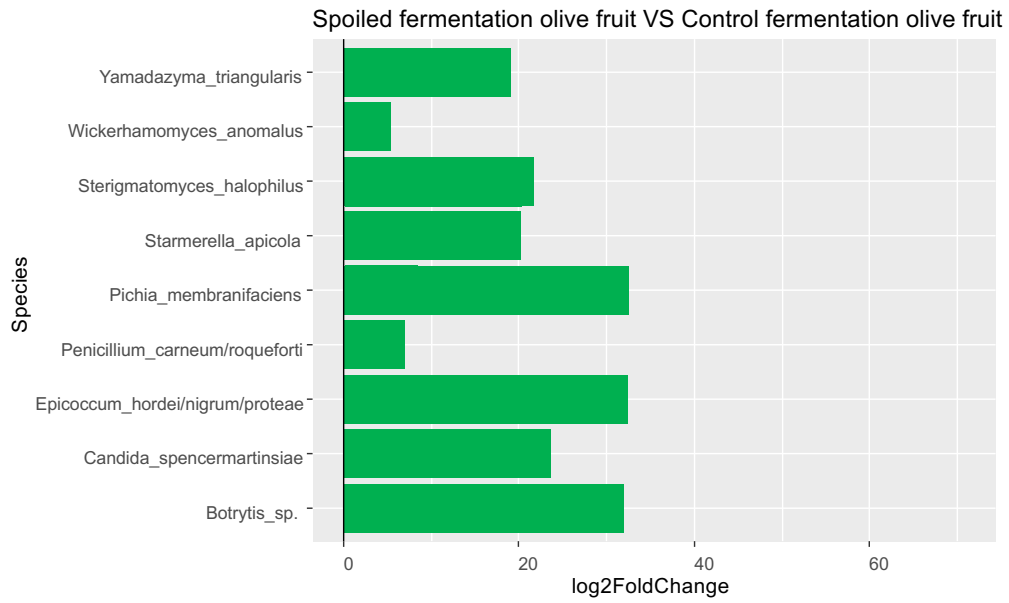
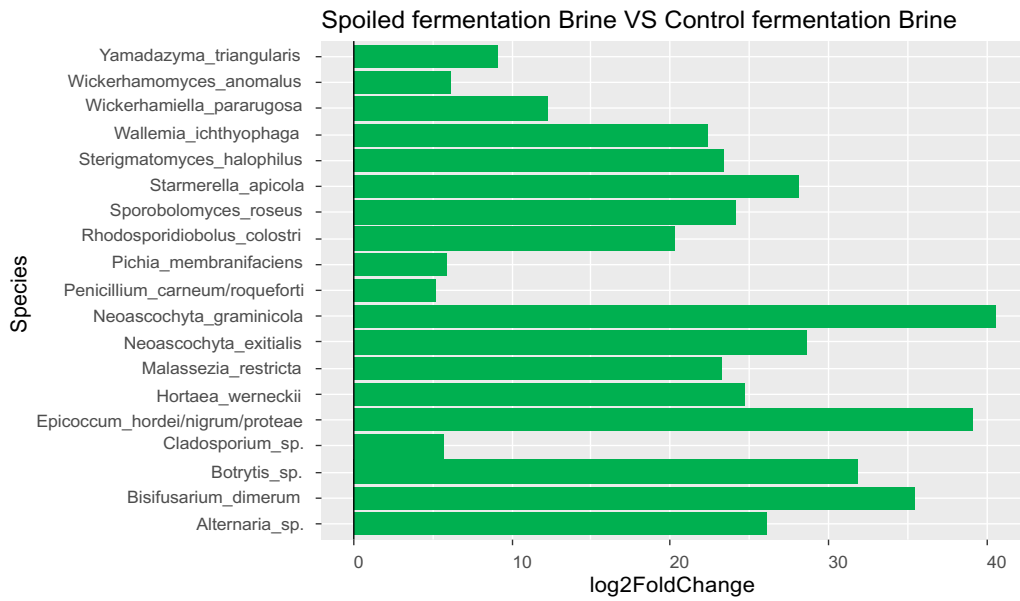
\* ANOVA was performed with detection threshold value 2.3 log<sub>10</sub> CFU/g corresponding to the highest possible concentration



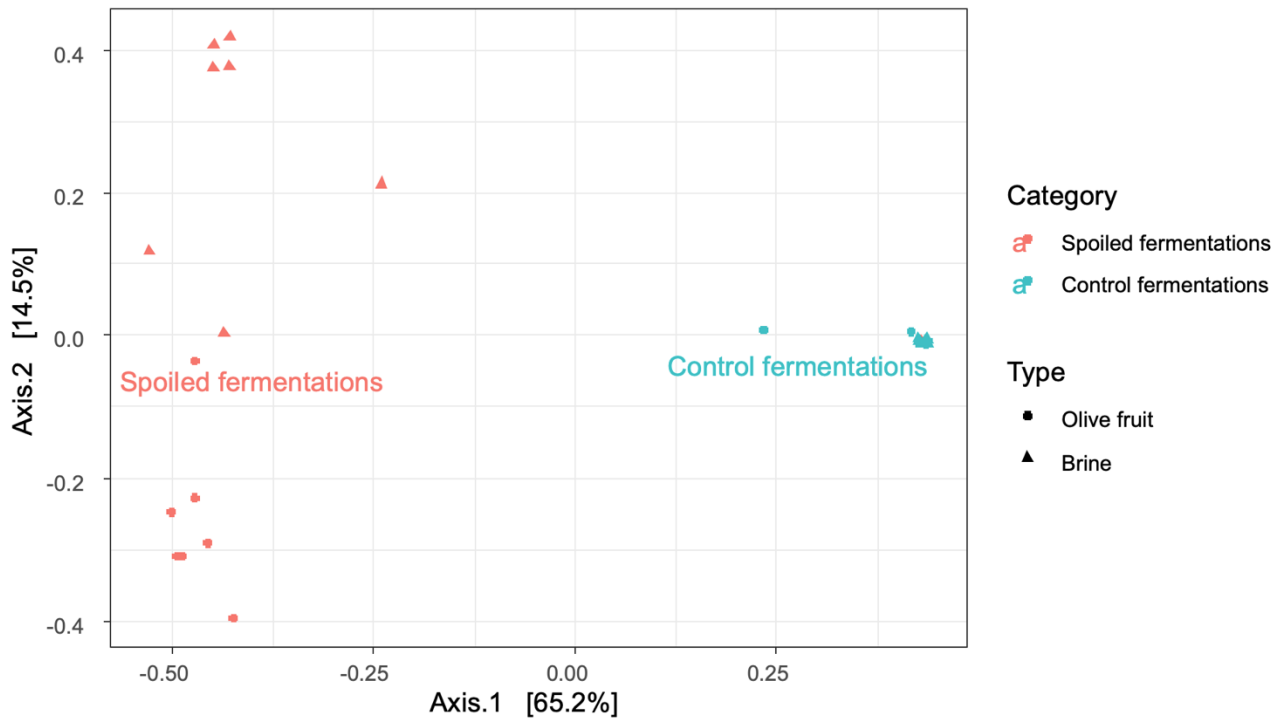
**Fig. 1. Beta-diversity analysis of fungal communities by Multidimensional Scaling using weighted UniFrac distance.** The four sample categories are considered: spoiled, fermentations, control fermentations, process environment and raw materials and differentiated according to the type of samples.



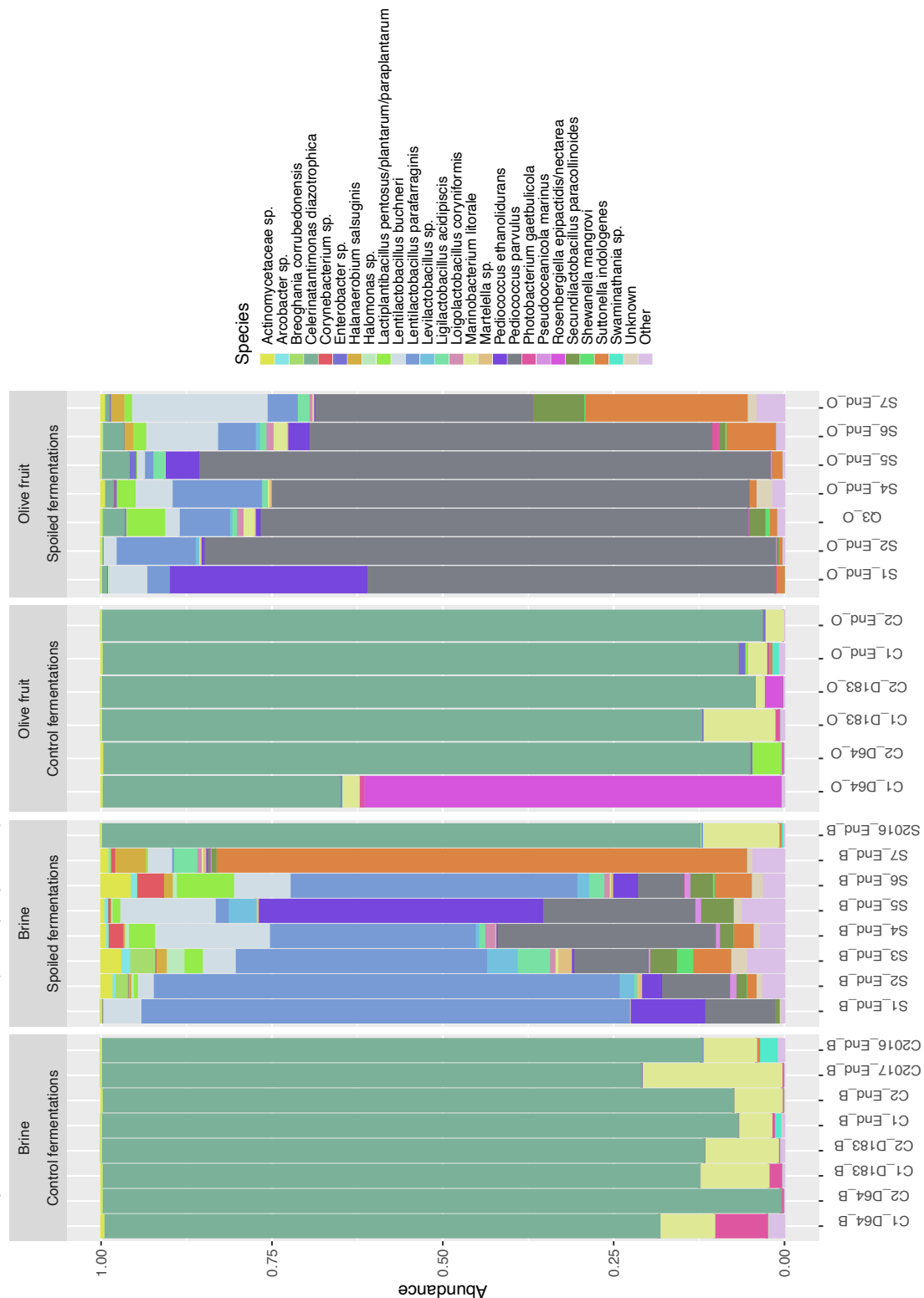
**Fig. 2. Fungal community composition comparison of spoiled and control fermentation samples.** Relative abundances of the 25 most abundant species are presented for brine and olive fruits separately, based on ITS2 region metagenetic analysis.

**A****B**

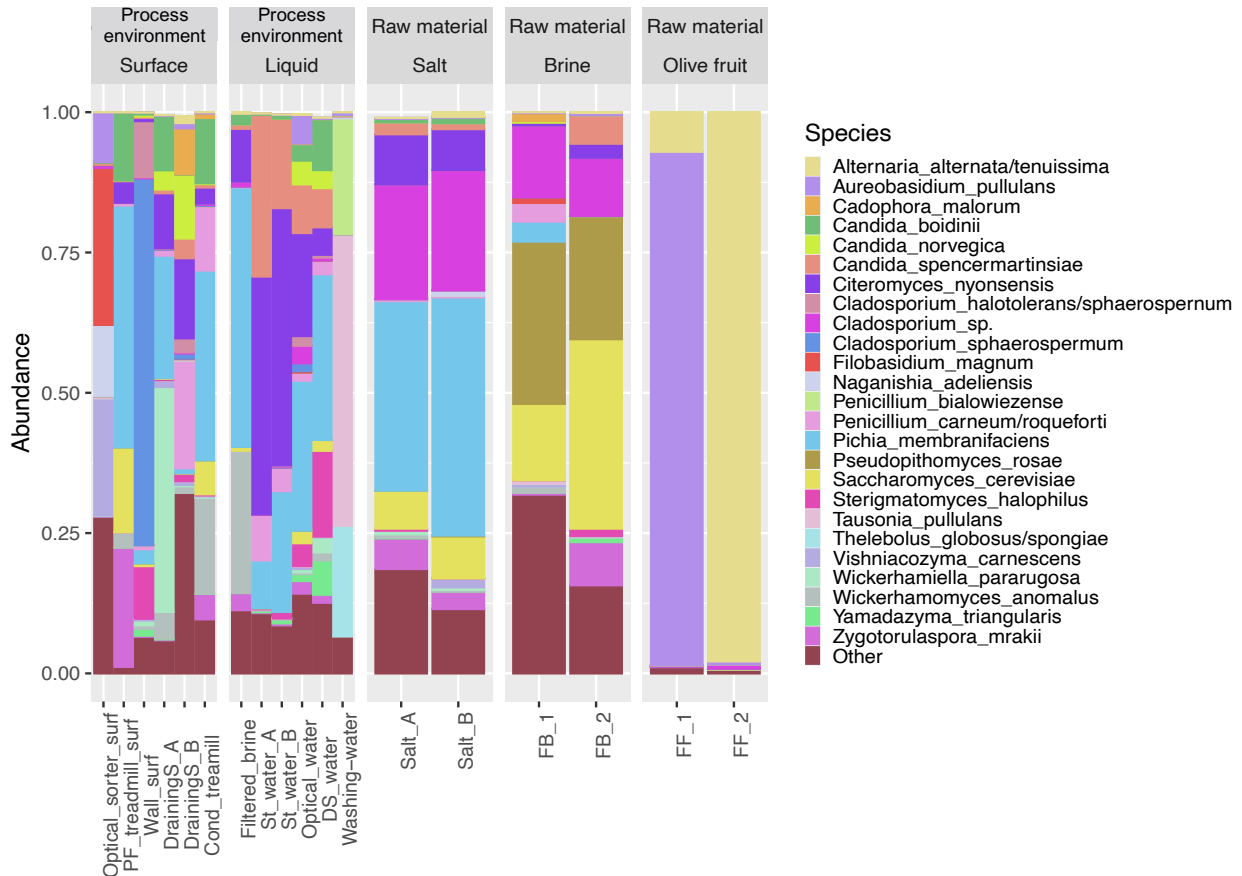
**Fig. 3. OTUs differential abundances between spoiled and control fermentations (A) olive fruit and (B) brine. Log2 fold changes were calculated using Deseq2 tool. Only OTUs with a Pvalue < 0.05 (after adjustment by BH correction) are displayed.**



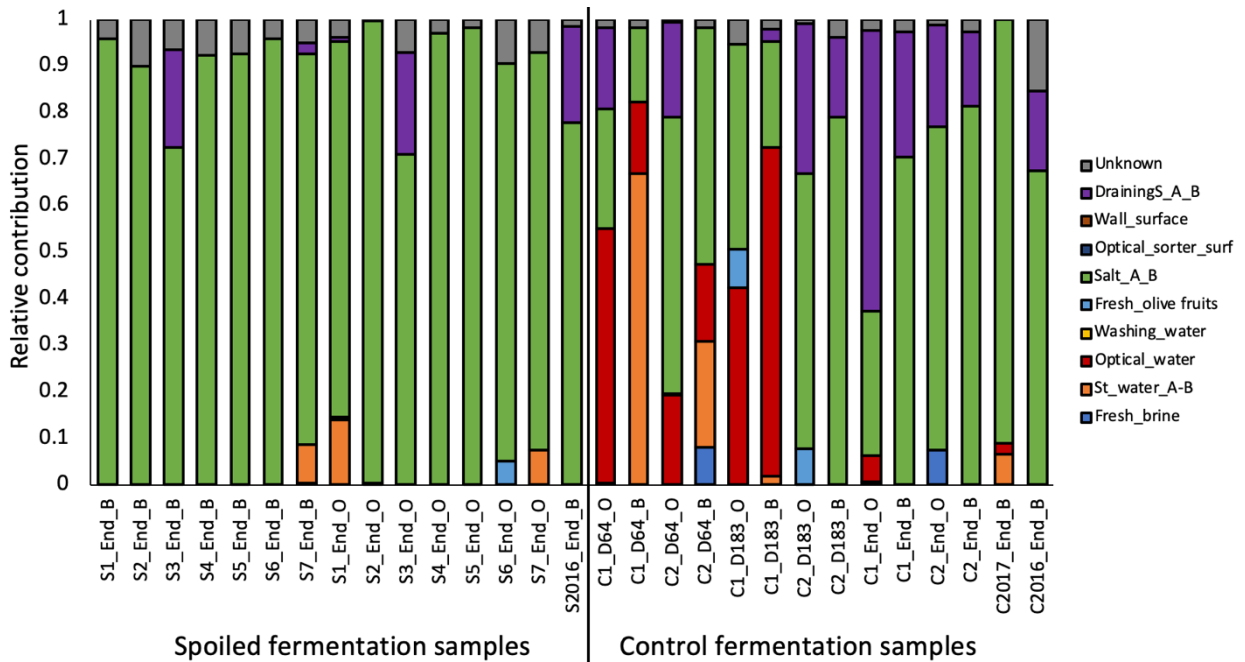
**Fig. 4. Beta-diversity analysis of spoiled and control fermentation bacterial communities using Multidimensional Scaling on Bray-Curtis distance.**



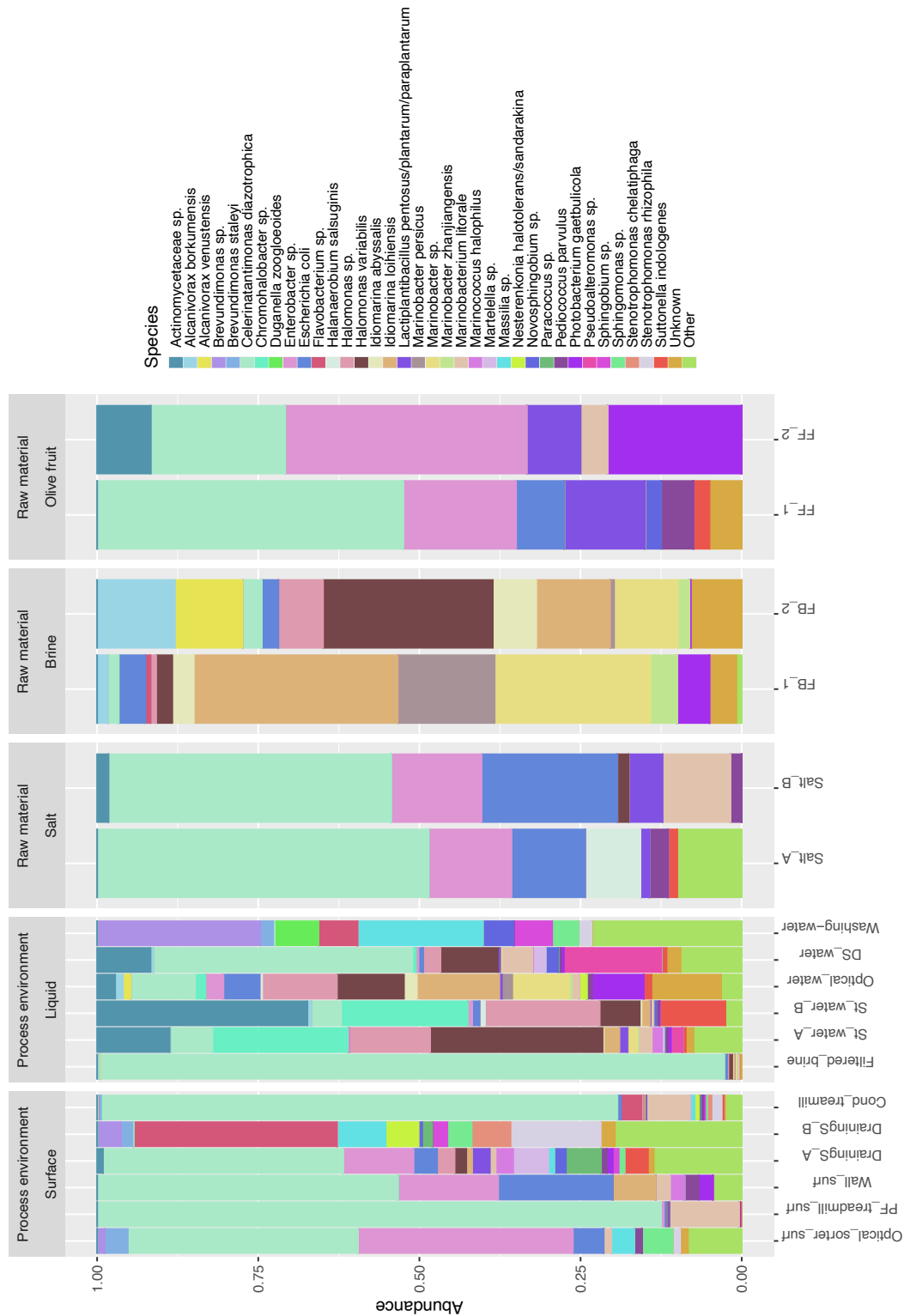
**Fig. 5. Bacterial communities of spoiled and control Nyons olive fermentations as revealed by V3-V4 region of 16S rRNA gene metagenetic analysis. The 25 most abundant species are presented for control and spoiled fermentation samples with brine and olive fruit separated.**



**Fig.6. Fungal diversity encountered in raw material and process environment samples in the olive fermentation-plant based on ITS2 metagenetic analysis. Relative abundances of the 25 most abundant species are presented.**



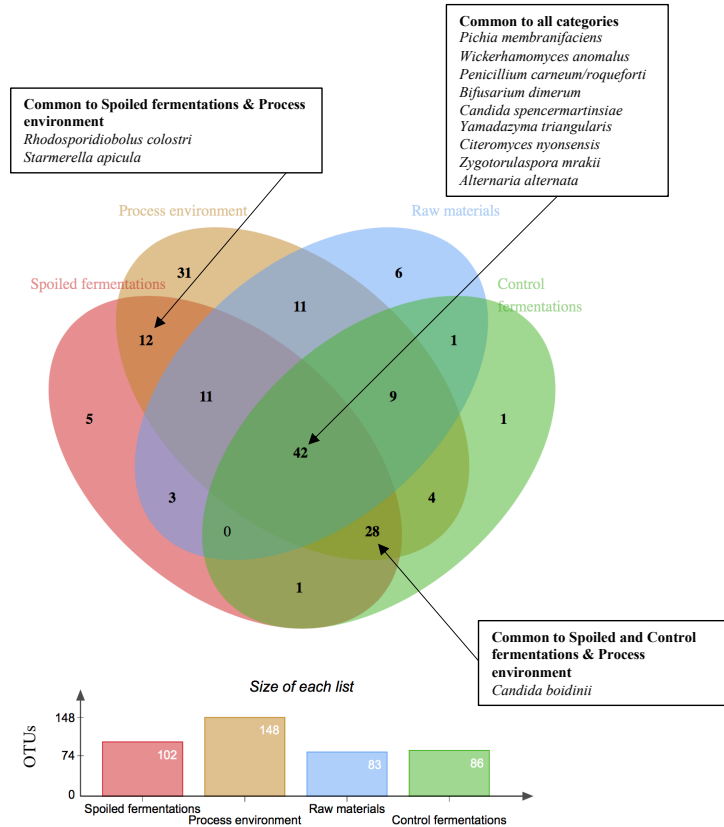
**Fig. 7. Potential contributors to fungal fermentation community based on SourceTracker analysis of ITS2 metagenetic sequencing data.**



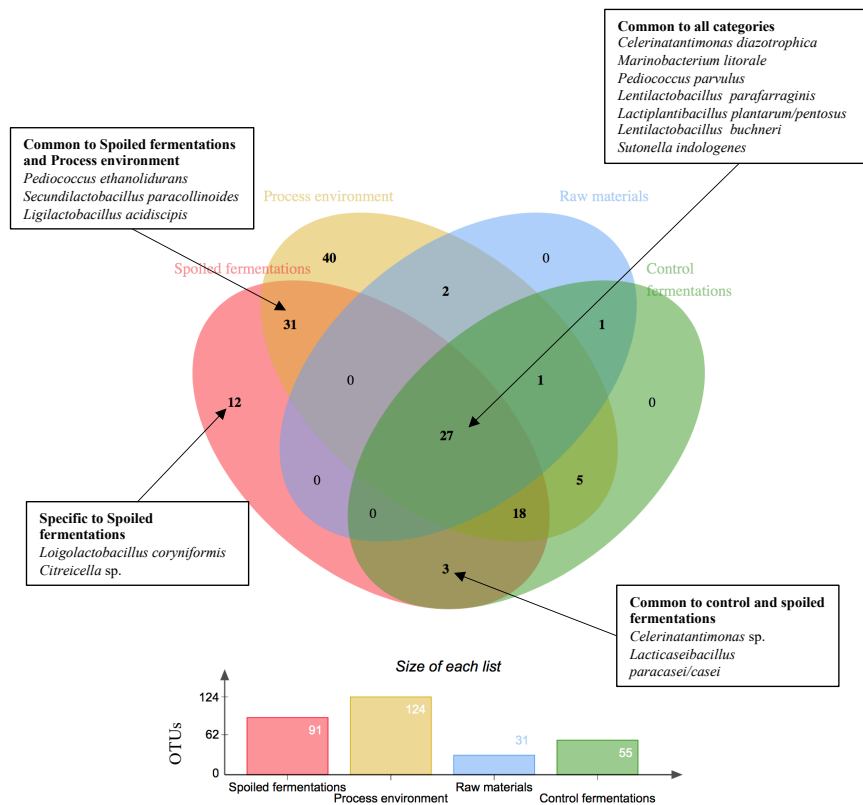
**Fig. 8. Bacterial diversity (35 most retrieved species) encountered in raw material and process environment samples in the olive fermentation-plant as revealed by V3-V4 16S rRNA gene metagenetic analysis.** For each sample, proportion of sequences affiliated at the species level are presented.



**A**



**B**

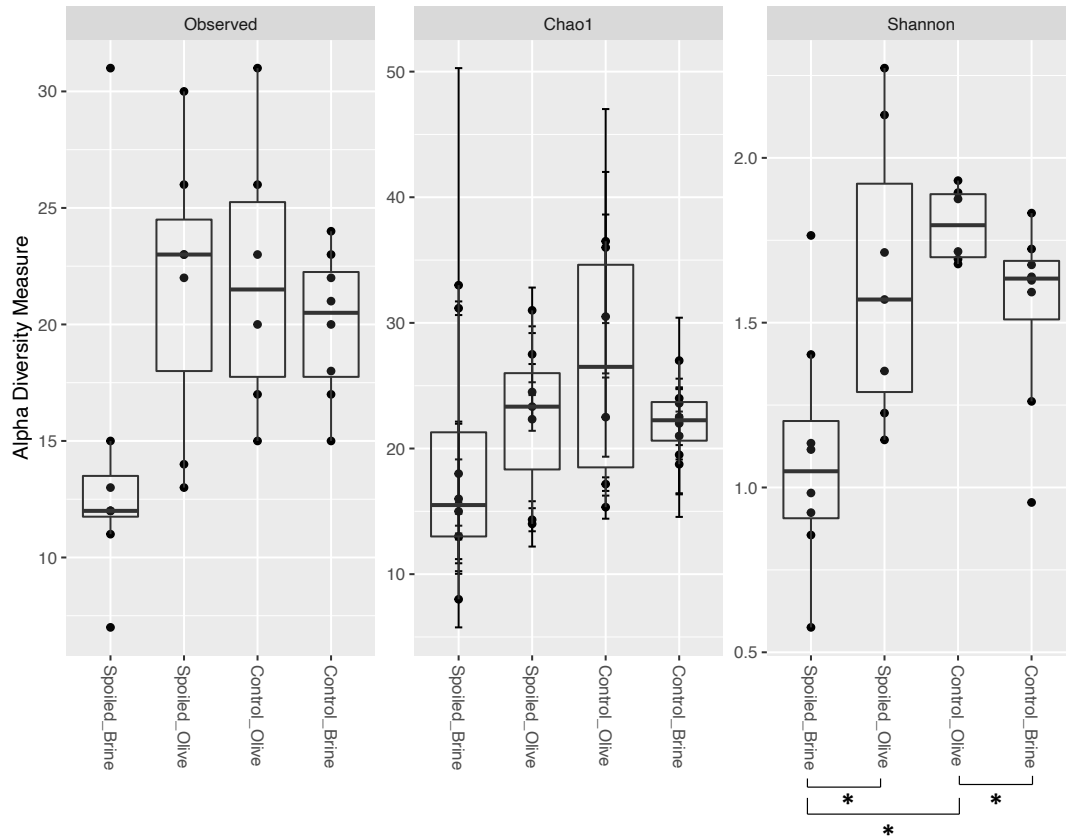


**Fig. 9. Venn diagrams of (A) fungal and (B) bacterial distribution among fermentations and environment components.** Numbers in each circle correspond to the specific or shared number of OTUs (affiliated at the genus or species level) obtained by metagenetic analysis. Dominant/major control fermentation or spoilage species position is highlighted in the boxes.

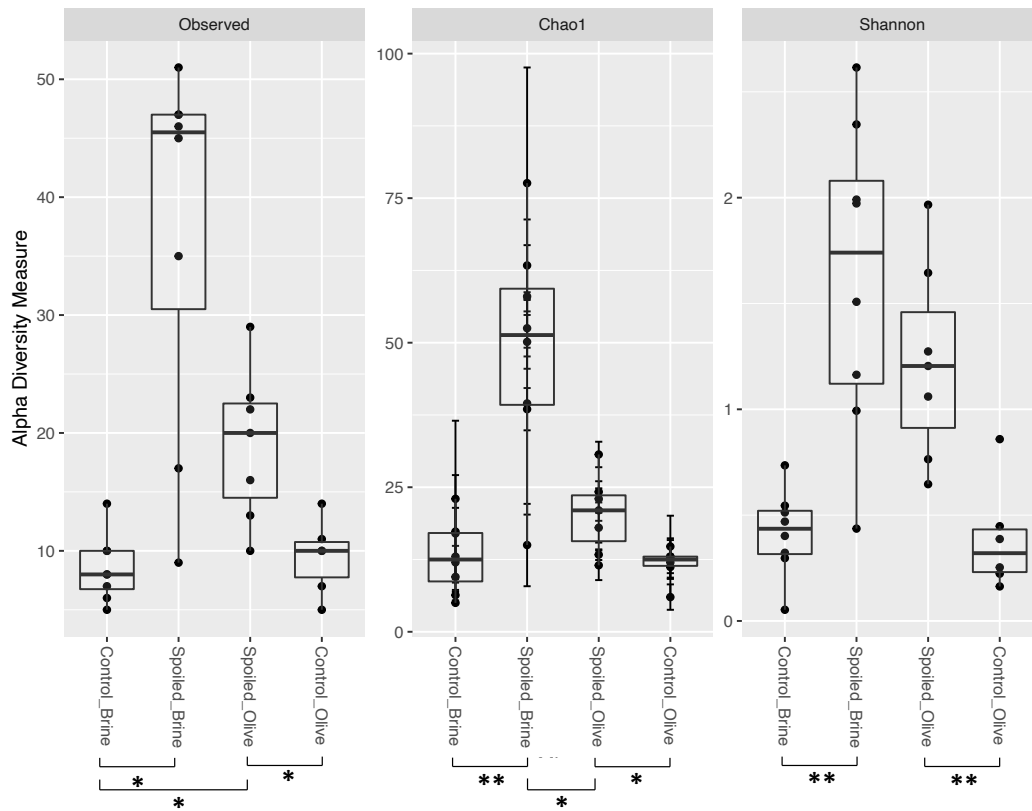
## *Supplementary material article 3*

**Supplementary Table S1.** OTU number per process environment and raw material samples.

<b>Samples</b>	<b>OTU number bacteria</b>	<b>OTU number fungi</b>
<b>Process environment (surfaces)</b>		
Optical_sorter_surf	17	37
PF_treadmill_surf	11	26
Wall_surf	11	40
DrainingS_A	31	48
DrainingS_B	73	63
Cond_treamill	46	54
<b>Process environment (liquid)</b>		
Filtered_brine	18	23
St_water_A	66	33
St_water_B	32	33
Optical_water	33	77
DS_water	41	62
Washing.water	38	15
<b>Raw materials</b>		
FF_1	9	11
FB_1	15	34
FF_2	6	11
FB_2	15	25
Salt_A	12	38
Salt_B	9	33



**Supplementary Fig. S1. Alpha diversity plots of fungal communities between control and spoiled fermentation samples. based on Richness, Chao1 and Shannon indexes.** Symbols indicates significance level based on Wilcoxon test adjusted (FDR) Pvalue : \*\*\*  $P < 0.001$  ; \*\*  $P < 0.01$  ; \*  $P < 0.05$

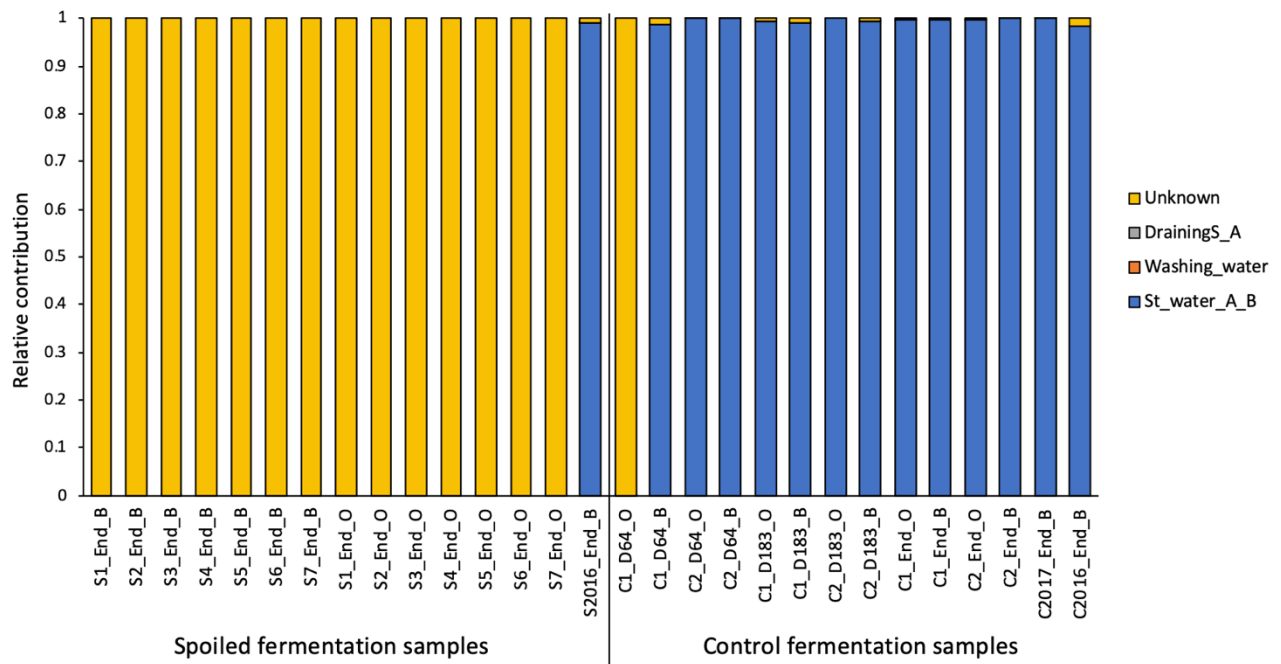


**Supplementary Fig. S2. Alpha diversity plots of bacterial communities between control and spoiled fermentation samples.** Richness, Chao1 and Shannon indexes are presented. Symbols indicate significance level based on Wilcoxon test adjusted (FDR) Pvalue : \*\*\* P<0.001 ; \*\* P<0.01 ; \* P<0.05



OTU	Affiliation at the species- or genus-level	OTU	Affiliation at the species- or genus-level
Cluster_2	<i>Celerinatantimonas diazotrophica</i>	Cluster_32	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
Cluster_4	<i>Lentilactobacillus parafarraginis</i>	Cluster_33	<i>Halomonas</i> sp.
Cluster_5	<i>Pediococcus parvulus</i>	Cluster_35	<i>Arcobacter</i> sp.
Cluster_6	<i>Suttonella indologenes</i>	Cluster_40	<i>Pseudoocceanicola</i> sp.
Cluster_7	<i>Marinobacterium litorale</i>	Cluster_44	<i>Marinilactibacillus</i> sp.
Cluster_8	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Cluster_45	<i>Brevundimonas</i> sp.
Cluster_9	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	Cluster_46	<i>Paucilactobacillus hokkaidonensis</i>
Cluster_10	<i>Rosenbergiella epipactidis/nectarea</i>	Cluster_47	<i>Pseudoocceanicola marinus</i>
Cluster_11	<i>Secundilactobacillus paracollinoides</i>	Cluster_50	<i>Marteella</i> sp.
Cluster_12	<i>Flavobacterium</i> sp.	Cluster_55	<i>Methylofaga</i> sp.
Cluster_13	<i>Lactiplantibacillus pentosus/plantarum/paraplantarum</i>	Cluster_77	<i>Celerinatantimonas</i> sp.
Cluster_14	<i>Photobacterium gaetbulicola</i>	Cluster_91	<i>Halomonas</i> sp.
Cluster_15	<i>Halanaerobium salsuginis</i>	Cluster_93	<i>Halanaerobium hydrogeniformans</i>
Cluster_17	<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	Cluster_94	<i>Lacticaseibacillus paracasei/casei/zeae</i>
Cluster_20	<i>Corynebacterium</i> sp.	Cluster_106	<i>Marinospirillum</i> sp.
Cluster_21	<i>Ligilactobacillus acidipiscis</i>	Cluster_116	<i>Escherichia coli</i>
Cluster_25	<i>Halomonas variabilis</i>	Cluster_176	<i>Mesorhizobium</i> sp.
Cluster_30	<i>Levilactobacillus</i> sp.		

**Supplementary Fig. S3. OTU heat-map of bacterial communities in spoiled fermentation brine and olive fruits compared to control ones. OTU affiliation at the species- or genus-level are given in the table below the figure.**



**Supplementary Fig. S4. Potential environmental contributors to bacterial fermentation community based on SourceTracker analysis (V3-V4 16S rRNA gene metagenetic sequencing data).**

## **VI. Annexe 1 - Validation des étapes d'extraction et d'amplification pour les analyses métagénétiques**

### **▪ Objectif**

Avant de procéder aux analyses, des pré-manipulations ont donc été réalisées afin de valider d'une part le protocole d'extraction et d'autre part le choix des amorces universelles pour l'amplification.

### **▪ Matériel et méthodes**

#### Variables testées :

Concernant l'extraction, l'efficacité du protocole a été testée sur des échantillons d'olives de Nyons à deux stades de fermentations, 21 et 42 jours. Les tests ont été réalisés sur les fruits et sur la saumure sachant que les communautés abritées en surface de l'olive et en suspension dans la saumure étaient susceptibles de varier.

Deux variables ont été testées : le kit d'extraction et le couple d'amorces ciblant la région ITS2. Concernant le kit, le premier était le kit DNeasy Blood and Tissue samples (préalablement utilisé en interne pour des analyses métagénétiques de matrices alimentaires), le second, le Kit NucleoSpin Soil DNA kit (Macherey-Nagel, Germany).

#### Préparation des culots cellulaires et extraction des ADNs:

Quel que soit le kit d'extraction, les culots cellulaires d'olives ont été préparés comme suit : 10 g de chair d'olive ont été broyés dans du diluant Tryptone Sel (TS) (dilution 1/5) puis le mélange centrifugé (600 g, 5 min, 4°C) afin d'éliminer les particules d'olives. Une deuxième centrifugation a été réalisée à partir du surnageant (9000 g, 15 min ; 4°C) et les culots cellulaires obtenus séchés. Pour la saumure, 5 mL de saumure ont été centrifugés puis le culot rincé dans du diluant TS (9000 g, 15 min ; 4°C) puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions.

Concernant l'extraction d'ADN à partir des culots ainsi préparés, quel que soit le kit employé, une phase de lyse enzymatique (lyticase 20 mg/mL; lysozyme 20 mg/mL et mutanolysine 10mg/mL) visant à rompre les cellules bactériennes et fongiques a été appliquée. A l'issue de cette première phase, le reste des extractions ont été conduites selon les instructions du

fabricant. Les protocoles différaient par la suite selon le kit, bien que tous deux comprenaient une lyse mécanique.

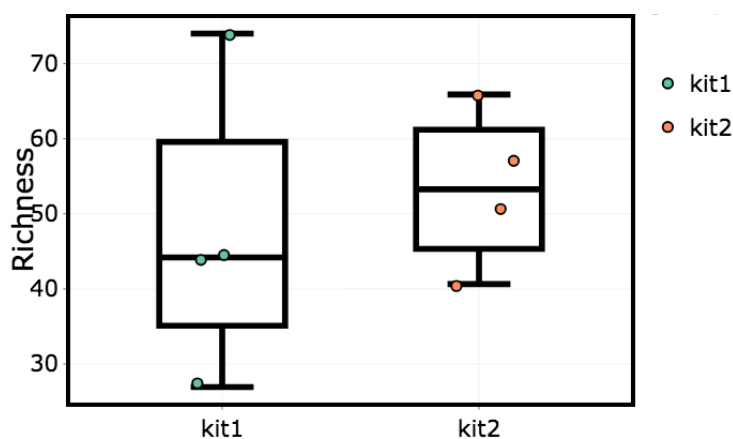
### Conditions d'amplification

Les conditions d'amplification testées étaient similaires à celles testées pour le Pélardon. L'amplification a été réalisée pour les ADN bactériens en ciblant la région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S. Les amorces S-D-Bact-0341-b-S-17 et S-D-Bact-0785-a-A-21 (Klindworth et al., 2013) précédemment testées en interne dans le cadre de l'étude de nombreuses matrices alimentaires ont été utilisées. Pour les ADN fongiques, deux paires d'amorces ciblant la région ITS2 ont été testées : les amorces ITS3f/ITS4\_Kyo1 développées par Toju et al. (2012) et le couple ITS3tagmix1/ ITS4ngs développé par Tederso et al., (2014), en suivant les conditions d'amplification décrites dans les publications respectives.

## ■ Résultats

### Impact des paramètres testés sur les communautés bactériennes

Afin d'évaluer l'impact des différentes techniques testées, une analyse de la diversité  $\alpha$  a été réalisée sur les différents échantillons après normalisation (méthode utilisée - total sum scaling normalization) et les différences évaluées par analyse de la variance (ANOVA).



**Figure 18. Comparaison diversité alpha des échantillons selon le kit d'extraction utilisé**

L'indice de Richesse c'est-à-dire le nombre d'OTUs détectés par échantillon a été utilisé comme indicateur de la diversité  $\alpha$  (Figure 18).

Les résultats ont ainsi montré qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les indices de richesse des échantillons extraits avec le kit 1 ou le kit 2 ( $P = 0,61$ ). De la même manière, l'utilisation d'un kit ou de l'autre n'impactait pas les communautés bactériennes (diversité  $\beta$ )



et n'engendrait pas une sur-représentation d'une même espèce dans un kit par rapport à l'autre (Tableau 15).

**Tableau 15. Analyse de la diversité alpha et beta des communautés bactériennes selon les différentes variables expérimentales. Les Pvalue associées au test ANOVA pour la diversité  $\alpha$  et au test Adonis (distance de bray curtis) pour la diversité  $\beta$  sont données**

Pvalue	Diversité $\alpha$	Diversité $\beta$
Variable	Indice de Richesse	Distance de Bray-Curtis
Kit d'extraction	0,61	0,75
Temps	0,059	0,003
Type matrice	0,5	0 ,001

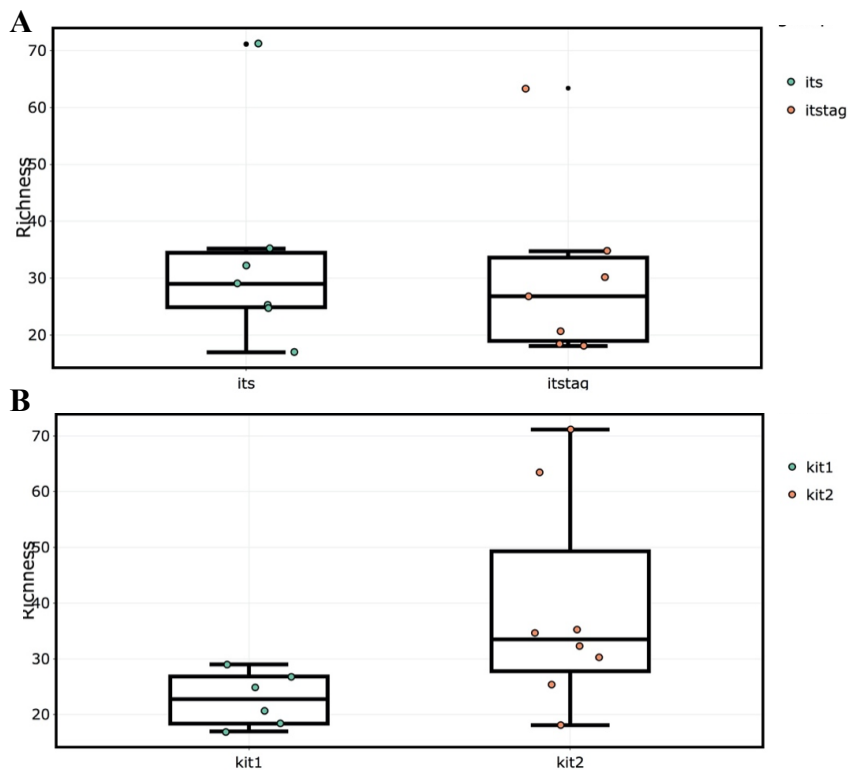
#### Impact des paramètres sur les communautés fongiques

Les résultats des tests d'analyse de la variance pour les différents indices et selon les variables testées sont présentés en **Tableau 16**.

**Tableau 16. Résultats des tests d'Analyse de la Variance sur la diversité alpha des communautés fongiques des différents échantillons en fonction des paramètres d'extraction et d'amplification testés.**

Pvalue	Diversité $\alpha$	Diversité $\beta$
Variable	Indice de Richesse	Distance de Bray-Curtis
Kit d'extraction	0,064	0,04
Amorces	0,73	0,07
Temps	0,059	0,003
Type matrice	0,025	0,003

Concernant les populations fongiques, le kit d'extraction utilisé n'influait pas de manière significative les indices de richesse des différents échantillons bien que les valeurs soient légèrement supérieures pour le kit 2 (**Figure 19**). En revanche, la diversité  $\beta$  qui s'intéresse aux différences de structure des communautés et les abondances des espèces présentes a montré des différences selon le type de kit ( $P= 0,04$  ;  $R^2= 0,05$ ). Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les deux couples d'amorces testés.



**Figure 19. Représentations graphiques de la diversité alpha en fonction des deux variables étudiées, le kit d'extraction (A) et les amorces ITS2 (B) utilisées.** Légende :Kit 1 – Qiagen Blood and Tissue , Kit 2 Macherey-Nagel Nucleospin soil kit, its – Couple d'amorces ITS3f/ITS4\_Kyo1 , itstag – couple d'amorces ITS3tagmix1/ ITS4ngs

## ■ Conclusion

Les analyses statistiques réalisées sur l'impact du kit d'extraction sur les communautés bactériennes n'ont pas montré de différence significative entre les kits. En revanche, pour les populations fongiques, la diversité alpha semblait supérieure pour les échantillons extraits avec le kit 2 et un impact bien que faible était également noté au niveau de la diversité alpha. En conséquence, le kit 2 NucleoSpin soil a été sélectionné pour la suite des analyses. Aucune différence significative n'a cependant été mise en évidence concernant les amorces fongiques. Les amorces ITS3f/ITS4\_Kyo1 ont donc été arbitrairement choisies.

## VII. Annexe 2 – Position phylogénétique de *Celerinatantimonas diazotrophica*

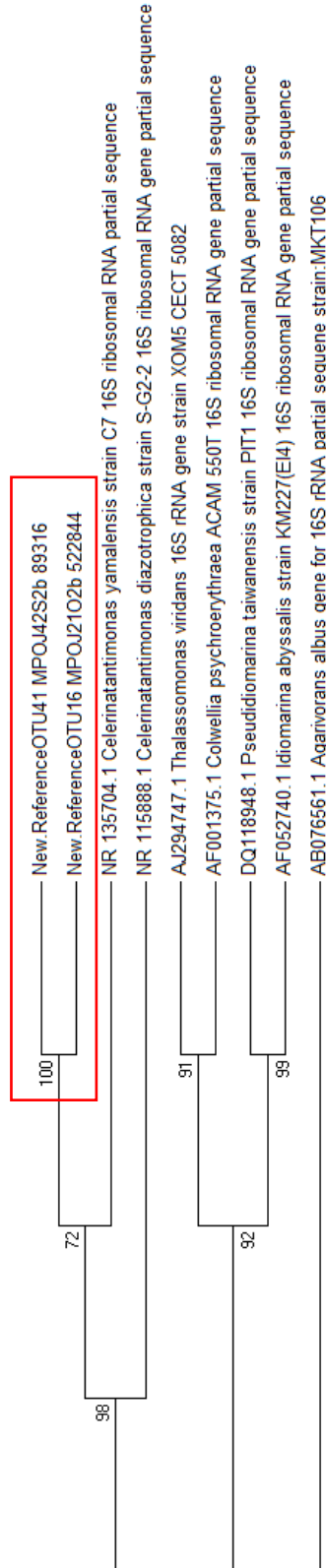


Figure 20. Position phylogénétique de *Celerinatantimonas diazotrophica* identifiées dans les olives de Nyons sur la base des séquences 16S (V3-V4)





---

# **Chapitre III - Exploitation des ressources microbiennes autochtones au profit de la fermentation**

---

Cas des olives de Nyons

*Étude préliminaire*



## I. Résumé des travaux

### ■ Contexte

Cette troisième partie porte sur l'exploitation des micro-organismes autochtones au profit de la fermentation des olives de Nyons. L'étude précédente a montré l'influence de l'environnement sur les fermentations spontanées. Cette influence s'est avérée positive en agissant comme un réservoir des bactéries et levures dominantes lors de la fermentation, mais aussi négative par la présence de certaines bactéries lactiques mises en cause dans les dérives de fermentation rapportées. L'étude menée sur la diversité microbienne a également montré que les populations dominantes au cours de la fermentation sont présentes à faible niveau de population au début de la fermentation, ce qui induit un démarrage lent de la fermentation et pourrait potentiellement expliquer les durées de fermentation particulièrement longues des olives de Nyons.

Comme exposé en introduction bibliographique, ces considérations liées à la variabilité des productions ne sont pas spécifiques aux olives de table. Pour pallier ces problèmes, pour de nombreux aliments fermentés, l'ajout de cultures starters en début de fermentation est une pratique courante. En revanche, dans le cas des olives de table, ce procédé est peu répandu bien que de plus en plus étudié. Les études disponibles sur le sujet portent, en revanche, en grande majorité sur l'inoculation mono-souche de bactéries lactiques ou de levures préalablement sélectionnées pour leur propriétés technologiques.

Ce type d'approche présente deux inconvénients majeurs pour une potentielle application à un produit soumis à une AOP tel que les olives de Nyons. D'une part, elle repose souvent sur l'inoculation d'une seule souche appartenant à une espèce dominante et donc peu représentative de la diversité rencontrée habituellement et, d'autre part, il ne s'agit pas forcément de souches autochtones à la fermentation.

### ■ Objectif de l'étude et hypothèse de départ

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt de fermentations dirigées dans le cas des olives de Nyons. L'hypothèse de départ posée est que l'apport de micro-organismes autochtones bénéfiques, sous forme d'un *consortium* complexe représentative du "core microbiote" mise en évidence dans l'étude précédente, dès la mise en saumure, permettrait d'amorcer de manière plus rapide et positivement la fermentation des olives de Nyons et le procédé de fermentation. Deux approches ont ainsi été évaluées : une inoculation d'une



communauté complexe définie recréant la diversité fongique autochtone dominante au cours des fermentations et une inoculation par *backslopping* à partir de saumure d'une précédente fermentation. Par ailleurs, en lien avec la problématique de notre coopérative partenaire, une fermentation à teneur réduite en sel (8%) a été testée avec ou sans ajout du *consortium*. Dans tous les cas, les fermentations ont été réalisées en présence du microbiote naturellement présent.

### ■ Stratégie expérimentale

L'étude a été menée en deux temps. Dans un premier temps, 48 isolats représentatifs des cinq espèces dominantes au cours des fermentations suivies lors de l'**étude 2** ont été criblés pour leurs propriétés technologiques. Neuf caractéristiques phénotypiques considérées comme désirables (résistance au sel, activité  $\beta$ -glucosidase, activité killer, activités lipolytiques) ou indésirables (production de CO<sub>2</sub>, production d'H<sub>2</sub>S, activité pectinolytique, activité protéolytique) dans le cadre de la fermentation des olives ont été testés *in vitro*. Sur la base des résultats de ces tests, huit isolats ont été ensuite sélectionnés.

Dans un second temps, cinq fermentations dirigées ont été lancées sur le site de la coopérative partenaire autour de trois conditions expérimentales. La première condition consistait en l'inoculation de la culture complexe dans une saumure à 10% de sel (C10) avec en parallèle le suivi d'une fermentation non inoculée servant de contrôle (T10). La seconde condition consistait à inoculer la culture complexe dans une saumure à 8% (C8) et à comparer l'impact à une fermentation spontanée à 8% de sel (T8). Enfin, la dernière condition (Ba) consistait à inoculer une cuve par *backslopping* (taux inoculation : 5%) à partir d'une saumure issue d'une précédente fabrication.

Toutes ces fermentations ont été lancées le même jour et préparées dans les mêmes conditions (même lot d'olives, matériel habituel) que les fermentations « classiques ». Pour chacune de ces conditions expérimentales, des prélèvements ont été effectués au premier jour (inoculation) puis au 8<sup>e</sup>, 64<sup>e</sup>, 167<sup>e</sup> et 365<sup>e</sup> jour de fermentation. De manière comparable à ce qui a été réalisé au cours de l'étude de diversité, trois types d'analyses ont été menées sur ces échantillons : énumération sur milieux de culture des populations microbiennes, analyse culture-indépendante des communautés bactériennes et fongiques de la saumure (métagénomique) et analyse du volatilome (headspace GC-MS). De plus, pour les fermentations inoculées avec la culture complexe assemblée, l'implantation des souches dans

les premiers mois de la fermentation a été suivie par PCR M13 au 1<sup>er</sup> jour, 64<sup>e</sup>, 167<sup>e</sup> jour de fermentation.

**Les résultats de cette étude ont fait l'objet de l'article 4 en préparation. Les conclusions majeures à l'issue de cette étude sont présentées ci-après.**

*N.B :* Au moment de l'écriture de ce manuscrit, les données de séquençage sont toujours en cours d'acquisition auprès du prestataire. Aussi, leur analyse n' a pu être incluse dans l' **article 4** présenté en partie **II** de ce chapitre. Les conclusions et les discussions qui en découlent sont faites sur la base des données disponibles.

▪ **Criblage des propriétés technologiques et sélection des levures autochtones**

Les neuf tests phénotypiques réalisés sur les 48 isolats ont révélé des variations inter- et intra-spécifiques sur l'ensemble des critères. Concernant les activités désirées, sur la base des tests effectués *in vitro*, aucun isolat n'a montré d'activité  $\beta$ -glucosidase, qui est impliquée dans la dégradation microbienne de l'oleuropéine. Une activité lipolytique (estérase ou lipase) n'a été mise en évidence que pour un isolat appartenant à l'espèce *Zygorulasporea mrakii*. Trois isolats appartenant à l'espèce *W. anomalus* ont montré une activité killer. Concernant l'halotolérance, plus de 85% des isolats étaient capables de se développer à des concentrations de 0 à 8% de NaCl.

De manière générale, les isolats testés ont montré peu de propriétés indésirables. Les productions de CO<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>S étaient négatives pour 87,5 % des souches et les souches H<sub>2</sub>S positives appartenant principalement à l'espèce *Candida boidinii*. Par ailleurs, seuls deux isolats ont montré une faible activité protéolytique *in vitro*.

Compte-tenu des résultats observés, la sélection des isolats s'est principalement opérée sur l'absence de critères indésirables, la résistance au sel et la présence d'une activité killer . La culture complexe était composée de 8 isolats appartenant à cinq espèces différentes mélangées en même proportion : *Citeromyces nyonsensis* R2B1D183.Y47, R2C3D64.Y26, R1B2D64.Y23 ; *Pichia membranifaciens* R1C1D183.Y30, R2C1D183.Y57; *Wickerhamomyces anomalus* R2B1D64.Y23 ; *Zygorulasporea mrakii* R2B3D64.Y38 and *Candida atlantica* R2C1D64.Y30).

- **Déroulement global des fermentations**

Aucune déviation microbiologique n'a été observée au cours des cinq fermentations suivies. Tous les critères de sécurité sanitaire (absence de pathogène alimentaire) et hygiéniques étaient satisfaits au regard de la réglementation européenne (EU 2073/2005). De même, l'évolution du pH était similaire quelle que soit la condition testée, avec une baisse de pH observée dans les premières semaines de fermentation.

- **Impact des différentes conditions expérimentales sur le volatilome des olives**

L'évolution des profils volatils étaient semblables à ceux précédemment observés avec une forte abondance d'aldéhydes en début de fermentation, une augmentation progressive de certains esters entre le premier et le 64<sup>e</sup> jour et une augmentation de l'abondance d'autres esters et de composés phénoliques dans la dernière partie de la fermentation. L'analyse par regroupement hiérarchique a montré que le stade de fermentation influençait le plus fortement le profil de volatils des olives, suivi par le taux de sel de la saumure et en dernier lieu, l'inoculation de la culture complexe. Des différences significatives d'abondance entre les conditions testées et les cuves témoins ont néanmoins été observées pour certains composés volatils spécifiques.

#### Impact de l'inoculation par *backslopping* sur le volatilome des olives en fin de fermentation (Ba versus T10)

L'inoculation par *backslopping* a montré les plus fortes différences par rapport aux autres conditions. Sept composés étaient présents en plus forte abondance par comparaison avec la cuve témoin à 10% de sel (principalement des alcools et des esters) et neuf composés étaient présents en plus fortes abondances par comparaison avec la cuve à 10% inoculée avec la culture complexe. Par ailleurs, les effets du *backslopping* différaient de ceux de la culture complexe puisque les composés touchés n'étaient pas les mêmes que dans la condition C10. Toutefois, les analyses sensorielles préliminaires réalisées sur cette cuve ont donné des retours mitigés. Les olives étaient caractérisées par un goût « douçâtre » et « acétique » par le panel de dégustateurs de la coopérative. Cette évaluation pourrait être liée aux plus fortes abondances d'esters qui apportent des arômes fruités et floraux.

### Impact de la culture complexe sur le volatilome des olives en fin de fermentation (C10 vs T10 et C8 vs T8)

Les résultats ont également montré que l'impact de la culture complexe différait en fonction de la concentration en sel. Par rapport à la condition témoin, l'inoculation de la culture complexe à 10% a mené à une plus forte abondance de 6 composés et une plus faible abondance de 3 composés. En comparaison, 7 composés étaient trouvés en plus forte abondance et 2 en plus faible dans la cuve à 8% de sel inoculée avec la culture complexe. Seuls 4 composés étaient communs aux deux conditions. Le 2-méthoxyphénol, le styrène étaient ainsi présents en plus forte abondance et l'acide propanoïque, l'acétate d'éthyle en plus faible abondance.

Ces différences de profils n'ont pas engendré de différence majeure au niveau sensoriel selon le panel de dégustateurs et les olives inoculées aux deux concentrations testées ont été appréciées.

### Impact de la réduction du sel sur la fermentation spontanée (T8 vs T10)

La réduction du taux de sel a engendré peu d'impact significatif sur le profil de volatils des olives. Trois composés dont l'acide propanoïque ont été retrouvés en plus faibles abondances et deux autres en plus fortes abondances.

## ■ Conclusion préliminaire

La caractérisation des isolats par les différents tests effectués n'a pas révélé d'activités positives ou négatives marquées pour les différentes espèces.

La culture complexe assemblant 8 souches et recréant les communautés fongiques a engendré un impact limité sur la fermentation : aucune dérive microbienne n'a été recensée et les olives étaient, aux vues des premières dégustations, conformes aux attentes des producteurs. A l'inverse, l'inoculation par *backslopping*, si elle s'est traduite par des changements plus marqués au niveau du volatilome, a été négativement perçue d'un point de vue sensoriel. La réduction de sel s'est avérée prometteuse dans la mesure où les olives à l'issue de la fermentation en saumure à 8% étaient conformes d'un point de vue sensoriel et sanitaire, tout en répondant au critère nutritionnel.

Les analyses métagénomiques en cours permettront d'une part de confirmer les dynamiques microbiennes entrevues à travers le suivi d'implantation de la culture complexe et d'autre part, d'apporter certains éléments de discussion quant à la relation entre les espèces présentes et les

volatils dont les abondances diffèrent significativement selon les conditions expérimentales testées.

## **II. Article 4 en préparation**

**Penland M., Pawtowski A., Pioli A., Maillard M., Debaets S., Falentin H., Deutsch S., Mounier J. and Coton M., Impact of a tailored complex starter culture for Nyons black table olive fermentations.**

*Manuscript in preparation*

1 **Impact of a tailored complex starter culture for Nyons black table olive**  
2 **fermentations**

3

4 Marine Penland<sup>1,2</sup>, Audrey Pawtowski<sup>1</sup>, Azzurra Pioli<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Maillard<sup>2</sup>, Stella  
5 Debaets<sup>1</sup>, Hélène Falentin<sup>2</sup>, Stéphanie-Marie Deutsch<sup>2</sup>, Jérôme Mounier<sup>1</sup> & Monika Coton<sup>1\*</sup>

6 <sup>1</sup>Univ Brest, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, F-29280  
7 Plouzané, France

8 <sup>2</sup>STLO, INRAE, Institut Agro, 35042, Rennes, France

9

10 **\*Corresponding author:** Monika Coton

11 Phone : +33 (0)2.90.91.51.55

12 E-mail: monika.coton@univ-brest.fr

13

## 14        **1. Introduction**

15        Table olives are among the most consumed fermented vegetables worldwide with 2.57  
16 million tons produced in 2019 (International Olive Council, 2019). Although native to the  
17 Mediterranean region, they are produced and consumed worldwide. Table olives are highly  
18 appreciated by consumers for their pleasant taste and aromas as well as for their well-known  
19 health benefits (Peres et al., 2017). Preparation of table olives relies on three main processes:  
20 Spanish-style process (lye-treated green olives prior to fermentation in brine), Californian-  
21 style preparation (ripe olives processing technology including lye treatment and air oxidation)  
22 and Greek-style olives (naturally fermented black olives in brine) (Romeo, 2012).

23        Nyons table olives are black table olives with protected designation of origin (PDO) status  
24 produced in southern France. They are prepared according to the Greek-style process and PDO  
25 specifications: olives are from the Tanche variety, harvested at full maturity during the winter  
26 season and directly immersed in 10% NaCl brine for up to 1.5 years. In a recent study,  
27 conventional and organic Nyons table olives microbiota were deciphered during multiple  
28 year-long fermentations (Penland et al., in press). As with many spontaneous or natural  
29 fermentations, very rich and complex microbiota were revealed, in peculiar for fungal  
30 communities. These results also highlighted the fungal species most likely to be the main key  
31 players for this fermentation.

32        Although the complex microbial diversity of naturally fermented table olives is most  
33 often correlated to complex organoleptic properties, it can also lead to the presence of  
34 unwanted microorganisms and cause quality defects such as textural changes, off-flavors and  
35 off-odors (Golomb et al., 2013; Lanza, 2013). In this context, the use of tailored starter  
36 cultures to better control the fermentation of table olives is clearly of interest. Recent work on  
37 table olive fermentations has focused on the selection and inoculation of microorganisms with  
38 interesting technological features with an emphasis on lactic acid bacteria (LAB) (Panagou  
39 and Tassou, 2006; Campus et al., 2015). LAB are interesting for their probiotic potential and  
40 were shown to be beneficial with regard to production of diverse organic acids (Hurtado et  
41 al., 2012; Bautista-Gallego et al., 2013). Together with LAB, yeasts are also known to be  
42 among the main microorganisms involved in table olive fermentations, especially in naturally  
43 fermented olives (Arroyo López et al., 2012; Heperkan, 2013). In the case of Nyons table  
44 olives, yeasts were actually shown to play a central role in this fermentation and largely  
45 contributed to both acidification and volatile profile enhancement throughout the fermentation  
46 (Coton et al., 2006; Penland et al., in press). In recent years, some studies have also



47 successfully explored the potential of yeast starters in table olive fermentations and beneficial  
48 outcomes regarding debittering and olive organoleptic profiles were observed (Psani and  
49 Kotzekidou, 2006; Ciafardini and Zullo, 2019). However, some yeast species metabolisms  
50 can also lead to olive spoilage (Arroyo et al., 2012), hence it is necessary to select the most  
51 appropriate candidates. With this in mind, the most desirable selection criteria and strain  
52 properties include halotolerance,  $\beta$ -glucosidase and lipase activities while undesirable  
53 properties correspond to strong pectinolytic and proteolytic activities or CO<sub>2</sub> production  
54 (Bevilacqua et al., 2012; Corsetti et al., 2012; Bonatsou et al., 2015).

55 If starter culture selection and their use are at the center of olive fermentation research,  
56 another topic of interest deals with the salt-levels used in natural olive fermentations. In recent  
57 years, consumer demands are increasing when it comes to healthier and higher nutritional  
58 value products that also preserve their typical tastes and aromas. While table olive nutritional  
59 properties (e.g. polyphenols, antioxidant properties) are well-known, their high sodium  
60 content may hinder their consumption. This is particularly true with naturally fermented black  
61 olives as high salt contents (up to 10%) are classically used to prevent spoilage and contribute  
62 to the debittering phase when compared to green olives (6%). Hence, salt reduction in brines  
63 used for Nyons table olives would be of interest for manufacturers while preserving their  
64 typical organoleptic properties is recommended. Although recent studies have evaluated the  
65 substitution of NaCl with other chloride salts, e.g., KCl (Bautista Gallego et al., 2011; Zinno  
66 et al., 2017), such alternatives have to be accepted by both consumers and olive producers  
67 who are attached to traditional know-how, especially regarding PDO status products.

68 In this context, our study aimed at tailoring a complex starter culture of autochthonous  
69 yeasts that mimic the natural diversity of Nyons table olives. Autochthonous yeast isolates  
70 were first screened for their main technological properties of interest. Then, two inoculation  
71 strategies were implemented, i.e., inoculation of an autochthonous undefined culture using  
72 brine backslopping method and inoculation of a tailored complex yeast starter culture in  
73 addition to the natural microbiota. In both cases, microbial dynamics and olive volatile profiles  
74 were assessed in traditional 10% brine fermentations and in a reduced salt condition (8% NaCl  
75 in brines).

76

## 77 **2. Material & methods**

### 78 **2.1. Yeast isolates & culture conditions**

79 A total of 48 yeast isolates, representative of the microbiota identified in PDO Nyons table  
80 olive fermentations, were included in the present study to evaluate their technological  
81 properties. All isolates were previously isolated by Penland et al. (in press) at days 64 or day  
82 183 from traditional spontaneous Nyons table olive fermentations. These isolates were  
83 selected based on their highly heterogeneous profiles previously observed by FTIR clustering  
84 analyses Penland et al. (in press). They were all identified to the species level by sequencing  
85 the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene using the NL1/NL4 primer pair (Kurtzman and  
86 Robnett, 1998).

## 87 **2.2. Screening of technological characteristics**

### 88 **2.2.1. Culture conditions**

89 Each isolate was grown on Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC) agar supplemented with  
90 5% NaCl for 5 days at 25°C. For liquid cultures used for screening tests, a standardized  
91 procedure was used as follows. First, 10 mL of Tryptone Soy Broth with 0.6 % yeast extract  
92 (TSBYE; tryptone soy 30 g/L, yeast extract 6 g/L) were inoculated with one fresh colony and  
93 incubated for 48h with agitation (120 rpm) at 25°C. Then, 100 µL of this culture were  
94 inoculated into 10 mL of fresh TSBYE broth in triplicate and incubated in the same conditions  
95 for 24h. After this time, a standardized suspension at 10<sup>6</sup> CFU/mL was prepared for each  
96 replicate in distilled water and directly used as inoculum for the different screening  
97 experiments.

98

### 99 **2.2.2. Screening autochthonous yeast strains for technological properties**

100 CO<sub>2</sub> production was evaluated by inoculating 100 µL yeast suspension in a tube  
101 containing 10 mL of TSBYE broth and a Durham bell. Tubes were incubated for up to 8 days  
102 at 30°C and checked daily for gas production in the bell. An isolate was considered to produce  
103 CO<sub>2</sub> when growth was clearly visible (troubled medium or biomass pellet observed) and gas  
104 filled and raised the bell to the top of the tube.

105 Salt tolerance was tested by inoculating each strain in TSB broth supplemented with salt  
106 to concentrations ranging from 0 to 10% in microplates. Each well was inoculated with 200  
107 µL of broth and 20 µL of the isolate suspension to reach a final concentration of 10<sup>5</sup> CFU/mL.  
108 Microplates were incubated at 25°C for 7 days. All microplates included control wells without  
109 inoculum to validate the experiments. Growth was monitored daily by observing the presence  
110 or absence of biomass in the wells and absence of growth in the control wells.

111  $\beta$ -glucosidase, esterase, proteolytic, lipolytic, pectinolytic activities, hydrogen sulfide  
112 production and killer activities were qualitatively assessed using specific media as described  
113 below. For each test, the isolates to test were inoculated by depositing 5  $\mu$ L of isolate  
114 suspension as a single spot on the surface of the medium.

115  $\beta$ -glucosidase activity was assessed using arbutin as substrate as described by Bleve et  
116 al. (2015). Yeasts were considered  $\beta$ -galactosidase positive when a dark halo developed  
117 around the yeast colony.

118 Esterase and lipase activities were evaluated according to the methods described by  
119 Fadda et al. (2004). After incubation at 25°C for 48h, activities were considered positive when  
120 a halo could be seen around the yeast colony.

121 Proteolytic activity was assessed by depositing the yeast suspension on Plate Count  
122 Agar supplemented with 50% skim milk as described by Aponte et al. (2010). Plates were  
123 incubated at 22°C for 5 days and proteolytic activity assessed by measuring the diameter of  
124 the opacified halo around the yeast colony.

125 Pectinolytic activity was studied as described by Hernández et al. (2007). Yeast  
126 Nitrogen base (0.67%) with 2% agar was used. The medium was then adjusted to pH 4 and  
127 supplemented with 1.25% pectin. After inoculation, plates were incubated for 10 days at 25°C  
128 and pectinolytic activity was monitored daily by measuring the diameter of the yeast colonies:  
129 activity was considered negative when no halo was observed, weak when the halo was inferior  
130 to 4 mm, positive when halo was superior to 5mm.

131 Hydrogen sulfide production was assessed by depositing a yeast suspension on Biggy  
132 agar (Sigma-Aldrich, Germany) (Aponte et al., 2010). Plates were then incubated at 30°C for  
133 18 to 48h. Isolates were considered H<sub>2</sub>S-positive when the colonies displayed a dark brown  
134 color. Any darkening appearing after 48h hours was considered to be a false positive as  
135 indicated by the manufacturer.

136 Killer activity of the different isolates was assessed using a confrontation test adapted  
137 from the protocol described by Woods and Bevan (1968). *Debaryomyces hansenii* CLIB 197  
138 was used as a sensitive reference strain and inoculated as a surface mat on YGC agar  
139 supplemented with 0.3% methylene blue while yeast isolates were deposited as spots. Plates  
140 were then incubated for 5 days at 25°C and checked daily. A killer activity was identified by  
141 a clear zone/blue killing zone around the tested yeast isolate spot.

142

143 **2.3. Tailored and spontaneous pilot-scale fermentation assays**

### 144        **2.3.1. Experimental design**

145        Five fermentations were monitored over one year to study three experimental conditions  
146        (**Figure 1**). First, the impact of a tailored complex yeast starter culture on the traditional Nyons  
147        olive PDO process was used by inoculating the consortium in 10% marine salt brine (tank  
148        C10) and in presence of the naturally present microorganisms. In parallel, a spontaneous  
149        fermentation in 10% brine (tank T10) was also monitored and used as a control tank. The  
150        second experimental condition aimed at studying the impact of the same starter culture in  
151        reduced-salt fermentation conditions. To do so, the same complex yeast consortium was  
152        inoculated into a tank containing 8% salt (tank C8) and a spontaneous fermentation in 8% salt  
153        (tank T8) was also monitored as a control. The third experimental condition consisted in  
154        inoculating an undefined autochthonous complex culture using the backslopping technique:  
155        fermented brine from a previous batch (inoculation rate 5%) was added to a 10% salt brine to  
156        perform this fermentation. Noteworthy, the batch used for backslopping was previously  
157        monitored in the study by Penland et al. (in press). For all fermentation, the microbiological  
158        and organoleptic characteristics were in accordance with the PDO requirements and the Nyons  
159        olive cooperative specifications.

160        All five fermentations were launched the same day (3<sup>rd</sup> February 2019) with olives from the  
161        same variety (Tanche), caliber and batch. The five tanks (3 experimental conditions and 2  
162        control tanks) were prepared according to the classical procedure: 300 kg of olives were  
163        immersed in 200L of brine. For C8 and C10 tanks, the tailored complex starter culture was  
164        directly added to the brine to obtain  $5 \cdot 10^7$  CFU/L per strain final concentration (see details  
165        below). Fermentation progress was monitored by measuring pH, microbial populations and  
166        shifts in brines and by determining changes in volatile profiles over time.

### 167        **2.3.2. Tailored complex starter culture preparation**

168        The complex starter culture was prepared by mixing eight yeast strains (*Citeromyces*  
169        *nyonsensis* R2B1D183.Y47, R2C3D64.Y26, R1B2D64.Y23; *Pichia membranifaciens*  
170        R1C1D183.Y30, R2C1D183.Y57; *Wickerhamomyces anomalus* R2B1D64.Y23 ;  
171        *Zygorhizula mrakii* R2B3D64.Y38 and *Candida atlantica* R2C1D64.Y30), selected after  
172        the screening experiments. To inoculate the C8 and C10 tanks, the consortium was prepared  
173        as follows: each strain was grown on Potato Dextrose Agar supplemented with 5% NaCl for  
174        5 days at 25°C. Biomass was then gently recuperated and resuspended in physiological water  
175        to create standardized suspensions of  $2 \cdot 10^8$  CFU/mL for each strain. Each strain was then  
176        inoculated at final concentration of  $5 \cdot 10^7$  CFU/L into the fermentation tank.

177 **2.3.3. Microbial monitoring by culture-dependent approach**

178 **2.3.3.1. Enumeration of microbial populations and isolations**

179 Microbial populations of interest were monitored for each tank during the yearlong  
180 fermentation at days 1 (fresh fruit immersed in brine), 8, 64, 167 and 365. Brine and olive  
181 fruits were mixed together: 12.5 g of olives flesh and 12.5 mL of brine were mixed with 225  
182 mL Buffered Peptone Water and homogenized with a stomacher for 3 min at high speed. Serial  
183 dilutions were then prepared in Tryptone Salt diluent (TS ; sodium chloride 8.5 g/L, tryptone  
184 1 g/L) and plated on seven different media to enumerate: total fungal populations (Yeast  
185 extract Glucose Chloramphenicol medium (YGC, 25°C, 5 days), halotolerant fungi (YGC+5  
186 % NaCl, 25°C, 5 days), total microbial populations (PCA, 30°C, 72h), halotolerant microbial  
187 populations (PCA+5% NaCl, 30°C, 72h), enterobacteria (VRBG, 30°C, 48h), lactic acid  
188 bacteria (LAB) (MRS+0.01% cycloheximide, 30°C, 48h ; anaerobiosis) and halotolerant  
189 lactic acid bacteria (MRS+5% NaCl + 0.01% cycloheximide, 30°C, 48h ; anaerobiosis).

190 In order to verify that each individual strain developed and persisted in the inoculated  
191 fermentation tanks (C8 and C10), 50 colonies were randomly taken from YGC+ 5% NaCl  
192 plates at days 1, 64 and 167. Isolates were then purified on YGC+5% NaCl and cryopreserved  
193 in glycerol (15% w/w) and stored at -80°C until M13-PCR fingerprinting.

194 **2.3.3.2. M13 PCR fingerprinting of isolates in tailor-made fermentations**

195 M13 RAPD-fingerprinting was used to monitor strain persistence in the early months of  
196 fermentation in the inoculated tanks C8 and C10. Genetic profiles were first generated for the  
197 8 inoculated strains to confirm their distinct patterns, then on all the yeasts isolated from C8  
198 and C10 tanks at the different dates.

199 RAPD PCR-fingerprinting was performed using the method described by Guinebretiere and  
200 Nguyen-The (2003) using the M13 primer (5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3'). Briefly, DNA  
201 was extracted by suspending a fresh yeast colony in ultrapure water and heating it for 1min in  
202 the microwave to liberate the DNA. DNA amplification was then performed with the  
203 following reaction mix prepared in 20 µL final volume: 2µL DNA, 400 µM dNTP, 2 mM  
204 MgCl<sub>2</sub> and 1.25 U Taq polymerase (GoTaq Promega,France). Amplification conditions were  
205 as follows: 95°C, 5 min; 45 cycles of 95°C, 1 min, 36°C, 1 min; 72°C, 4 min. All amplifications  
206 were performed using a PeqSTAR 2X Gradient Thermocycler (PEQLAB Biotechnologie  
207 GMBH,Erlangen, Germany). PCR sample aliquots (10 µL) were analyzed using 1.2% (w/v)  
208 agarose gels (Promega, France) in 1X TAE buffer at 120 V for 2h and then visualized with

209 Midori Green staining (Nippon Genetics, Germany). The repeatability and reproducibility of  
210 the experiments was evaluated by using the eight inoculated pure strains as controls in all  
211 M13-PCR experiments and verifying that no deviations in their genetic profiles were  
212 observed. M13-PCR genetic profile banding patterns analyses and clustering were analyzed  
213 using the BioNumerics fingerprinting software version 5.1 (Applied Maths, Belgium).

214

### 215 **2.3.4. Brine microbial communities by metabarcoding analysis**

#### 216 **2.3.4.1. DNA extractions for metabarcoding analyses**

217 DNA was extracted from brine samples at days 1, 64 and 365 of fermentation. Extraction  
218 was performed as described by Penland et al. (in press) using NucleoSpin Soil DNA kit  
219 (Macherey-Nagel, Germany). DNA extracts were stored at -20°C until use.

220

#### 221 **2.3.4.2. 16S and ITS metabarcoding analyses (*Pending*)**

222 DNA extracts were submitted to PCR amplification and high throughput sequencing to  
223 study bacterial and fungal diversity at the Genome Quebec sequencing platform (McGill  
224 university, Canada). For bacteria, V3-V4 regions of the 16S rRNA gene was targeted using  
225 S-D-bact-0341-b-S-17 and S-D-BAct-0785-a-A-21 primers and using PCR conditions  
226 described by Klindworth et al. (2013). For fungi, the ITS3f/ITS4\_Kyo1 primers targeting  
227 ITS2 region and PCR conditions were as described by Toju et al. (2012). ITS2 and V3-V4  
228 amplicons were sequenced in the same run using Illumina Miseq PE300 technology  
229 generating 2x300 bp reads.

230

#### 231 **2.3.4.3. Bioinformatical analyses (*Pending*)**

### 232 **2.3.5. Biochemical analyses**

#### 233 **2.3.5.1. pH measurements in brine**

234 Brine samples from each sampling point were analyzed for pH using a pH meter (Hanna  
235 Instruments HI 2020-02).

#### 236 **2.3.5.2. Olive volatile profile using GC-MS**

237 Volatile profiles of olive fruits at day 1, 64 and 365 were obtained for each fermentation  
238 condition in triplicates using Headspace-GC-MS. Compound extraction was performed using

239 a Perkin Elmer Turbomatrix HS-40 trap automatic headspace sampler with trap enrichment  
240 on 2.5 g +/- 0.1 g of olive fruits placed in 22 mL vials. Analyses were performed according to  
241 methods previously described by Harlé et al. (2020). Prior to compound identifications, data  
242 were processed using PerkinElmer Turbomass software, version 5.4.2.1617 and by converting  
243 the raw data to time- and mass-aligned chromatographic peak areas using the open source  
244 XCMS package implemented with the R statistical language (Smith et al., 2006). Parameters  
245 were set as follows: width at half maximum=5, group bandwidth=2, span=0.2. Volatile  
246 compound identification was achieved by comparing the retention index and mass spectral  
247 values (1) from the NIST 2008 Mass Spectral Library (Scientific Instrument Services,  
248 Ringoes, NJ, USA) with a threshold set at 65 % and (2) when possible with those of authentic  
249 standards (Sigma Aldrich, France) analyzed in the same system and those reported in the  
250 literature.

### 251 **2.3.6. Statistical analyses**

252 Statistical analysis of GC-MS data was performed using Principal Component Analysis  
253 (PCA) and a two-way analysis of variance (ANOVA) considering the different conditions and  
254 the stage of fermentation as variables. Tukey's post-hoc test was then used, in order to assess  
255 the differences among inoculated and spontaneous fermentations. Hierarchical clustering and  
256 correlation analyses of the volatile compounds were performed using Ward's minimum  
257 variance linkage and Euclidean distance method. Statistical tests were performed under R  
258 software using FactoMiner and Hmisc packages (Lê et al., 2008; Harrell and Dupont, 2014)  
259 and XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). Representations were obtained using R  
260 ggplot2 package (Wickham, 2016).

## 261 **3. Results & discussion**

### 262 **3.1. Strain characterization and selection**

263 Previous work showed that yeasts were the main microorganisms involved in Nyons table  
264 fermentations (Penland et al., in press). As a result, the present study focused on their  
265 characterization to build the tailored complex starter culture.

266 A total of 48 autochthonous yeast isolates out of a collection of 370 representative isolates  
267 from Nyons table olives were pre-selected based on their FTIR spectrometry heterogeneity  
268 protein profiles (data not shown). These isolates belonged to five species previously identified  
269 as the core mycobiota of Nyons table olive fermentations (Penland et al., in press). All isolates

270 were then screened for nine technological properties including both desirable and undesirable  
271 characteristics for olive fermentations. Test results are presented in **Table 1**.

272 Halotolerance is a major criterium for olive fermentation starter selection as  
273 microorganisms must be able to resist high osmotic stress induced by the high salt levels  
274 encountered in brines (between 6 and 10% according to process), especially in the case of  
275 PDO Nyons table olives requiring 10% salt. Moreover, salt levels can fluctuate throughout  
276 the fermentation in relation with osmotic pressures changes, diffusion and evaporation. Thus,  
277 although all strains were previously isolated from black olive fermentations in brine, their salt  
278 tolerance was re-evaluated in a range of a 0 to 10% NaCl. Results indeed showed inter and  
279 intra-species level variations. While most isolates were able to grow in 0-8% NaCl (>85% of  
280 isolates were considered positive), only 79% grew at 10% and 8% of isolates, mainly  
281 belonging to *Candida boidinii*, did not grow at 10%.

282 Various enzymatic activities also play a major role in olive fermentations and they  
283 may originate from either the olives or be of microbial origin.  $\beta$ -glucosidase activity is  
284 particularly of interest during fermentation as it hydrolyses oleuropein (Ghabbour et al., 2011;  
285 Johnson and Mitchell, 2018). Oleuropein is the major component responsible for the bitter  
286 taste in olive fruits and is known to disappear throughout fermentation, making the olives  
287 edible. In this study, no activity was detected among the 48 screened isolates. When  
288 considering the species involved in this process, this finding contrasts with previous research  
289 as in which screened olive yeast isolates and high  $\beta$ -glucosidase activity was observed for *W.*  
290 *anomalous* isolates (Bautista-Gallego et al., 2011).  $\beta$ -glucosidase activities were also reported  
291 in multiple studies for other yeasts species and was also revealed to be strain-dependent in *C.*  
292 *boidinii* (Ciafardini et al., 2006; Bautista-Gallego et al., 2011).

293 However, our screening results actually confirm previous findings observed during another  
294 Nyons table olive fermentations, characterized by very slow debittering processes for which  
295 we could not find any correlations between oleuropein decrease and microbiota composition  
296 (Penland et al, in press). Hence, diffusion of oleuropein from the pulp to the brine, chemical  
297 hydrolysis under acidic condition and endogenous enzymes from olive fruits are the most  
298 likely mechanisms involved in Nyons table olive debittering process (Ramírez et al., 2016).

299 In a similar way, almost no esterase and lipase activities were observed among the isolates  
300 assayed in this study. Only one *Z. mrakii* isolate (R2B3D64.Y38) showed esterase activity.  
301 These activities, linked with lipolysis, are desirable as they can improve olive flavor by  
302 inducing amino acids catabolism, the release of fatty acids, which are known precursors to  
303 esters.



304 On the other hand, many enzymatic activities are responsible for negative organoleptic  
305 impacts and olive quality defects. High pectinolysis and proteolysis can result in excessive  
306 softening of olive fruits (Hernández et al., 2007; Golomb et al., 2013). Regarding proteolysis,  
307 most isolates showed no apparent activity and only two isolates, belonging to *P.*  
308 *membranifaciens* and *C. boidinii*, showed weak *in vitro* activity. Both isolates were excluded  
309 for use in direct fermentations for this reason. Concerning pectinolytic activity, strong  
310 variations were observed as 20% and 75% showed strong or weak activities, respectively.  
311 High pectinolytic activities were mainly observed among *W. anomalus* and *C. boidinii* isolates  
312 while weak activities were observed for *C. nyonsensis* and *Z. mrakii*. Yeast metabolism can  
313 also indirectly lead to off-flavors or defects in olive fermentations (Lanza, 2013). For example,  
314 CO<sub>2</sub> release is a consequence of sugar consumption and inherent to fermentation. However,  
315 if released at too high level, CO<sub>2</sub> can accumulate and form gas-pockets under the skin and/or  
316 provoke brown discoloration patches in the olive flesh known as the “fish-eye” defect  
317 (Vaughn et al., 1972). Hydrogen sulfide production can also be produced by yeasts via sulfur-  
318 containing amino acid catabolism (Huang et al., 2017). However, it must be emphasized that  
319 sulfur compounds are commonly found in fermented olives and participate to flavor.  
320 However, too high H<sub>2</sub>S levels are linked with unpleasant off-flavors and considered as a  
321 quality defect in food fermentations (Aponte et al., 2010). In this regard, the ability of yeast  
322 isolates to produce excessive amounts of H<sub>2</sub>S and/or CO<sub>2</sub> were assayed for all isolates. No  
323 production was observed for both activities for 41 out of 48 isolates. H<sub>2</sub>S production was  
324 mainly observed in *C. boidinii* isolates while weak CO<sub>2</sub> production was identified for some  
325 *W. anomalus* isolates.

326 Finally, killer activity was also evaluated for the 48 yeast isolates. This property  
327 reflects the production of toxic proteins or glycoproteins than can hamper the growth of other  
328 sensitive yeast strains (Dmarigny et al., 2002) and may provide a competitive advantage to a  
329 given strain during fermentation. Overall, four isolates (10.4%) presented inhibition activity.  
330 Yeasts with killer activities have already been isolated from table olives and belonged to  
331 various species, i.e, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. membranifaciens* and *W. anomalus*  
332 (Marquina et al., 1992; Belda et al., 2017). Our findings corroborate these results as all the  
333 positive isolates belonged to the *W. anomalus* species. In previous studies, some authors  
334 consider this trait as undesirable although, as mentioned, killer activity can provide a  
335 competitive advantage for a strain to persist during fermentation and recent work discussed  
336 its potential to control both fungal populations and spoilage microorganisms (Arroyo-López  
337 et al., 2012; Mannazzu et al., 2019).

338 Based on screening results, eight strains belonging to four dominant species,  
339 *Wickerhamomyces anomalus* (n=1), *Pichia membranifaciens* (n=2), *Citeromyces nyonsensis*  
340 (n=3) and *Zygorhynchus mrakii* (n=1) were selected, as well as one *Candida atlantica* strain  
341 that presented an interesting salt tolerance profile, to be included in the tailored complex  
342 starter culture. As no *C. boidinii* isolate presented a suitable profile for fermentation, the  
343 species was eliminated from the tailored complex starter culture. For the other species, the  
344 selected isolate(s) presented the most favorable profile in terms of desirable traits (salt  
345 tolerance mainly) and undesirable traits (proteolysis, pectinolysis, CO<sub>2</sub> production) . *W.*  
346 *anomalus* R2B1D64.Y23 was chosen for its killer activity and lack of CO<sub>2</sub> production. *P.*  
347 *membranifaciens* R1C1D183.Y30, R2C1D183.Y57 and *C. nyonsensis* R2B1D183.Y47,  
348 R2C3D64.Y26 R1B2D64.Y23 were all chosen for their halotolerance and low pectinolytic  
349 activities. These five species already have Generally Recognized As Safe (GRAS) status and  
350 were then used in complex cultures for controlled fermentation assays.

### 351 **3.2. Microbial population evolution during inoculated and spontaneous fermentations**

352 Microbial populations were monitored in the five fermentations tanks corresponding to the  
353 three experimental conditions: C10 and C8 tanks were inoculated with the tailored complex  
354 starter culture in 10% and 8% salt brine respectively, and compared to T10 and T8 tanks,  
355 corresponding to their spontaneous counterparts, while tank BA was inoculated by  
356 backslopping.

357 In each tank, microbial populations of interest were monitored at five time points during the  
358 fermentation and their evolution is presented in **Table 2**. Fungal and total aerobic counts  
359 reached similar levels by the end of the fermentation in all experimental conditions. Focusing  
360 on fungal populations, after starter culture inoculation and brining on day 1, 1 log CFU/g  
361 higher counts were observed in the inoculated tanks, C10 and C8, compared to the control  
362 tanks, T10 and T8. In the case of the backslopping condition (tank BA), initial fungal  
363 populations were ~1.8 log CFU/g higher than the other conditions as expected given the fact  
364 that high fungal populations were already present in spent brines.

365 The initial pH in brines was near ~ 5.8, although slight variations depending on the condition  
366 were observed. However, the same trend in acidification was observed for all five  
367 fermentations. Within the first week, the pH dropped to 5.5 in all tanks then continued to  
368 slowly decrease until a value of 4.4 was reached (value at last sampling point, day 365) (**Table**  
369 **2**). Based on these results, neither the complex consortium nor the reduced salt content had an  
370 impact on the acidification process.

371 The initial pH drop was concomitant with a 1 log decrease in microbial populations in  
372 all spontaneous fermentations. This change in microbial populations is most likely related to  
373 the plant-associated microorganisms and filamentous fungi disappearance that are not adapted  
374 to the high salt environment. Moreover, filamentous colonies (morphologically identified as  
375 *Aureobasidium pullulans*) were abundantly observed on YGC plates at day 1 while completely  
376 absent from day 8 plates. By day 64, similar fungal population levels at ~5 log CFU/g were  
377 observed for all fermentations. Populations then slightly increased by 0.5 log CFU/g until day  
378 167 and stabilized up to day 365 for the 10% salt T10 and backslopping (BA) conditions,  
379 while they decreased to reach 4.62 CFU/g in C10 conditions. In reduced salt fermentation, C8  
380 and T8 tanks, following day 64 and up to day 365, the same trends were observed. Populations  
381 slightly increased by 0.3-0.5 log CFU between day 64 and 167 then increase to reach 4.8 and  
382 4.5 CFU/g by day 365 in C8 and T8 tanks respectively, that is approximately 1 log lower than  
383 T10 and BA conditions at the same final stage. Interestingly, in 8% salt fermentations, lower  
384 halotolerant fungal populations were observed when compared to total fungal counts.

385 Lactic acid bacteria populations were below the detection limits in all fermentations.  
386 This finding is correlated to our previous results (Penland et al., in press) on Nyons olive  
387 fermentations (carried out 1 year earlier) where LAB were found to play a very minor role,  
388 probably due in part to the high salt content in brines. In the present study, and despite the 8%  
389 reduced-salt conditions, LAB presence and growth was still very low. Similar findings were  
390 also observed by Tassou et al. (2002). They showed that 8% NaCl concentration delayed LAB  
391 appearance during black table olive fermentations (Tassou et al., 2002).

392

393 In addition to the obtained results, it should also be stressed that all fermentations were  
394 analyzed for safety criteria according to European regulation n° 1447/2007 at day 365. Criteria  
395 included enterobacteria, coagulase-positive staphylococci, *E. coli* population counts as well  
396 as food-borne pathogen absence (*Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.). All criteria  
397 were satisfied (data not shown), thus, addition of the tailor-made culture or reduced salt  
398 content (8% brine) do not seem to jeopardize the safety and microbial quality of the final  
399 product.

400

### 401 **3.3. Strain implantation in directed fermentation tanks**

402 M13-RAPD-PCR was previously used for table olive yeast genotyping (Tofalo et al., 2013;  
403 Benítez-Cabello et al., 2016). In this study, we applied this technique to monitor whether the

404 inoculated yeast consortium persisted during fermentation. Two hundred randomly selected  
405 yeast colonies from the C8 and C10 conditions were isolated at days 64 and 167. These time  
406 points were selected as they were previously shown to correspond to major fungal population  
407 shifts during Nyons olive fermentations (Penland et al, in press). In parallel, the genetic  
408 profiles of the eight isolates of the tailored complex starter culture were determined to verify  
409 that distinct banding pattern could be observed between species (**Figure 2**). They were also  
410 systematically used as internal controls for all experiments to ensure good repeatability.  
411 However, it should be noted that this method could not discriminate or only slightly  
412 discriminate between isolates belonging to the same despite their distinctive technological  
413 characteristics (see 3.1). Moreover, the cluster analyses performed systematically grouped all  
414 isolates belonging to a given species into the same genetic cluster. As a consequence, results  
415 are presented for each tank over time as the % of isolates with the same genetic profile as the  
416 inoculated species (**Table 3**). Between days 1 and 64, *P. membranifaciens* was the most  
417 prevalent yeast in both C8 and C10 fermentations, representing 42% and 66%, respectively,  
418 followed by *W. anomalus*. This prevalence of the latter species particularly increased in C8  
419 conditions and represented 28% of isolates by day 64. *C. nyonsensis* was the third most  
420 isolated yeast species. On the other hand, neither *Z. mrakii* nor *C. atlantica* persisted during  
421 fermentation as both species were observed to decrease over time and no genetic profiles of  
422 isolates belonging to this species were identified at day 167. By day 167, *P. membranifaciens*  
423 still dominated and represented over half of all tested isolates in both fermentations.  
424 Interestingly, four new genetic profiles (NP1 to NP4) were also generated in C8 and C10  
425 inoculated fermentations. In particular, NP1 corresponded to an autochthonous yeast isolate  
426 and its prevalence reached about 20% in the C8 tank and 40% in C10 tank. Species level  
427 identification was performed on this strain after sequencing the D1/D2 domain of the 26S  
428 rRNA gene and corresponded to *Candida boidinii* which appeared at the same stages in  
429 previously monitored Nyons olives fermentations.

430

431 Overall, the inoculated strains belonging to the tailored complex consortium persisted and  
432 developed in tanks C8 and C10 during fermentation as observed by M13 monitoring. The only  
433 exception was for *C. atlantica* that was observed at low levels at the beginning of fermentation  
434 and appeared to disappear by day 64. In the C8 and C10 inoculated tanks, coherent behaviors  
435 were observed in comparison to the traditional control fermentations (T8 and T10) as only  
436 minor impacts on pH or microbial populations were observed. Relatively similar trends were  
437 found with the backslapping technique except that higher counts were obtained. Microbial

438 shifts were not significantly impacted by the addition of the tailored complex consortium at  
439 the start of fermentation. For example, *P. membranifaciens* dominance was maintained during  
440 fermentation although only around 6 months in our previous study versus 3 months here. In  
441 the case of *W. anomalus*, its prevalence decreased after day 64 which was conform to what  
442 was previously observed (Penland et al, in press) despite the addition of *W. anomalus*  
443 R2B1D64.Y23 with killer-yeast properties. This result might be linked with salt concentration  
444 as several studies showed that environmental factors such as pH and NaCl percentage could  
445 impact yeast killer activity (Llorente et al., 1997). In peculiar, Hernández et al. (2008)  
446 observed that killer activity of indigenous *W. anomalus* isolates from olive brine increased at  
447 8% compared to 5% but decreased at 10% NaCl. However, no such effect was observed  
448 regarding the reduced salt fermentation included in this study. Salt reduction only seemed to  
449 temporarily favor *C. nyonsensis* growth (observed at day 64), as higher abundances were  
450 observed in inoculated fermentations at 10% salt compared to 8% salt for all inoculated  
451 isolates, including *W. anomalus*, based on M13-PCR monitoring. These results raise  
452 questions about the environmental factors that allow strains to maintain themselves or not  
453 during fermentation. Other criteria should also be investigated such as individual acid and  
454 oleuropein tolerances.

455

#### 456 **3.4.Volatile profiles changes during directed and natural fermentations**

457 The impact on the volatile profiles of the different fermentation conditions monitored in  
458 this study was investigated at three fermentation stages (days 1, 64 and 365). A total of 59  
459 volatile compounds were identified. They mostly consisted of esters (n=21), fatty acids (n=8),  
460 alcohols (n=8), aldehydes (n=8), ketones (n=6), phenols (n=3) and others classes (n=5). PCA  
461 and hierarchical clustering analyses were performed and concurred to the same conclusions.  
462 Differences between volatile profiles were mostly related to fermentation stages rather than  
463 the fermentation conditions (**Figure 3 and 4**). PCA analyses clearly separated samples  
464 according to fermentation stage (axis 1 explained 63.03% of variance). On the other hand, no  
465 distinctions could be made between experimental conditions on any of the first four  
466 dimensions (data not shown). Volatile kinetics were similar regardless of the condition: the  
467 start of the fermentations was correlated with highest abundances of aldehydes that rapidly  
468 and significantly decreased between days 1 and 64. During this fermentation phase, alcohol  
469 abundances increased as well as some esters such as ethyl acetate, ethyl propanoate and ethyl  
470 2-methylpropanoate. However, most esters and phenol compounds significantly increased

471 between days 64 and 365 (**Figure 4**). These dynamics are well correlated to previous findings  
472 in Nyons table olives (Penland et al., in press) and other spontaneous olive fermentations  
473 (Bleve et al., 2014; De Angelis et al., 2015; Randazzo et al., 2017).

474 Differences between the five fermentation conditions were only noticeable at day 365  
475 based on hierarchical clustering results (**Figure 4**). Backslopping fermentation (BA) stood out  
476 as samples were clearly separated from the others. Furthermore, clustering also separated C8  
477 and T8 from C10 and T10 samples, highlighting a stronger impact of the reduced salt  
478 condition versus the addition of a tailored complex starter culture. Nevertheless, differences  
479 in individual compound abundances were compared using ANOVA analyses between the  
480 different fermentation conditions (**Figure 5**). The backslopping method (BA tank) led to  
481 significant higher abundances of seven compounds when compared to the spontaneous  
482 fermentation tank T10, namely 3-methylbutanol, 2-phenylethanol, pentan-3-one, 4-  
483 ethylphenol, ethyl 3-methylbutanoate, ethyl octanoate and styrene ( $P < 0.05$ ). Noteworthy, the  
484 effects of backslopping were higher than those observed with the tailor-made complex culture  
485 as nine compounds were identified at higher abundances (BA tank vs C10 tank). The impacted  
486 volatile compounds were also different from the ones observed in the inoculated fermentation  
487 C10.

488 The use of a tailored complex culture led to different outcomes depending on the salt level.  
489 Inoculation in 10% salt in brines led to significant higher abundances of six compounds  
490 (hexan-1-ol, 4-ethylphenol, 2-methoxyphenol, ethyl benzoate, ethyl octanoate and styrene) and  
491 lower abundances of two compounds (propanoic acid and ethyl propanoate). In 8% inoculated  
492 olives, higher abundances of seven compounds (ethanol, 2-methoxyphenol, ethyl acetate,  
493 ethyl butanoate, ethyl oct-7-enoate, hexyl acetate and styrene) and lower abundances of four  
494 compounds (propanoic acid, pentan-3-one, ethyl 3-methylbut-2-enoate and ethyl propanoate)  
495 were observed when compared to the respective spontaneous control fermentation conditions  
496 ( $P < 0.05$ ). Compounds mostly belonged to esters in both cases although different compounds  
497 were impacted. Noteworthy, inoculation of the starter culture systematically and positively  
498 impacted the abundances of 2-methoxyphenol and styrene, and negatively impacted propanoic  
499 acid and ethyl propanoate. 2-Methoxyphenol (also known as guaiacol) is a marker of black  
500 olive fermentations while styrene is also frequently identified as part of table olive volatiles  
501 (Bleve et al., 2015; de Castro et al., 2018). Styrene production from cinnamic acid or 2-  
502 phenylethanol was demonstrated to be carried out by many yeast species including *Pichia* and  
503 *Candida* spp. The higher abundances in inoculated fermentations is thus not incoherent.  
504 Lower abundances of propanoic acid and its derivative ester, ethyl propanoate, is an

505 interesting outcome. Moreover, propionic acid abundances were also significantly lower in  
506 the 8% spontaneous fermentation (T8 tank) than in the 10% spontaneous fermentation (T10).  
507 On one hand, in table olives, propanoic acid is usually considered as a marker of olive spoilage  
508 and related to “zapateria” defect which has been described to generated off-odors (de Castro  
509 et al., 2018), it is related with growth of *Propionibacterium* species when salt levels and pH  
510 are too high. It was thus unexpected to be associated with the reduced salt assay. Moreover,  
511 no off-odors were detected by the local producer related to this defect. On the other hand,  
512 propanoic acid can also be synthesized from branched amino acid by microorganisms  
513 (Gonzalez-Garcia et al., 2017). Thus, its lower abundance could thus be indicating an impact  
514 of the salt condition on the aminoc acid catabolism occurring during the fermentation.

515 Reduced salt levels from 10 to 8% generated limited significant volatile abundance changes  
516 when compared to the spontaneous fermentation tanks (T8 versus T10). In addition to  
517 propanoic acid and ethyl propanoate abundances, lower abundances of 1,2-dimethoxybenzene  
518 and higher abundances of 4-ethylphenol and ethyl 2-methylpropanoate were observed.  
519 Differences were even more pronounced in the presence of the tailored inoculum. Six  
520 compounds were found in lower abundances at day 365 in 8% brine fermentations compared  
521 to 10% ones (ethyl benzoate, ethyl propanoate, 1,2-dimethoxybenzene and  
522 methylsulfanylmethane).

523 Altogether and regardless of the inoculation method (tailored or backslopping), the directed  
524 fermentations resulted in richer ester abundances. Such outcomes were previously observed  
525 in olive fermentation inoculated with yeasts and/or lactic acid bacteria (Bautista-Gallego et  
526 al., 2011; Bleve et al., 2015; Pino et al., 2018). Esters are known to bring fruity and flowery  
527 aromas and higher abundances could enhance pleasant aromas of Nyons table olives.  
528 However, it has to be pointed out that research focusing on odor thresholds in fermented  
529 beverages showed that specific esters, related with pleasant aromas such as ethyl acetate, could  
530 lead to off-odors if overly abundant (de la Roza et al., 2003). The balance of aroma compounds  
531 therefore needs to be considered and sensory attributes evaluated. In this regard, preliminary  
532 sensory evaluations were carried out by the Nyons olive producer which included a panel of  
533 three experts/tasters. Olives with 8% and 10% salt were appreciated while olives fermented  
534 using the backslopping method were negatively perceived due to a mild but “acetic” flavor  
535 (data not shown). These first findings need to be strengthened by more thorough sensory  
536 analyses in the future.

#### 537 **4. Conclusion**

538 The present study aimed at evaluating the impact of a tailor-made autochthonous complex  
539 yeast starter culture, defined based on the beneficial traits of individual strains, on natural  
540 Nyons table olive fermentations. The tailored complex starter culture consisted of eight  
541 autochthonous yeast strains belonging to the five dominant species, previously identified in  
542 Nyons table olive fermentations, and was compared to both backslopping and spontaneous  
543 fermentation conditions. Key features of the selected strains included high halotolerance, low  
544 pectinolytic and proteolytic activities but no strains presented  $\beta$ -glucosidase activities.

545 The backslopping method used to inoculate the fermentation tank “BA” on day 1  
546 demonstrated the highest impacts on microbial populations and olive volatile profiles. Indeed,  
547 higher ester abundances were observed at the end of fermentation compared to both the  
548 defined complex cultures and spontaneous fermentations used as reference conditions.  
549 However, although no major microbial changes or microbial defect species/markers were  
550 detected, preliminary sensory analyses by the local producer underlined an overall lack in  
551 aromas and a pronounced mild acetic taste. The Nyons olive fermentations with the tailor-  
552 made yeast consortium led to fewer impacts on both microbial and volatile profiles and among  
553 the volatile compounds detected, esters also dominated. However, no major differences were  
554 detected during the preliminary tasting sessions by the local producer. Overall, the reduced  
555 salt fermentation in 8% salt versus the traditional 10% brine gave very promising results. No  
556 deleterious effects on microbial counts, volatile dynamics or safety criteria of the olives were  
557 identified. Olives produced in 8% brines were the most appreciated by the tasting panel.  
558 Inoculation of the defined consortium did, however, enhance the differences between the two  
559 tested salt concentrations and lower propanoic acid abundances were found. If confirmed,  
560 these results are thus promising for future reduced salt fermentations of Nyons table olives  
561 without altering its natural microbial diversity and characteristics. This is also clearly in line  
562 with current consumer demands for traditional, tasty and healthier products.

#### 563 **5. Conflict of Interest**

564 The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or  
565 financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### 566 **6. Funding**



567 This work, which was conducted in the framework of the ProMedFoods project  
568 ‘Promotion of local Mediterranean fermented foods through a better knowledge and  
569 management of microbial resources’, was funded through the ARIMNet2 2016 Call by the  
570 following funding agencies: ANR (France), MERS (Algeria), ELGO-DEMETER (Greece),  
571 MIPAF (Italy), INIA (Spain) and MHESR (Tunisia). ARIMNet2 (ERA-NET) has received  
572 funding from the European Union’s Seventh Framework Programme for research,  
573 technological development and demonstration under grant agreement [618127].

## 574 7. Acknowledgements

575 We would like to thank our producer partner, Vignolis cooperative, for being part of our  
576 project, for welcoming us at their facilities to perform fermentation assays and providing the  
577 samples. We would like to thank Geraldine Pascal and Olivier Rué for their technical support  
578 and advice for the FROGS bioinformatic pipelines. Finally, we are grateful to the INRAE  
579 MIGALE bioinformatics facility (MIGALE, INRAE, 2020. Migale bioinformatics Facility,  
580 doi: 10.15454/1.5572390655343293E12) for providing computing and storage resources.

## 581 8. References

- 582 Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., et al. (2018). The  
583 Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses:  
584 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544. doi:10.1093/nar/gky379.
- 585 Aponte, M., Ventorino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., et al. (2010).  
586 Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical  
587 and sensory analyses. *Food Microbiol.* 27, 162–170. doi:10.1016/j.fm.2009.09.010.
- 588 Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Bautista Gallego, J., Rodríguez Gomez, F., Jimenez  
589 Diaz, R., García García, P., et al. (2012). Potential benefits of the application of yeast  
590 starters in table olive processing. *Front. Microbiol.* 3.  
591 doi:10.3389/fmicb.2012.00161.
- 592 Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-  
593 Díaz, R., García-García, P., et al. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable  
594 or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology* 160, 42–  
595 49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003.
- 596 Bautista Gallego, J., Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Rodríguez Gómez, F., García  
597 García, P., and Garrido Fernández, A. (2011). Chloride salt mixtures affect Gordal  
598 cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology* 28, 1316–1325.  
599 doi:10.1016/j.fm.2011.06.002.

- 600 Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido Fernández,  
601 A., and Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented  
602 table olives with probiotic potential. *Food Research International*.  
603 doi:10.1016/j.foodres.2012.10.004.
- 604 Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A.,  
605 and Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive  
606 industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food*  
607 *Microbiology* 147, 89–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013.
- 608 Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., and Santos, A. (2017). The Biology of *Pichia*  
609 *membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins* 9, 112. doi:10.3390/toxins9040112.
- 610 Benítez-Cabello, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., Rantsiou, K., Cocolin, L.,  
611 Jiménez-Díaz, R., et al. (2016). RT-PCR–DGGE Analysis to Elucidate the Dominant  
612 Bacterial Species of Industrial Spanish-Style Green Table Olive Fermentations.  
613 *Front Microbiol* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01291.
- 614 Bevilacqua, A., Corbo, M. R., and Sinigaglia, M. (2012). Selection of Yeasts as Starter  
615 Cultures for Table Olives: A Step-by-Step Procedure. *Front Microbiol* 3.  
616 doi:10.3389/fmicb.2012.00194.
- 617 Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A., Mita, G., et al. (2015).  
618 Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea  
619 and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of  
620 fermentation starters. *Food Microbiology* 46, 368–382.  
621 doi:10.1016/j.fm.2014.08.021.
- 622 Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F. A., Grieco, F., et al.  
623 (2014). Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous  
624 fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives. *Front Microbiol* 5, 570.  
625 doi:10.3389/fmicb.2014.00570.
- 626 Bonatsou, S., Benítez Cabello, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E., and Arroyo-López, F.  
627 (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in  
628 natural black table olive processing. *Food Microbiology* 46, 66–73.  
629 doi:10.1016/j.fm.2014.07.011.
- 630 Campus, M., Sedda, P., Cauli, E., Piras, F., Comunian, R., Paba, A., et al. (2015). Evaluation  
631 of a single strain starter culture, a selected inoculum enrichment, and natural  
632 microflora in the processing of Tonda di Cagliari natural table olives: Impact on  
633 chemical, microbiological, sensory and texture quality. *LWT - Food Science and*  
634 *Technology* 64, 671–677. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.019.
- 635 Ciafardini, G., and Zullo, B. A. (2019). Use of selected yeast starter cultures in industrial-  
636 scale processing of brined Taggiasca black table olives. *Food Microbiology* 84,  
637 103250. doi:10.1016/j.fm.2019.103250.
- 638 Ciafardini, G., Zullo, B. A., and Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra  
639 virgin olive oil. *Food Microbiology* 23, 60–67. doi:10.1016/j.fm.2005.01.009.

- 640 Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2012). Application of  
641 starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies.  
642 *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00248.
- 643 Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006). Yeast ecology in  
644 French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food*  
645 *Microbiology* 108, 130–135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016.
- 646 De Angelis, M., Campanella, D., Cosmai, L., Summo, C., Rizzello, C. G., and Caponio, F.  
647 (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type  
648 fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology* 52, 18–30.  
649 doi:10.1016/j.fm.2015.06.002.
- 650 de Castro, A., Sánchez, A. H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., Medina, E., and  
651 Montaña, A. (2018). Microbiota and Metabolite Profiling of Spoiled Spanish-Style  
652 Green Table Olives. *Metabolites* 8. doi:10.3390/metabo8040073.
- 653 de la Roza, C., Laca, A., García, L. A., and Díaz, M. (2003). Ethanol and ethyl acetate  
654 production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process*  
655 *Biochemistry* 38, 1451–1456. doi:10.1016/S0032-9592(03)00026-8.
- 656 Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018).  
657 FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294.  
658 doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
- 659 Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., and Cosentino, S. (2004). Occurrence  
660 and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese.  
661 *International Journal of Food Microbiology* 95, 51–59.  
662 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001.
- 663 Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M., and Asehraou, A. (2011).  
664 Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from  
665 fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites* 62. doi:10.3989/gya.055510.
- 666 Golomb, B. L., Morales, V., Jung, A., Yau, B., Boundy-Mills, K. L., and Marco, M. L.  
667 (2013). Effects of pectinolytic yeast on the microbial composition and spoilage of  
668 olive fermentations. *Food Microbiol.* 33, 97–106. doi:10.1016/j.fm.2012.09.004.
- 669 Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., and  
670 Marcellin, E. (2017). Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation* 3, 21.  
671 doi:10.3390/fermentation3020021.
- 672 Guinebretiere, M.-H., and Nguyen-The, C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination  
673 in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based  
674 methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 207–215. doi:10.1111/j.1574-  
675 6941.2003.tb01060.x.
- 676 Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., et al. (2020).  
677 Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy  
678 juice fermentation. *Food Microbiology* 89, 103410. doi:10.1016/j.fm.2019.103410.

- 679 Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for  
680 their use as starters. *Front Microbiol* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00143.
- 681 Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., and Córdoba, M. G. (2007).  
682 Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned  
683 green table olives. *Food Microbiology* 24, 346–351. doi:10.1016/j.fm.2006.07.022.
- 684 Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M., Benito, M., Aranda, E., and Pérez-Nevado, F.  
685 (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of  
686 seasoned green table olives. *International journal of food microbiology* 121, 178–88.  
687 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044.
- 688 Huang, C.-W., Walker, M. E., Fedrizzi, B., Gardner, R. C., and Jiranek, V. (2017).  
689 Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context.  
690 *FEMS Yeast Res* 17. doi:10.1093/femsyr/fox058.
- 691 Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from  
692 fermented table olives. *Food Microbiology* 31, 1–8. doi:10.1016/j.fm.2012.01.006.
- 693 Johnson, R. L., and Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in  
694 Table Olives. *Journal of Food Quality* 2018, e3193185.  
695 doi:https://doi.org/10.1155/2018/3193185.
- 696 Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013).  
697 Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-  
698 generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1.  
699 doi:10.1093/nar/gks808.
- 700 Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous  
701 yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial  
702 sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371. doi:10.1023/A:1001761008817.
- 703 Lanza, B. (2013). Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and  
704 sensory evaluation. *Front. Microbiol.* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00091.
- 705 Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Package for Multivariate  
706 Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. doi:10.18637/jss.v025.i01.
- 707 Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M., and Spencer-Martins, I. (1997).  
708 Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl Environ*  
709 *Microbiol* 63, 1165–1167.
- 710 Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., et al. (2019). Yeast  
711 killer toxins: from ecological significance to application. *Critical Reviews in*  
712 *Biotechnology* 39, 603–617. doi:10.1080/07388551.2019.1601679.
- 713 Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., and Spencer-Martins,  
714 I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied*  
715 *Microbiology* 14, 279–283. doi:10.1111/j.1472-765X.1992.tb00705.x.
- 716 Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *Int Microbiol*  
717 5, 65–71. doi:10.1007/s10123-002-0066-z.

- 718 Panagou, E. Z., and Tassou, C. C. (2006). Changes in volatile compounds and related  
719 biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives.  
720 *Food Microbiology* 23, 738–746. doi:10.1016/j.fm.2006.02.005.
- 721 Peres, C. M., Peres, C., and Xavier Malcata, F. (2017). “Chapter 22 - Role of Natural  
722 Fermented Olives in Health and Disease,” in *Fermented Foods in Health and*  
723 *Disease Prevention*, eds. J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, and E. Peñas (Boston:  
724 Academic Press), 517–542. doi:10.1016/B978-0-12-802309-9.00022-4.
- 725 Pino, A., De Angelis, M., Todaro, A., Van Hoorde, K., Randazzo, C. L., and Caggia, C.  
726 (2018). Fermentation of Nocellara Etnea Table Olives by Functional Starter Cultures  
727 at Different Low Salt Concentrations. *Front. Microbiol.* 9.  
728 doi:10.3389/fmicb.2018.01125.
- 729 Psani, M., and Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their  
730 potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J*  
731 *Microbiol Biotechnol* 22, 1329–1336. doi:10.1007/s11274-006-9180-y.
- 732 Ramírez, E., Brenes, M., García, P., Medina, E., and Romero, C. (2016). Oleuropein  
733 hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food*  
734 *Chemistry* 206, 204–209. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.061.
- 735 Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., and Caggia, C. (2017).  
736 Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of  
737 Nocellara Etnea table olives. *Food Microbiol.* 65, 136–148.  
738 doi:10.1016/j.fm.2017.01.022.
- 739 Romeo, F. V. (2012). Microbiological Aspects of Table Olives. *Olive Germplasm - The*  
740 *Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. doi:10.5772/51479.
- 741 Smith, C. A., Want, E. J., O’Maille, G., Abagyan, R., and Siuzdak, G. (2006). XCMS:  
742 processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak  
743 alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787.  
744 doi:10.1021/ac051437y.
- 745 Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and  
746 physicochemical changes of naturally black olives fermented at different  
747 temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605–615.  
748 doi:10.1006/fmic.2002.0480.
- 749 Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., and Corsetti, A. (2013). Yeast biota  
750 associated to naturally fermented table olives from different Italian cultivars.  
751 *International Journal of Food Microbiology* 161, 203–208.  
752 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.011.
- 753 Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for  
754 the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in  
755 Environmental Samples. *PLOS ONE* 7, e40863. doi:10.1371/journal.pone.0040863.
- 756 Vaughn, R. H., Stevenson, K. E., Davé, B. A., and Park, H. C. (1972). Fermenting Yeasts  
757 Associated with Softening and Gas-Pocket Formation in Olives. *Appl Microbiol* 23,  
758 316–320.

- 759 Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed. Springer  
760 International Publishing doi:10.1007/978-3-319-24277-4.
- 761 WOODS, D. R., and BEVAN, E. A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor  
762 Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 51, 115–126.  
763 doi:10.1099/00221287-51-1-115.
- 764 Zinno, P., Guantario, B., Perozzi, G., Pastore, G., and Devirgiliis, C. (2017). Impact of NaCl  
765 reduction on lactic acid bacteria during fermentation of Nocellara del Belice table  
766 olives. *Food Microbiol.* 63, 239–247. doi:10.1016/j.fm.2016.12.001.

Table 1. Technological property screening of autochthonous isolates from Nyons black table olives

Species	Isolate <sup>a</sup>	Desirable properties								Undesirable properties				
		β -glucosidase	Killer activity	Salt tolerance (%)						Lipolysis	Proteolysis	Pectinolysis <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> S production	CO <sub>2</sub> production
				0	2	4	6	8	10					
<i>Wickerhaomyces anomalus</i>	R1C2D64.Y22	-	-	+++	++	++	++	++	+++	-	-	++	-	-
	R1C3D183.Y31	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	<b>R2B1D64.Y23</b>	-	+	+++	+	+	+	++	++	-	-	++	-	-
	R2B2D64.Y24	-	+	+++	+	+	+	+	+++	-	-	+++	-	-
	R2C2D64.Y21	-	+	+++	+	+	+	++	+++	-	-	+++	-	-
	R1C3D183.Y32	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+	-	+
	R2B1D64.Y21	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	+	+	++
	R2C2D64.Y22	-	-	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	+	-	++
	R1C2D183.Y54	-	-	+	++	+++	+	+	+	-	-	+	-	+
	R1B1D183.Y30	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	R2B2D64.Y28	-	-	++	++	+++	++	++	++	-	-	+	++	-
	<b>R1C1D183.Y30</b>	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	++	-	-
	R1C2D183.Y42	-	-	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	+	-	-
	R2B2D183.Y41	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+	-	-
	R2C1D183.Y43	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	-
	R1C1D183.Y32	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	<b>R2C1D183.Y57</b>	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	R2C2D64.Y26	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+	+
	R1B2D64.Y12	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+	-
	R2B1D64.Y39	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
<i>Citeromyces nyonsensis</i>	R2B1D183.Y60	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	R1B1D64.Y15	-	-	+++	++	++	++	++	+++	-	-	+	-	-
	R1C1D64.Y18	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
	R1C1D183.Y34	-	-	+++	+++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
	R2B2D64.Y34	-	-	+++	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
	R2C1D64.Y22	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	R2B3D183.Y50	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
	R2C3D183.Y59	-	-	++	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
	R2C2D183.Y59	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	R1C1D64.Y17	-	-	++	++	+++	+++	++	++	-	-	+	-	-
<i>Citeromyces nyonsensis</i>	R1C3D183.Y40	-	-	++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	+	-	-
	R2B3D64.Y32	-	-	++	++	++	++	+++	+++	-	-	+	-	-
	<b>R2B1D183.Y47</b>	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	<b>R2C3D64.Y26</b>	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
	R1B1D64.Y12	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+	-	-
	R1B2D183.Y28	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	++	-	-
	<b>R1B2D64.Y23</b>	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-

<sup>a</sup> isolates in bold were selected to form the complex culture.

<sup>b</sup> pectinolysis halo "+" halo <0.4 ; "++" halo 0.5 - 0.7 cm ; "+++" halo > 0.7cm

<sup>c</sup> positive (+++ or ++ except for killer activity +)

<sup>d</sup> weak (+)

<sup>e</sup> negative (-)

**Table 1 (continued)**

Species	Isolate <sup>a</sup>	Desirable properties								Undesirable properties				
		β -glucosidase	Killer activity	Salt tolerance (%)					Lipolysis	Proteolysis	Pectinolysis <sup>b</sup>	H <sub>2</sub> S production	CO <sub>2</sub> production	
				0	2	4	6	8						10
<i>Candida boidinii</i>	R2B3D183.Y55	-	-	++	++	+++	++	+	-	-	+	+	+++	-
	R1C2D183.Y41	-	-	++	++	+++	++	+	-	-	-	+	++	+
	R1B1D64.Y8	-	-	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	++	++	-
	R1B3D183.Y24	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	-	-
	R1B2D64.Y24	-	-	+++	++	++	++	++	++	-	-	+	-	-
<i>Candida atlantica</i>	<b>R2C1D64.Y30</b>	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	-
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>	R2C2D64.Y38	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	+	-	-
	<b>R2B3D64.Y38</b>	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	+	-	-
	R2C3D64.Y38	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	+	-	-
	R1B2D183.Y40	-	+	+	++	+++	++	+	+	-	-	+	-	-
	R1C1D64.Y21	-	-	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	+	-	-
	<b>Positive (%)<sup>c</sup></b>	0	0	91.7	91.7	91.7	89.6	85.4	79.2	0	0	20.8	8.3	4.2
	<b>Weak (%)<sup>d</sup></b>	0	0	8.3	6.3	8.3	10.4	14.6	12.5	2.1	4.2	75.0	4.2	8.3
	<b>Negative (%)<sup>e</sup></b>	100.0	89.6	0	2.1	0	0	0	8.3	97.9	95.8	4.2	87.5	87.5

a isolates in bold were selected to form the complex culture

b pectinolysis halo "+" halo <0.4 cm ; "++" halo 0.5 - 0.7 cm ; "+++ " halo > 0.7cm

c positive (+++ or ++ except for killer activity +)

d weak (+)

e negative (-)



**Table 2. Microbial populations monitoring and pH evolution during inoculated and spontaneous fermentations of Nyons table olives**

<b>Fermentation condition</b>	<b>C10</b>	<b>T10</b>	<b>Ba</b>	<b>C8</b>	<b>T8</b>
<b>Brine (% NaCl)</b>	10	10	10	8	8
<b>Inoculation</b>	tailored culture	-	5% brine previous fermentation	tailored culture	-
<b>Day 1</b>					
pH	5.70	5.95	5.54	5.89	5.83
Aerobic microorganisms	4.35	3.79	4.21	5.24	4.32
Halotolerant aerobic microorganisms	4.85	4.49	5.04	5.07	4.29
Fungi	5.26	4.18	6.05	5.22	3.95
Halotolerant fungi	4.67	4.09	5.79	4.93	3.72
LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Halotolerant LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
<b>Day 8</b>					
pH	5.37	5.33	5.10	5.51	5.20
Aerobic microorganisms	4.67	2.90	3.34	4.37	2.90
Halotolerant aerobic microorganisms	4.84	3.08	4.10	4.66	3.15
Fungi	4.93	3.83	3.45	5.02	3.08
Halotolerant fungi	4.79	2.90	3.26	4.76	2.60
LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Halotolerant LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
<b>Day 64</b>					
pH	4.42	4.41	4.50	4.39	4.38
Aerobic microorganisms	4.17	5.25	5.09	3.75	4.25
Halotolerant aerobic microorganisms	5.00	5.04	5.20	5.12	4.94
Fungi	5.17	5.49	5.41	5.00	4.90
Halotolerant fungi	5.13	5.26	5.45	4.92	4.77
LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Halotolerant LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
<b>Day 167</b>					
pH	4.46	4.47	4.52	4.44	4.47
Aerobic microorganisms	4.51	5.31	5.09	4.57	4.67
Halotolerant aerobic microorganisms	4.44	4.81	5.01	3.95	4.66
Fungi	5.53	6.00	5.76	5.27	5.43
Halotolerant fungi	5.12	5.65	5.07	4.59	5.17
LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Halotolerant LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
<b>Day 365</b>					
pH	4.39	4.51	4.55	4.45	4.50
Aerobic microorganisms	4.11	5.03	5.63	4.32	4.61
Halotolerant aerobic microorganisms	4.09	5.11	5.43	4.23	3.99
Fungi	4.62	5.81	6.03	4.81	4.56
Halotolerant fungi	4.62	5.70	5.77	4.90	4.51
LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Halotolerant LAB	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL

< DL - population below medium detection level (< 200 CFU/g)

LAB - lactic acid bacteria

**Table 3. Strain implantation in C8 and C10 inoculated tanks based on M13-PCR fingerprints of yeast isolates**

Species	Control strain code	Tank (% of isolates)					
		C10			C8		
		day 1	day 64	day 167	day 1	day 64	day 167
<i>Citeromyces nyonsensis</i>	R1B2D64.Y23 (1) ; R2C3D64.Y26 (2) ; R2B1D183.Y47(3)	37.5	10	24	37.5	28	8
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	R2B1D64.Y23	12.5	18	-	12.5	-	-
<i>Zygorulasporea mrakii</i>	R2B3D64.Y38	12.5	6	-	12.5	2	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	R1C1D183.Y30 ; R2C1D183.Y57	25	66	36	25	66	36
<i>Candida atlantica</i>	R2C1D64.Y30	12.5	-	-	12.5	-	-
NP1		-	-	40	-	-	20
NP2		-	-	-	-	-	4
NP3		-	-	-	-	-	2
NP4		-	-	-	-	-	2

NP : new profile

**Table 4. Volatile compounds identified by HS-GC-MS during the inoculated and spontaneous fermentations of Nyons table olives.**

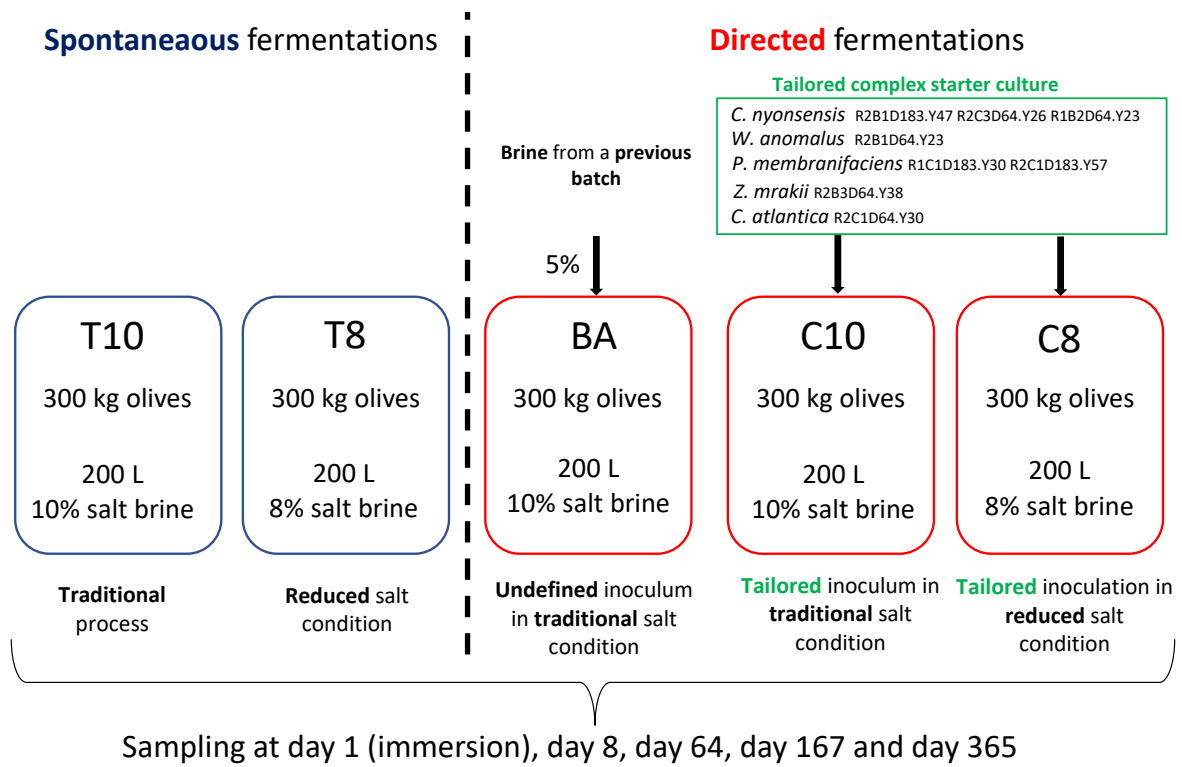
Family	Compound	Pubchem CID	EIC (m/z)	LRI <sup>a</sup>	Identification <sup>b</sup>	Odor descriptor <sup>c</sup>	
<b>Alcohols</b>	Ethanol	702	45	903	DB, LRI, S	Alcoholic	
	Propan-1-ol	1031	59	1029	DB, LRI, S	Alcoholic	
	2-Methylpropan-1-ol	6560	74	1097	DB, LRI	Winey	
	3-Methylbutanol	31260	70	1208	DB, LRI	Fermented, fruity, pungent	
	Hexan-1-ol	8103	56	1363	DB, LRI	Green, fruity, pear	
	(E)-hex-2-en-1-ol	5318042	82	1409	DB, LRI	Fruity, green	
	Phenylmethanol	244	108	-	DB	Floral, rose, phenolic	
<b>Aldehydes</b>	2-Phenylethanol	6054	91	-	DB	Floral, sweet, rosey	
	2-Methylpropanal	6561	72	799	DB, LRI, S	Cooked-caramel	
	3-Methylbutanal	11552	57	871	DB, LRI, S	Malty	
	Hexanal	6184	56	1064	DB, LRI, S	Fatty, green, leafy	
	2-Heptanone	8051	74	1167	DB, LRI	Fruity, green banana	
	Octanal	454	84	1278	DB, LRI	Fatty, green	
	Nonanal	31289	98	1382	DB, LRI	Fatty, waxy	
	Benzaldehyde	240	106	1507	DB, LRI, S	Almond	
	2-Phenylacetaldehyde	998	91	1630	DB, LRI, S	Honey, floral rose	
	4-Propylbenzaldehyde	120047	148	-	DB	-	
	<b>Esters</b>	Methyl acetate	6584	74	812	DB, LRI	-
		Ethyl acetate	8857	61	834	DB, LRI	-
Ethyl propanoate		7749	102	926	DB, LRI	Fruity, winey	
Ethyl 2-methylpropanoate		956	116	943	DB, LRI	Etherial, fruity	
Ethyl butanoate		7762	71	972	DB, LRI, S	Sweet, fruity	
Ethyl 2-methylbutanoate		24020	57	1039	DB, LRI	Sweet, fruity	
Ethyl 3-methylbutanoate		7945	115	1045	DB, LRI	Sweet, fruity	
2-Methylpropyl 2-methylpropanoate		7351	101	1079	DB, LRI	Fruity, banana	
Methyl 3-methylbuten-2-oate		13546	83	1104	DB, LRI, S	-	
Ethyl 3-methylbut-2-enoate		3014021	128	1216	DB, LRI	-	
Ethyl hexanoate		31265	88	1227	DB, LRI, S	Sweet, fruity	
Hexyl acetate		8908	84	1266	DB, LRI	Fresh, sweet, floral, green	
Ethyl 2-hydroxypropanoate		92831	75	1336	DB, LRI	Fruity	
Ethyl octanoate		7799	101	1425	DB, LRI	Fruity, winey	
Ethyl oct-7-enoate		544127	101	1476	DB, LRI	-	
Ethyl nonanoate		31251	101	1525	DB, LRI	Fruity, rose, rum, wine	
Ethyl benzoate		7165	150	1653	DB, LRI	Mild, fruity, cooked	
Ethyl 2-phenylacetate		7590	91	1776	DB, LRI	Sweet, floral honey	
Methyl 3-phenylpropanoate		7643	104	-	DB	Honey, fruity, wine	
Ethyl 3-phenylpropanoate		16237	91	-	DB	Phenolic, woody	
Ethyl 3-phenylprop-2-enoate	7649	131	-	DB	Fruity, balsamic		
<b>Fatty acids</b>	Acetic acid	176	60	1433	DB, LRI, S	Pungent, overripe fruit	
	Propanoic acid	1032	74	1532	DB, LRI, S	Acidic, dairy, fruity	
	4-Hydroxybutanoic acid	10413	42	1612	DB, LRI	-	
	Butanoic acid	264	73	1621	DB, LRI, S	Acidic, buttery	
	2-Methylbutanoic acid	20653	74	1663	DB, LRI, S	Acidic, buttery	
	Hexanoic acid	8892	73	-	DB, LRI, S	Fruity, fatty sour	
	Octanoic acid	379	101	-	DB, LRI, S	Oily, rancid, capric	
	Nonanoic acid	8158	73	-	DB	Fatty	
	<b>Ketones</b>	Pentan-3-one	7288	86	952	DB, LRI	Ethereal
		Butane-2,3-dione	650	86	963	DB, LRI	Buttery
3-Hydroxybutan-2-one		179	88	1273	DB, LRI, S	Sour milk	
1-Hydroxypropan-2-one		8299	74	1288	DB, LRI	Sweet, caramellic	
6-Propyloxan-2-one		12777	99	-	DB	Coconut	
<b>Phenols</b>		1,2-Dimethoxybenzene	7043	138	1719	DB, LRI	Spicy, vanilla
	2-Methoxyphenol	460	109	-	DB	Phenolic, woody	
	Phenol	996	94	-	DB	Phenolic	
	4-Ethylphenol	31242	107	-	DB	Phenolic, smoky	
<b>Others</b>	Methylsulfanylmethane	1068	62	733	DB, LRI	Sulfury	
	Styrene	356	78	1244	DB, LRI	Sweet, balsam, floral	
	Methylsulfanylmethane	679	63	1551	DB, LRI	Fatty, oily, salty	
	$\alpha$ -Farnesene	5281516	93	1740	DB, LRI	Woody, green	

**a** LRI = Linear Retention index - calculated based of retention time of n-alkane mixture injected in the column

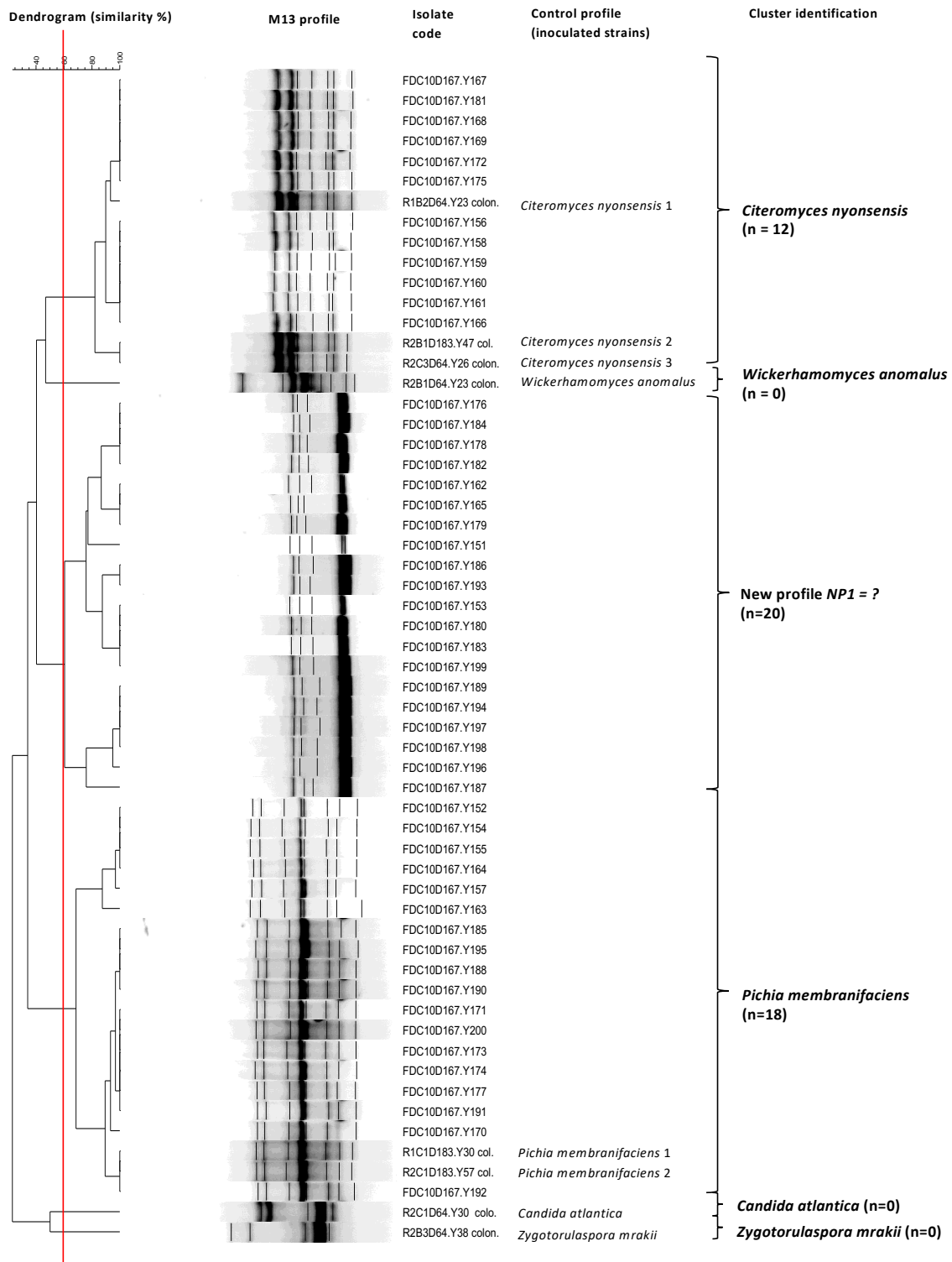
**b** Identification performed based the following criteria: RI—comparison of LRI calculated with data published in the literature and in intern;

DB—comparison of mass spectral data with those of NIST 2008 library ; and S—comparison of LRI with those of authentic standards injected in the same GC-MS system

**c** odor descriptor associated with the compounds on The goodscentscopy database database (<http://www.thegoodscentscopy.com>)

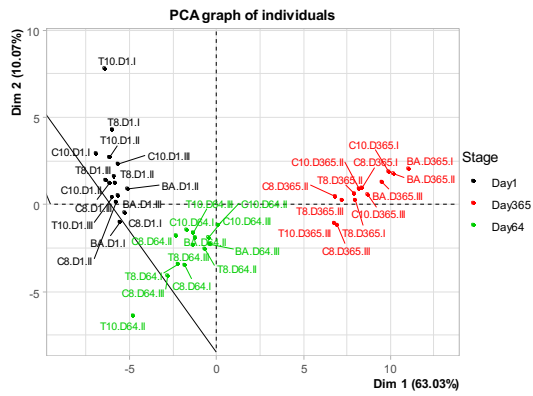


**Figure 1. Inoculation strategies for Nyons table olive fermentations implemented in this study**

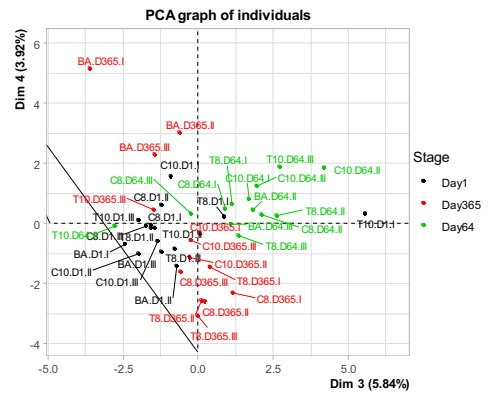


**Figure 2. Examples of yeast isolate M13 fingerprints from C10 tank after 167 days of fermentation.** “\*” symbol indicates reference strains of the tailored complex starter culture used as an internal quality control. Red line indicates the threshold used for clustering.

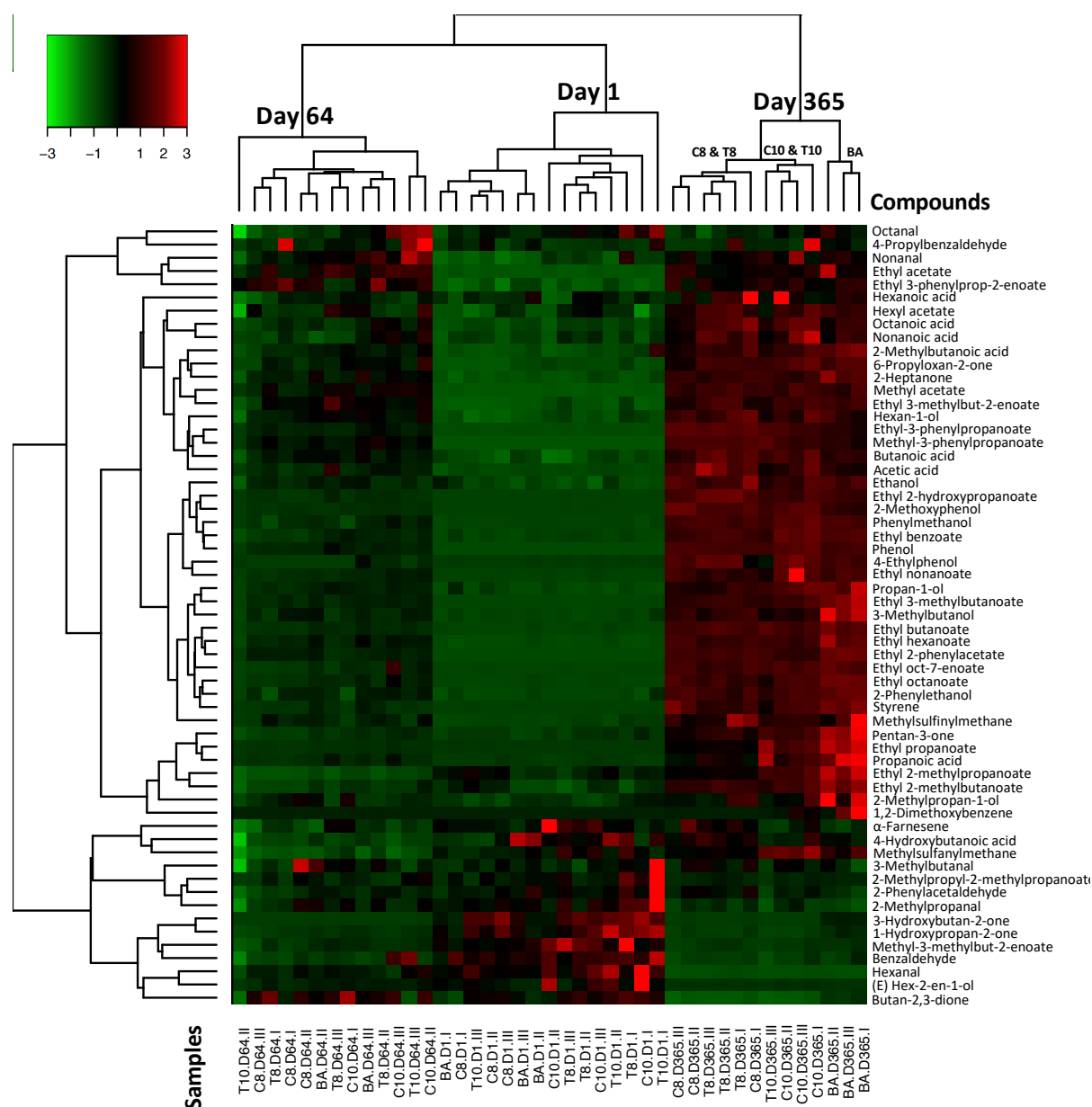
A



B



**Figure 3. Principal Component Analysis of volatile compounds identified by headspace-GC-MS at day 1, 167 and 365 of control and spontaneous fermentations**



**Figure 4. Normalized heat-map of volatile abundances changes during inoculated and spontaneous (control) Nyons olives fermentations.** Hierarchical clustering was performed using Ward's linkage method and Euclidian distance. Samples are displayed at the bottom while volatile compounds are displayed on the right part of the map. Color green to red shows low to high normalized abundances.

Compounds	Kinetics	C10 vs T10			C8 vs T8			Ba vs T10			T8 vs T10			Ba vs C10			C8 vs C10		
		Day 1	Day 64	Day 365	Day 1	Day 64	Day 365	Day 1	Day 64	Day 365	Day 1	Day 64	Day 365	Day 1	Day 64	Day 365	Day 1	Day 64	Day 365
<b>Aldehydes</b>																			
Benzaldehyde	=																		
Hexanal	↘																		■
3-Methylbutanal	↘																		
2-Methylpropanal	=																		
Nonanal	=																		
2-Phenylacetaldehyde	=																		
4-Propylbenzaldehyde	=																		
Octanal	=																		■
<b>Alcohols</b>																			
Ethanol	↗																		
Hexan-1-ol	↗			■															
(E)-hex-2-en-1-ol	↘																		■
2-Methylpropan-1-ol	=																		
3-Methylbutanol	↗					■				■									
Phenylmethanol	↗																		
2-Phenylethanol	↗																		
Propan-1-ol	↗																		■
<b>Fatty acids</b>																			
Acetic acid	↗																		
Butanoic acid	↗																		
4-Hydroxybutanoic acid	=						■												
Hexanoic acid	=																		
2-Methylbutanoic acid	↗																		■
Nonanoic acid	↗																		
Octanoic acid	↗																		
Propanoic acid	↗			■			■					■					■		■
<b>Ketones</b>																			
Butane-2,3-dione	↘			■								■							
2-Heptanone	↗											■							
3-Hydroxybutan-2-one	↘																		
1-Hydroxypropan-2-one	↘																		
Pentan-3-one	↗																		■
6-Propyloxan-2-one	↗			■															■
<b>Phenols</b>																			
4-Ethylphenol	↗			■								■							
2-Methoxyphenol	↗			■															■
Phenol	↗																		
<b>Esters</b>																			
Ethyl acetate	↗																		■
Ethyl butanoate	↗																		
Ethyl benzoate	↗			■		■													■
Ethyl hexanoate	↗																		
Ethyl 2-hydroxypropanoate	↗																		
Ethyl 2-methylbutanoate	↗																		■
Ethyl 2-methylpropanoate	↗																		■
Ethyl 3-methylbut-2-enoate	↗																		■
Ethyl 3-methylbutanoate	↗																		■
Ethyl nonanoate	↗																		■
Ethyl oct-7-enoate	↗																		■
Ethyl octanoate	↗			■															■
Ethyl 2-phenylacetate	↗																		■
Ethyl 3-phenylprop-2-enoate	=																		
Ethyl 3-phenylpropanoate	↗																		
Ethyl propanoate	↗			■															■
Hexyl acetate	=																		
Methyl acetate	↗																		■
Methyl 3-methylbuten-2-oate	↘																		
Methyl 3-phenylpropanoate	↗																		
2-Methylpropyl 2-methylpropanoate	=																		
<b>Others</b>																			
1,2-Dimethoxybenzene	=																		■
α-Farnesene	=																		
Methylsulfanyl methane	↗																		■
Methylsulfinyl methane	↗																		
Styrene	↗			■															
<b>Higher abundance</b>		0	2	6	0	1	7	0	7	7	0	1	2	0	1	9	0	0	1
<b>Lower abundance</b>		0	1	2	4	2	4	0	0	0	1	0	2	0	0	1	3	8	6

= no significant change ↗ increasing abundance day 1 to 365 ↘ increasing abundance day 1 to 64  
↘ decreasing abundance day 1 to 64 ↗ increasing abundance day 64 to 365

Figure 5.

Volatile compound abundance paired-wise differences between the five different fermentation conditions tested based on ANOVA results.

Only significant differences are shown (P<0.05). Kinetics column indicates individual compound evolution throughout fermentation based on spontaneous 10% brine fermentation (corresponding to traditional reference fermentation condition). Green color indicates higher abundances while red color indicates lower abundances.





---

# **DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES**

---



Les produits fermentés artisanaux sont des aliments particulièrement appréciés des consommateurs pour leurs caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et leurs bénéfiques sur la santé mais également parce qu'ils représentent un héritage culturel, souvent en lien avec un terroir et un savoir-faire ancestral. Ils sont aussi particulièrement intéressants d'un point de vue microbiologique. En effet, leurs caractéristiques organoleptiques sont étroitement liées à l'action des micro-organismes.

Dans ce contexte, ce travail a consisté en l'étude de la diversité microbienne de deux produits méditerranéens artisanaux, préparés par fermentation naturelle, par des producteurs locaux. La stratégie de recherche mise en place a consisté à étudier les déterminants de la diversité microbienne en lien avec les caractéristiques de l'aliment final : les dynamiques microbiennes au cours de la fermentation, la contribution des espèces présentes aux caractéristiques biochimiques de l'aliment fermenté et l'origine des micro-organismes impliqués dans le processus.

Cette partie propose, tout d'abord, une discussion et des perspectives de travaux autour de ces trois grands axes d'étude. Une seconde partie revient sur la question de l'exploitation des micro-organismes autochtones et leur préservation en lien avec l'étude présentée dans le **chapitre III**.

### ■ **Approches culture-dépendante et culture-indépendante : redondance ou complémentarité ?**

La diversité microbienne et son évolution au cours de la fermentation a reposé sur une double approche :

- une approche culture-dépendante combinant une déréplication des isolats par une méthode phénotypique (spectroscopie IRTF, MALDI-TOF) et identification par séquençage de régions d'intérêt taxonomique ;
- une approche culture-indépendante par analyse métagénomique.

Les dynamiques des communautés microbiennes mises en évidence ainsi que leur structure au sein des écosystèmes olives des Nyons/saumure et Pélardon ont fait l'objet d'une discussion détaillée en **article 1** et **2** et ne seront pas discutées à nouveau ici. En revanche, il est intéressant de revenir sur les divergences relevées entre les méthodes pour chacun des produits, et les questions soulevées.

Dans le cas des olives de Nyons, une bonne correspondance a été observée entre les approches culture-dépendante et -indépendante concernant les communautés fongiques. En revanche, au niveau bactérien, une bactérie phylogénétiquement proche de *Celerinatantimonas diazotrophica*, dominait le microbiote bactérien à partir de la troisième semaine de fermentation et n'a pas été détectée par approche culturale. Ceci peut s'expliquer par le choix des milieux pour l'isolement de micro-organismes et les conditions d'incubation associées. Comme évoqué au cours de la discussion de l'**article 2**, cette bactérie retrouvée dans les milieux salés possède un métabolisme particulier et exigeant (Cramer et al., 2011). La concentration en sel des milieux de culture mais aussi leur composition n'étaient pas adaptées pour assurer le caractère sélectif du milieu vis-à-vis de ce micro-organisme et plus largement, vis-à-vis de populations bactériennes halotolérantes. Outre le fait que *C. diazotrophica* dominait la communauté bactérienne au cours de la fermentation, il serait particulièrement intéressant d'isoler cette bactérie dans la mesure où elle serait fort probablement impliquée dans la production de certains acides et notamment l'acide lactique. Par ailleurs, l'analyse de phylogénie menée à partir des séquences partielles du gène codant l'ARNr 16S a montré que ces séquences étaient regroupées dans un clade distinct des autres espèces de ce genre avec une valeur de *bootstrap* élevée ; indiquant une espèce ou sous-espèce potentiellement nouvelle (**annexe 2 au chapitre II**). Enfin, des bactéries du genre *Celerinatantimonas* ont été plusieurs fois détectées par analyse métagénétique dans des saumures issues de fermentation d'olives mais, ni leur rôle fonctionnel, ni leur potentiel métabolique n'ont été étudiés à ce jour (Medina et al., 2016; Rodríguez-Gómez et al., 2017; Benítez-Cabello et al., 2020; Kazou et al., 2020). Sachant leur présence dans différentes productions d'olives fermentées, il est raisonnable de penser que celle-ci n'est pas fortuite et qu'un isolement de ces bactéries serait donc d'intérêt pour étudier leur rôle fonctionnel. A l'issue du travail de validation des analyses métagénétiques (**Chapitre II - annexe 1**), la présence de *C. diazotrophica* avait été mise en évidence et du fait du caractère diazotrophe des espèces appartenant à ce genre, une tentative de l'isoler avait été menée sans succès en utilisant des milieux solides dépourvus d'une source d'azote minérale ou organique décrits dans la littérature (Bagwell et al., 1998). D'autres alternatives sont possibles. Citons par exemple l'utilisation des milieux dits « semi-solides » développés pour l'isolement des bactéries diazotrophes du sol (Baldani et al., 2014) qui pourraient être plus adaptés aux bactéries halophiles comme précédemment réalisé par Bentzon-Tilia et al. (2014). Compte-tenu de sa dominance dans la saumure, il pourrait s'avérer judicieux de procéder à un

enrichissement en milieu liquide sous azote gazeux afin d'appliquer un filtre sélectif fort ou l'application d'une méthode de dilution extinction.

Cet exemple illustre l'intérêt d'appliquer la métagénomique en amont de l'analyse culture-dépendante afin de définir au mieux les conditions de culture et les choix des milieux pour cibler les populations d'intérêt ou susceptibles d'être dominantes. Toutefois, cette conclusion ne s'est pas vérifiée lors de l'étude de la diversité microbienne du Pélardon.

L'analyse des communautés microbiennes du Pélardon a mis en évidence de fortes divergences entre les deux approches (**article 1 – résultats**). L'analyse métagénomique a montré que *Lactococcus lactis* dominait l'écosystème tout au long du process et notamment pendant l'affinage tandis que, sur la base de l'analyse culture-dépendante, *Lacticaseibacillus paracasei* prédominait à ces mêmes stades et *L. lactis* n'était plus identifiée. De manière intéressante, les *L. lactis* identifiés pendant l'affinage appartenaient à une OTU différente des autres stades. Plusieurs hypothèses ont été envisagées. Tout d'abord, des analyses complémentaires ont écarté tout problème lié à l'extraction de l'ADN et à l'amplification du gène codant l'ARNr 16S chez *L. paracasei* lors de l'analyse métagénomique. De plus, les expériences de validation des conditions d'analyse métagénomique ont montré que, sur une précédente production et au même stage d'affinage, les compositions bactériennes étaient similaires à celles observées dans l'étude (**Chapitre I – Annexe 1**).

Les hypothèses expliquant ce résultat font écho aux limites présentées dans l'introduction bibliographique. Une première hypothèse serait que l'ADN de cellules mortes de *L. lactis* aurait été amplifié générant un biais important compte-tenu des hauts niveaux de populations de cette espèce. Ceci est plausible et cohérent avec la notion répandue de lyse des flores acidifiantes au cours de l'affinage (Crow et al., 1995; Beresford et al., 2001). Une autre hypothèse tout aussi plausible serait que les lactocoques seraient entrés dans un état Viable mais Non Cultivable (VNC). Ce phénomène a précédemment été rapporté dans un fromage affiné et avait été déclenché par la déplétion du lactose et le changement de métabolisme que cela induisait (Stuart et al., 1999; Ruggirello et al., 2014). Sur la base des résultats actuels, il est donc difficile de trancher entre ces deux hypothèses puisque l'on se heurte aux limites-mêmes de la métagénomique qui ne révèle que les 3 log<sub>10</sub> majoritaires d'un écosystème.

Concernant la mise en évidence de cellules viables par une approche métagénomique, des alternatives ont été développées ces dernières années pour pallier ce problème. En effet, il serait possible de réaliser un traitement des échantillons au propidium monoazide (PMA) et une comparaison pré- et post-traitement, comme appliqué par Mo et al. (2019) pour l'étude

des communautés microbiennes de produits laitiers fermentés mongoliens. Toutefois, des études ont montré que les espèces étaient plus ou moins sensibles et que la concentration en PMA utilisée influençait de manière significative le résultat, conduisant à une surestimation des populations non viables dans la plupart des cas (Perras et al., 2018). L'application d'une telle technique nécessiterait donc en amont une phase d'optimisation.

Les études menées sur le Pélardon et les olives de Nyons montrent bien la complémentarité des deux approches. Par ailleurs, l'un et l'autre des exemples ont montré l'intérêt d'étudier la dynamique des communautés microbiennes tout au long du process ; l'analyse en point final ne rendant aucunement compte de la complexité de l'écosystème et donnant lieu dans le cas du Pélardon à une vision erronée de la structure des communautés.

### ■ **Quels micro-organismes contribuent aux caractéristiques biochimiques des produits ?**

Étudier la diversité microbienne des aliments fermentés est aussi utile pour comprendre le rôle fonctionnel des micro-organismes et leur contribution aux caractéristiques finales du produit. Au cours de ces travaux, nous avons essayé de répondre à cette question en étudiant les corrélations positives ou négatives existant entre les dynamiques microbiennes mises en évidence pour chacun des produits et les changements biochimiques intervenant au cours de la fermentation. Pour chacun des produits, des marqueurs biochimiques du processus de fermentation incluant les composés d'intérêt entrant dans la perception aromatique du produit ont été ciblés. L'approche utilisée a fait ressortir, parmi la diversité fongique et bactérienne, des espèces significativement corrélées à ces marqueurs, indiquant leur potentielle forte contribution lors du processus de fermentation et apportant des indications sur certaines étapes clés du procédé de fabrication. Ainsi, comme rapporté dans l'**article 2** pour les olives de Nyons, sept espèces ont été corrélées avec divers acides organiques et composés d'arômes. En revanche, aucune corrélation n'a été mise en évidence pour la dégradation de l'oleuropéine. Huit espèces pour le Pélardon ont été identifiées comme particulièrement importantes dans le processus de fermentation.

Si, de manière globale, les associations mises en évidence étaient cohérentes avec les données disponibles dans la littérature, la seule analyse de corrélation présentait certaines limites. En effet, une corrélation positive entre un micro-organisme et un composé indique une évolution commune mais ne renseigne pas sur l'activité métabolique en elle-même. De

plus, les dernières phases de fermentation, que ce soit au cours de l'affinage, ou dans les derniers mois en saumure pour les Olives de Nyons, présentaient des profils de volatils beaucoup plus complexes. Compte-tenu des multiples voies métaboliques possibles comme présentées en introduction générale mais aussi des interactions entre micro-organismes, l'interprétation des données, au-delà de la classe de composés, est difficile.

Pour valider les corrélations observées entre micro-organismes et production de composés volatils, trois approches seraient envisageables. Une première approche centrée sur la caractérisation des isolats permettrait de valider l'existence d'une activité métabolique mise en évidence chez les différentes espèces/souches. Cette approche a, dans une certaine mesure, été appliquée dans le cadre de l'étude préliminaire sur les fermentations dirigées (**article 4**). En conséquence, une approche plus informative consisterait à réaliser des fermentations d'olives en inoculation mono-souche ou en consortium dans les conditions les plus proches de la réalité.

Toutefois, ce type d'approche ne rend pas compte de la complexité d'une communauté et de donne qu'une vision partielle des interactions existant entre micro-organismes.

Une seconde approche particulièrement informative serait de mener une analyse métatranscriptomique. Cela constitue l'analyse de choix pour étudier les micro-organismes des communautés microbiennes jouant un rôle actif et renseigne directement sur les fonctions exprimées par les micro-organismes à une étape de la fermentation (Dugat-Bony et al., 2015). En revanche, d'un point de vue technique, elle nécessite l'extraction directe des ARNs des échantillons et, dans notre cas, ne pourrait donc s'appliquer qu'à de futures campagnes de prélèvements.

Une troisième approche consisterait en une analyse à l'échelle de la communauté par analyse métagénomique (*shotgun*). L'analyse *shotgun* est basée sur le séquençage de l'ADN présent dans un échantillon. Mais, à la différence de la métégénétique "*metabarcoding*", tout l'ADN est séquençé et non un seul gène après amplification. Dans le cas des aliments fermentés, l'intérêt majeur de cette technique est qu'à partir des séquences, il est possible d'accéder au potentiel métabolique de la communauté microbienne (bactérienne et fongique). Après assemblage et annotation des séquences, il est possible de reconstruire des voies métaboliques (De Filippis et al., 2018; Mataragas et al., 2018). Cette approche globale n'a, à ce jour, pas été appliquée à l'étude des olives de table. En revanche, une étude métagénomique a récemment été réalisée sur un fromage mexicain produit par fermentation naturelle, le Cojita, et a permis de mettre en évidence les voies de dégradations complètes des acides aminés



ramifiés, de certains acides gras ainsi que des gènes de production de bactériocines (Escobar-Zepeda et al., 2016). Ce type d'analyse serait donc tout à fait adapté aux deux matrices et permettrait d'établir un parallèle direct avec les résultats obtenus par métagénomique. Dans le cas des Olives de Nyons, il serait pertinent de réaliser cette analyse à la fin de la fermentation, mais aussi aux stades associés à des changements majeurs de structure du microbiote mises en évidence lors de l'étude des communautés (**étude 1 – chapitre II**) (J21 : développement de *C. diazotrophica* et J120 : production des acides organiques). Dans le cas du Pélardon, il conviendrait de réaliser cette analyse *shotgun* aux étapes clé de changement de composition du microbiote : i) au stade J2, correspond à l'acidification, ii) à J14 quand *L. paracasei* est détecté, et enfin en fin d'affinage J90, où la communauté microbienne complexe est corrélée avec de nombreux esters. Ainsi, l'approche *shotgun* pourrait apporter des éléments pour mieux comprendre les fonctionnalités en tenant également compte des interactions microbiennes fortement soupçonnées.

### ■ **D'où viennent les micro-organismes impliqués dans la fermentation des deux produits ?**

Comme évoqué en introduction bibliographique, l'environnement de production peut enrichir les communautés microbiennes des produits traditionnels. Les résultats des études de l'environnement rapportés en **article 1** pour le Pélardon et en **article 3** pour les olives de Nyons viennent le confirmer.

Un premier constat est que les diversités, bactérienne et fongique, rencontrées dans les olives fraîches ou dans le lait cru sont différentes en terme de composition de celles rencontrées en fin de fermentation. En particulier, pour les olives de Nyons, le microbiote naturel dominant ne perdure pas au-delà des trois premières semaines de fermentation. A l'inverse, certaines espèces, dominantes dans le produit final étaient sous-dominantes dans les olives fraîches.

Concernant le Pélardon, le lait cru a révélé une diversité microbienne relativement faible, contrastant avec les données disponibles dans la littérature. Si de bas niveaux de populations fongiques associés à une faible diversité étaient attendus, les approches culture-dépendante et -indépendante ont révélé un microbiote bactérien majoritairement dominé par des staphylocoques à coagulase-négative et dans une moindre mesure, des populations de

bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis*. Ces résultats sont révélateurs d'une bonne hygiène liée à la traite mais indiquent également que la contribution microbienne du lait cru dans le cas de la production étudiée était limitée. Par ailleurs, comme pour les olives de Nyons, les espèces autochtones du lait à l'exception des populations lactiques n'ont pas perduré au cours de la fabrication.

Ces éléments, suggèrent que dans le cas des deux matrices, les matières premières jouent un rôle primordial au niveau des substrats de croissance et précurseurs biochimiques mais un rôle limité quant à l'apport des micro-organismes impliqués dans la fermentation.

En revanche, pour chacun des produits, les intrants jouent un rôle essentiel comme source de micro-organismes. Dans le cas des olives de Nyons, la saumure et le sel sec se sont avérés être des réservoirs de micro-organismes et notamment des espèces dominantes retrouvées pendant la fermentation. Dans le cas du Pélardon, le lactosérumensemencé par *backslopping* a été identifié comme la source principale des bactéries acidifiantes mais également du microbiote fongique primaire d'affinage. Comme établi dans la discussion de l'article 1, l'apport des bactéries acidifiantes via le *backslopping* a largement été observé dans les fromages (Demarigny et al., 2006; Ercolini et al., 2008; Bottari et al., 2010). En revanche, l'apport de flore fongique a été moins relevé à ce jour. Pour les deux communautés, une très faible diversité spécifique a été observée et il est fort probable que cela soit liée à une spécialisation et sélection au fur et à mesure des productions, comme cela a été démontré par Erkus et al. (2013) lors de travaux sur une culture non définie utilisée pour la production de Gouda.

En revanche, les résultats de métagénomique et l'identification par séquençage de certains isolats suggèrent qu'une diversité intra-spécifique existe au sein de l'espèce *L. lactis*. Ce niveau de diversité n'a pas été étudié au cours de nos travaux mais constituerait une perspective intéressante compte-tenu du rôle essentiel du lactosérum. Des travaux ont en effet montré qu'un des avantages des ensemencements de lactosérum naturels (ou non définis) résidait dans la présence de différentes souches conférant une résilience grâce à une meilleure résistance aux attaques de phages (Marcó et al., 2012). Par exemple, la sensibilité aux phages est différente chez *L. lactis* subsp. *lactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris* (Godon et al., 1992) et au sein d'une même sous-espèce. De même, une étude de la diversité intra-spécifique d'une production à une autre et d'une saison à une autre s'avérerait intéressante.

Les espèces dominantes au cours des fermentations des deux produits ont également été largement retrouvées dans les échantillons environnementaux. Dans le cas du Pélardon, de nombreuses bactéries, *Staphylococcus equorum* et *Staphylococcus xylosus*, *Glutamicibacter arilaitensis* retrouvées en surface des fromages affinés n'étaient présentes dans aucune des matières premières, mais ont été retrouvées sur du matériel utilisé lors de l'étape de moulage et de séchage, qui constitue donc la source de ces micro-organismes. Concernant les olives de Nyons, les espèces dominantes au cours de la fermentation étaient également omniprésentes dans l'environnement de production.

Certaines limites sont néanmoins à prendre en considération. Il n'est, par exemple, pas exclu que d'autres sources de micro-organismes soient présentes dans l'environnement et n'aient pas été mises en évidence par les prélèvements effectués. De même, il est possible d'argumenter que les micro-organismes détectés dans l'environnement proviennent eux-mêmes des produits finaux. Dans le cas des Pélardons, il faut préciser que la plupart des échantillons ont été prélevés sur du matériel propre et prêt à être employé. Par ailleurs, cela montre que ce microbiote ambiant est maintenu et entretenu lors du processus de production en accord avec les travaux de Mounier et al. (2006) ou plus récemment de Bokulich and Mills (2013). De manière générale, les résultats obtenus indiquent une influence de l'environnement, que ce soit à travers les dynamiques mises en évidence ou comme sources de micro-organismes des produits fermentés. Au cours de cette thèse, les études se sont focalisées sur un seul producteur par produit. Pour approfondir cette notion d'origine des micro-organismes, il serait intéressant d'étudier chez d'autres producteurs dans quelle mesure l'environnement contribue aux communautés des produits finaux.

L'analyse de fermentations altérées d'olives de Nyons (**article 3**) a permis d'aller plus loin dans le rôle de l'environnement dans le façonnement des communautés microbiennes, notamment dans l'implantation de la flore d'altération. En effet, les espèces de bactéries lactiques associées à l'altération étaient pour certaines, i.e., *L. parafarraginis*, *L. buchneri*, présentes dans les matières premières et l'environnement, alors que d'autres étaient uniquement présentes dans l'environnement. (e.g., *P. ethanolidurans*).

De plus, cette étude sur l'environnement et l'altération a permis de confirmer une spécificité des olives de Nyons (cf **article 2**) : l'absence de bactéries lactiques dans la fermentation mais dont la présence, de manière étonnante par rapport aux données de la littérature sur les olives fermentées, était liée à une altération. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les espèces

identifiées comme contaminantes ont été retrouvées dans d'autres études portant sur la diversité des olives de table.

L'ensemble de ces résultats montre l'intérêt d'étudier différents produits artisanaux issus d'une même matière première afin de mettre en avant leur spécificité microbienne. Par ailleurs, ils amènent à considérer l'environnement de production comme partie intégrante de l'écosystème des produits fermentés traditionnels et artisanaux. Si les données du Pélardon viennent conforter cette notion bien établie dans le domaine laitier (Didienne et al., 2012), il s'agit pour les olives, de la première étude s'y intéressant. Par ailleurs, dans le cas des aliments fermentés artisanaux, l'étude des flux microbiens, positifs ou négatifs, permet également d'une part de mieux identifier les potentielles sources de micro-organismes indésirables et, d'autre part, de préserver les sources de micro-organismes bénéfiques. De fait, ces deux aspects concourent à une meilleure maîtrise de la fermentation

#### ■ Pourquoi préserver les ressources microbiennes ?

Dans ces travaux, grâce à l'approche culture-dépendante, pour chaque produit, une collection de micro-organismes autochtones a été créée en favorisant la diversité taxonomique. Les propriétés technologiques de certains isolats collectés ont également été caractérisés dans l'**article 4** pour sélectionner des micro-organismes autochtones susceptibles d'être utilisés pour la réalisation de fermentation dirigée. Au-delà de ces aspects appliqués, la préservation et la mise en collection des micro-organismes autochtones sont des questions essentielles. La diversité taxonomique peut aller de pair avec une diversité fonctionnelle (Smid et al., 2014) et les micro-organismes autochtones qui résultent d'une adaptation à un environnement et à la matrice sont susceptibles d'avoir développé des caractéristiques propres qu'il est intéressant de sauvegarder (De Vero et al., 2019).

L'intérêt de la préservation ne se réduit pas à la découverte de nouveaux traits technologiques, elle peut aussi s'avérer nécessaire pour le producteur. En effet, le rôle du microbiote autochtone (« house microbiota») a été établi pour les deux aliments. Dans le cas du Pélardon comme des olives de Nyons, l'environnement de production est un réservoir de diversité microbienne mais il pourrait également être altéré/modifié par un changement au niveau du procédé, du matériel et des équipements de transformation ou suite à un important accident de fabrication. Cette richesse microbienne présente dans l'environnement et les

matières premières est donc susceptible d'être modifiée au cours du temps et il est donc important de la préserver. En lien avec cette problématique, une perspective intéressante concerne la conservation d'une saison à une autre, du lactosérum utilisé pour le *backslopping*. En effet, pour redémarrer la production du Pélardon après l'interruption hivernale, la pratique actuelle de la productrice consiste, l'année précédente à mélanger le lactosérum d'une production à du lait de chèvre bouilli. Le mélange est congelé à -20°C et sert d'inoculum lors de la reprise de production. Ce procédé est intéressant d'un point de vue fondamental puisqu'il traduit une conservation de la fonctionnalité des micro-organismes. En revanche, la conservation de la diversité microbienne associée reste à établir. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier l'influence de la congélation sur la composition du microbiote à l'issue de la période de stockage et de vérifier comment les espèces présentes s'implantent lors de la reprise de la production. Si la congélation du lactosérum assurait avec certitude la pérennité de l'inoculum, cette technique constituerait une piste de développement pour d'autres productions d'aliments fermentés. A l'inverse des protocoles lourds, actuellement utilisés dans les laboratoires et les collections reposant sur l'utilisation de glycérol ou d'autres agents de cryoprotection, et la conservation à -80°C ou la lyophilisation, la congélation est facilement réalisable par les producteurs, eux-mêmes. Elle permettrait de conserver au sein de l'exploitation les espèces autochtones en toute autonomie.

### ■ **Comment exploiter les ressources autochtones ?**

La dernière partie des travaux de thèse était consacrée à l'exploitation de la diversité microbienne mise en évidence au profit des fermentations.

Comme évoqué en introduction bibliographique, la principale dérive identifiée pour les fermentations naturelles est la présence potentielle de pathogènes (Capozzi et al., 2017). Un constat important est que, pour les deux matrices, les échantillons prélevés au cours de la fermentation et les produits finaux ont toujours montré une qualité sanitaire des produits parfaitement en adéquation avec les critères imposés par la réglementation.

L'exploitation des ressources a donc été orientée sur les besoins des producteurs. Dans le cas des olives de Nyons, deux axes ont été définis. Le premier axe relevait de la durée de fermentation qui s'avérait particulièrement longue et le second axe tenait à la réduction de la concentration en sel des olives en lien avec les exigences actuelles des consommateurs. Afin d'explorer ces deux axes, des fermentations dirigées ont été réalisées (cf **Chapitre III article**

4). L'approche employée dans les travaux consistait d'une part à définir un consortium de levures autochtones appartenant aux espèces dominantes en cours de fermentation et à l'inoculer dans des fermentations à 10% et 8% de sel de manière à amorcer la fermentation plus rapidement et d'autre part, à inoculer une fermentation par *backslopping* à partir de saumure d'une fermentation précédente. Les fermentations ont été menées au sein de la coopérative de manière à assurer les mêmes conditions et exposition au microbiote ambiant que pour les fermentations classiques.

De manière générale, l'inoculation du consortium complexe n'a pas eu l'effet escompté sur la durée de la fermentation et en particulier la désamérisation des olives n'a pas été plus rapide. Ce résultat est à mettre en lien avec les résultats des tests de caractérisation des isolats lors de la sélection. En effet, aucune activité  $\beta$ -glucosidase n'a été mise en évidence chez les souches levuriennes sélectionnées, expliquant la désamérisation aussi lente que celle observée en fermentation spontanée. De plus, l'ajout de la culture dans la saumure à 10%, n'a pas entraîné d'effet majeur ni sur les volatils, ni au niveau sensoriel, ce qui indique que, si aucun défaut n'est révélé, les bénéfices de l'inoculation sur une fermentation spontanée à 10% de sel sont réduits. Toutefois, cette inoculation pourrait être susceptible de diminuer les accidents de fabrication mais cet aspect n'a pas été étudié dans le cadre de ces travaux. En outre, l'inoculation par *backslopping* qui aurait constitué la solution la plus pratique à mettre en place, a été écartée sur la base des qualités sensorielles des olives perçues comme « douçâtres » en fin de fermentation. En revanche, les fermentations menées en saumure à 8% de sel ont été reçues favorablement. La fermentation inoculée avec la culture complexe, a été particulièrement appréciée lors des tests sensoriels préliminaires potentiellement corrélée aux différences de profils volatils mis en évidence. Aucune dérive n'ayant été détectée sur la base des résultats disponibles à ce jour, cette condition constitue une solution prometteuse.

Ces résultats et conclusions sont toutefois à mettre en perspective avec le statut des olives de Nyons. La question de la sélection de souches pour les produits fermentés AOP est particulière. Les notions de tradition et de sélection des levains sont souvent perçues comme antinomiques pour certains producteurs ; c'est d'ailleurs en partie pour cette raison qu'aucun travail n'a été réalisé dans le cadre de l'étude menée sur le Pélardon. Toute modification de l'AOP est, par ailleurs, soumise à une autorisation. Il est vrai que certains produits artisanaux bénéficiant de ce label ont recours à des cultures starters et d'affinage comme le Roquefort ou encore le Camembert de Normandie mais leurs utilisations sont strictement réglementées. L'utilisation de culture starter en fermentation d'olives de table est de plus en plus étudiée et repose sur l'inoculation de micro-organismes, présentant, certes des propriétés

technologiques, mais souvent non autochtones des variétés et/ou de la production testée (Anagnostopoulos et al., 2019; Chytiri et al., 2020). Une telle approche peut apparaître contradictoire avec la notion de typicité et de terroir. Toutefois, le choix fait ici de recourir uniquement aux micro-organismes autochtones n'altère en rien le microbiote naturellement présent sur les matières premières en respect avec les fondements de l'AOP et la typicité des olives de Nyons.

## ■ Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont permis de mieux connaître la diversité microbienne associée à deux aliments fermentés traditionnels jusqu'alors peu étudiés.

À travers cette étude spécifique, d'un point de vue méthodologique, les résultats obtenus ont confirmé l'intérêt de recourir aux deux approches culture-dépendante et -indépendante afin de décrire le plus finement possible la diversité microbienne des aliments fermentés, et de ne pas avoir de vision biaisée de cette diversité. Par ailleurs, les approches culture-dépendantes basées sur une combinaison déréplication/séquençage se sont avérées efficaces pour mener une large étude, décrire les dynamiques mais également sélectionner des micro-organismes en vue de leur préservation. Ces travaux ont souligné l'importance de considérer l'environnement de production comme une composante essentielle pour comprendre l'origine des micro-organismes et leur dynamique lors de fermentation traditionnelle. Enfin, d'un point de vue appliqué, le travail réalisé en partenariat avec des producteurs a permis pour chaque aliment d'en dresser le profil microbien et aromatique. Dans le cas des olives de Nyons, il a permis d'amorcer des axes de recherche quant à la préservation et l'exploitation des micro-organismes autochtones sans compromettre la typicité et le savoir-faire associé.

---

# **VALORISATIONS SCIENTIFIQUES**

---





## **Publication acceptée**

**Penland M.**, Deutsch S., Falentin H., Pawtowski A., Visentin G., Poirier E., Le Meur C., Maillard M., Thierry A., Mounier J. and Coton M., 2020. Deciphering microbial community dynamics and biochemical changes during Nyons black olive natural fermentations. *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2020.586614

## **Publications soumises ou en préparation**

**Penland M.**, Falentin H., Parayre S., Pawtowski A., Maillard M., Thierry A., Mounier J., Coton M. and Deutsch S., 2020. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. **In revision for publication in International Journal of Food Microbiology**

**Penland M.**, Mounier J., Pawtowski A., Treguer S., Deutsch S. and Coton M., 2020 Use of metabarcoding and source tracking to identify desirable or spoilage autochthonous microorganism sources during black olive fermentations. **Submitted to Food Research International**

**Penland M.**, Pawtowski A., Pioli A., Debaets S., Maillard M., Falentin H., Deutsch S. , Mounier J. and Coton M. Impact of a tailored complex starter culture for Nyons black table olive fermentations. **Manuscript in preparation**

## **Communication orale**

**Penland, M.**, Deutsch, S., Falentin, H., Coton, E., Mounier, J. & Coton, M. Étude de la diversité microbienne de produits fermentés méditerranéens artisanaux : olives de table et fromage de chèvre – Présentation des travaux de thèse, Colloque de l’Institut Brestois Santé-Agro-Matière, 5 juin, Brest, 2018 (présentation)

## **Communications affichées**

**Penland M.**, Coton M., Mounier J., Parayre S, Coton E., Falentin H. & Deutsch S. Microbial diversity of Pélardon, an artisanal raw goat milk cheese. 8th Congress of European Microbiologists - FEMS, Glasgow, 7-11 July, 2019. (poster)

**Penland M.**, Deutsch, S., Falentin, H., Le Meur, C., Coton, E., Mounier, J. & Coton, M. Exploring microbial diversity of naturally fermented PDO Nyons table olives. 8th Congress of European Microbiologists - FEMS, Glasgow, 7-11 July, 2019. (poster)

**Penland M.**, Deutsch, S., Falentin, H., Le Meur, C., Coton, E., Mounier, J. & Coton, M. Microbial diversity of PDO Nyons table olives unraveled during natural fermentation. Journées scientifiques de l'Ecole Doctorale EGAAL, Rennes, 4 & 5 juillet, 2019. (poster)

**Penland M.**, Coton M., Mounier J., Parayre S, Coton E., Falentin H. & Deutsch S. Deciphering the microbial diversity of Pélardon cheese: which function for which microbe? STLOpen days, Rennes, 19-21 mars, 2019. (poster)

**Penland M.**, Coton M., Mounier J., Parayre S, Coton E., Falentin H. & Deutsch S. Microbial diversity of Pélardon, a traditional raw goat's milk cheese. Congrès annuel de la Société Française de Microbiologie - Octobre, 2018 (poster)

**Penland M.**, Deutsch, S., Falentin, H., Le Meur, C., Coton, E., Mounier, J. & Coton, M. Promouvoir les aliments fermentés méditerranéens grâce à une meilleure connaissance de leur diversité microbienne. 8<sup>ème</sup> congrès annuel de l'Association Française d'Ecologie Microbienne - Octobre, 2017 (poster)



## Context

Pélardon is a Protection Designation of Origin (PDO) French artisanal soft rind cheese, produced in mountainous areas in southern France. It is exclusively produced from raw goat's milk using a backslopping method for inoculation. Its manufacture and unique organoleptic properties rely on the autochthonous microbiota and their activities. The aim of this work is thus to study Pélardon microbial (fungal & bacterial) diversity and dynamics during cheese-making and ripening by culture-dependent and -independent approaches.

## Strategy

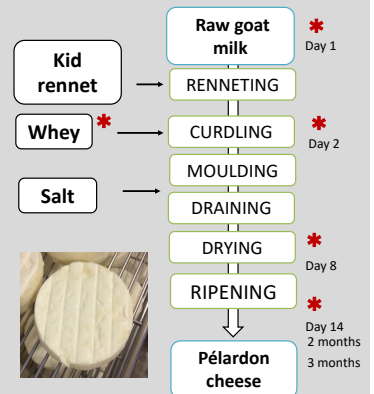
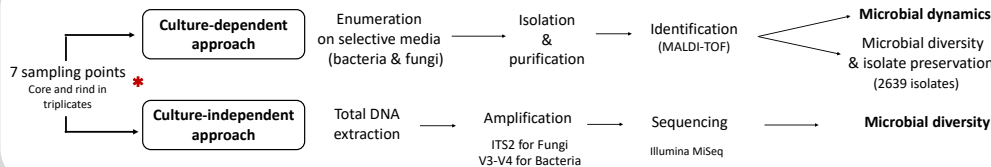


Figure 1. Pélardon cheese-making process. Red stars correspond to the sampling points.

## Culture-dependent approach

### Microbial diversity and dynamics monitored during Pélardon cheese-making process in both rind and core

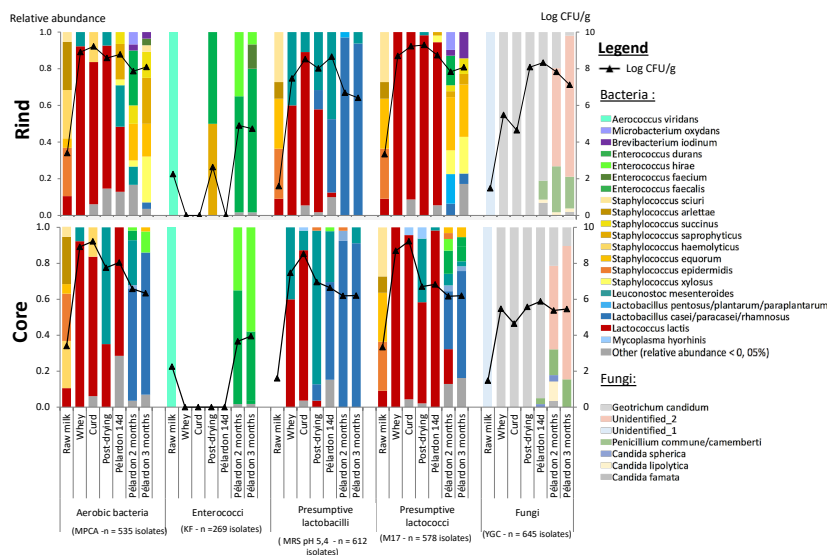


Figure 2. Microbial counts in log CFU/g and diversity encountered on different media. Diversity data and isolate identifications were obtained via MALDI-TOF analysis against a commercial and internal database (identification for each isolate was performed in duplicate)

- Bacterial populations were higher in the rind compared to those in the core although the same trends were observed. The curdling step led to a high increase of all populations (except for enterococci), followed by a progressive decrease until the end of the ripening.
- Lactococcus lactis* dominated during acidification and drying in both core and rind and was mainly brought by the whey used for backslopping. After prolonged ripening, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* became dominant in the core whereas *Corynebacteria* and *Staphylococcus* were dominant in the rind.
- Fungal populations were low in raw milk compared to the whey used for backslopping. Regarding diversity, *Geotrichum candidum* was dominant although other species such as *Penicillium* spp. were found in late ripening stages.

## Conclusion

Pélardon cheese production was monitored using culture-dependent and -independent methods. Culture-dependent results, based on the analysis of more than 2000 isolates, highlighted the importance of whey as a source of bacteria and fungi. Results also shed light on the dynamics during the process. Diversity increased during ripening for fungi and bacteria and metagenetic analyses corroborated with the previous results. *Lactococcus lactis* was shown to be a key player of the microbial ecosystem. To have a better understanding of the dynamics, metagenetic analyses will be performed for all sampling points. Moreover, volatiles, sugars and organic acids will be monitored at the different process steps in order to link the microbial diversity and dynamics with cheese biochemical changes.

## Culture-independent approach

### Preliminary metagenetic analyses & comparison with microbial counts on curd and 3-month ripened cheese from a previous batch

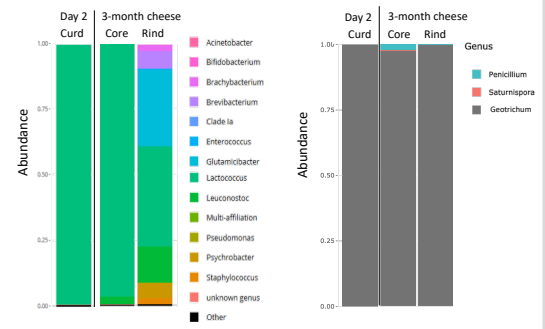
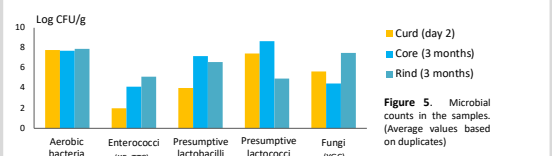


Figure 3. Bacterial diversity in the samples at the genus level. Data were analysed using FROGS pipeline<sup>(1)</sup> and Silva132 database.

Figure 4. Fungal diversity in the samples at the genus level. Data were analysed using FROGS ITSx pipeline<sup>(1)</sup> and the UNITE\_Fungi database



- Aerobic bacterial counts were similar in all samples but dynamics in other populations were observed. Lactococci decrease was concomitant with an increase in lactobacilli and enterococci populations.
- Lactococcus lactis* dominance was confirmed by metagenetics. Surprisingly, lactobacilli relative abundance was low despite an increase in their populations in the 3-month cheese.
- Bacterial diversity was higher in rind with up to 6 genera, mainly *Corynebacteria* and Gram-negative bacteria.
- Fungal populations were higher in the rind of the ripened cheese and dominated by *Geotrichum* after curdling step.

## References

- (1) Frédéric Escudé, Lucas Auer, Maria Bernard, Mahendra Mariadassou, Laurent Cauquil, Kaïa Vidal, Sarah Maman, Guillemine Hernandez-Raquez, Sylvie Combes, Géraldine Pascal; FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution, *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 8, 15 April 2018, Pages 1287–1294

## Acknowledgements

We would like to thank our cheesemaker partner for accepting to be part of our project and providing the samples.

PROMEDFOODS is a project funded through the ARIMNet2 2017 Call by the following funding agencies: ANR, ELGO-DEMETER, MESRS, MIPAF, INIA and MHESR. ARIMNet2 (2014-2017) has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 618127.



## Context & experimental design

Artisanal fermented foods constitute a significant part of the Mediterranean diet and represent a cultural heritage that needs to be preserved and protected. PDO Nyons table olives are produced according to a traditional process by a slow spontaneous fermentation in brine (Figure 1). The manufacture and unique sensorial properties of these olives only relies on autochthonous complex microbiota.

This study aimed at unravelling the microbial ecology and dynamics of Nyons table olives during a yearlong spontaneous fermentation (Figure 2).

The core microbial species were determined for potential future directed fermentations.

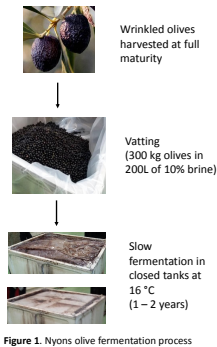


Figure 1. Nyons olive fermentation process

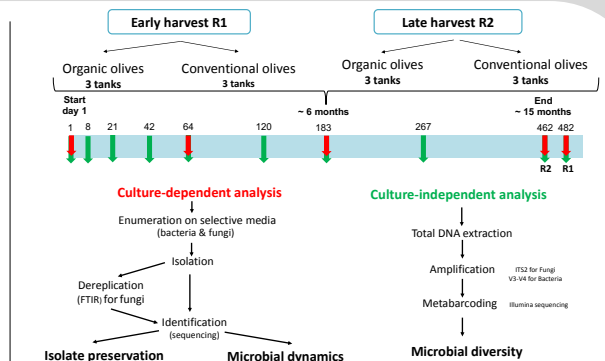


Figure 2. Experimental design and strategy to study microbial ecology

## Microbial populations were stable during the studied fermentations

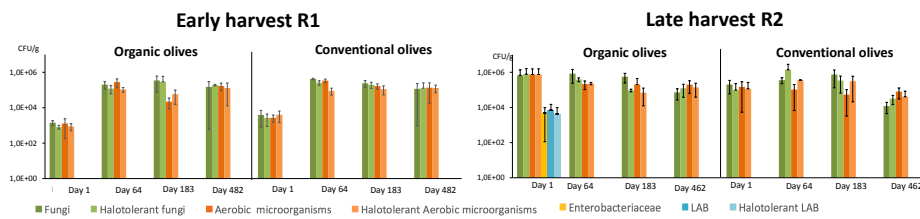


Figure 3. Microbial counts in CFU/g and diversity encountered on different media. Average values and standard deviation based on triplicates

- Results suggest that Nyons table olive fermentations mainly rely on yeasts.
- Lactic acid bacteria were only detected in fresh organic olive fruits (second harvest) whereas fungal populations remained steady throughout fermentation.
- Microbial populations were higher for the late harvest for both olive types.

## Culture-dependent analyses revealed diversified fungal populations and species dynamics...

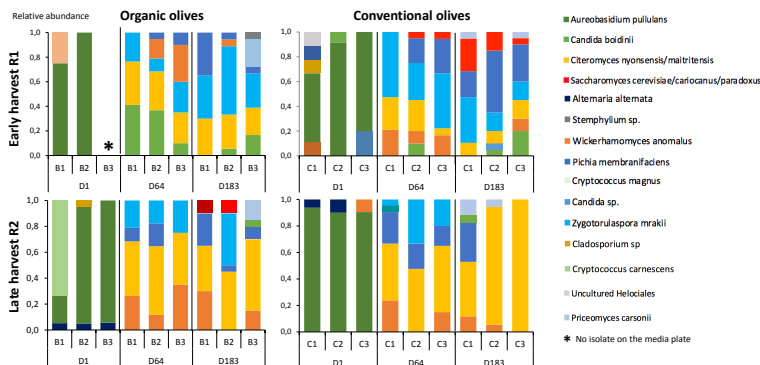


Figure 4. Fungal diversity encountered on fresh fruit (day 1), day 64 and day 183 of fermentation for the two monitored fermentation R1 and R2. Isolates were taken after plating on YGC+5% NaCl. Data and isolate identification were obtained after clustering via Fourier Transform InfraRed spectroscopy analysis and 26S rDNA gene sequencing of representative isolates.

- *Aureobasidium pullulans* was dominant on fresh fruit in all 4 fermentations, although other species were encountered in some replicates in smaller abundances.
- After 2 months of fermentation, fungal diversity increased and four yeast species remained dominant forming the core microbiota (*W. anomalus*, *C. nyonsensis*, *P. membranifaciens*, *Z. mrakii*). However, relative abundance varied between replicates and harvests. Among them, only *Wickerhamomyces anomalus* was previously isolated from fresh fruits but in low abundance, highlighting the importance of the environmental flux.
- Differences in species diversity between harvests were not substantial except for *Candida boidinii* in the early harvest fermentations.

## Conclusion & perspectives

Four different Nyons table olive fermentations were monitored using culture-dependent and -independent analyses. Results suggest that yeasts are the key actors of the process with four species consistently found in high abundances. Metabarcoding analyses performed at early days of fermentation were well correlated and provided complementary information about fungal and bacterial communities. To better understand microbial dynamics, metagenetic analyses will be performed on the remaining sampling points. Moreover, volatiles, sugars and organic acids at the same stages of fermentation are currently being analysed to link microbial diversity and dynamics with olive aroma profiles and biochemical changes.

## ...confirmed by preliminary metagenetic analyses

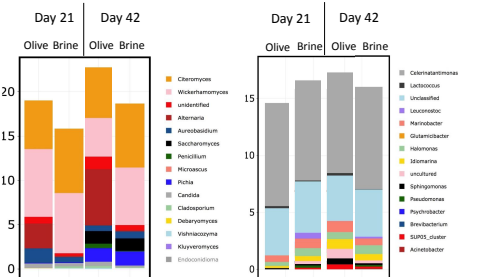


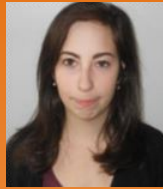
Figure 5. Fungal diversity in the samples at the genus level. Data were analysed using an internal Qiime ITSx pipeline and the UNITE\_Fungi database

- At day 21 and 42 of fermentation, fungal communities were dominated by *Citeromyces* and *Wickerhamomyces* genera and in olives, *Alternaria*. Some genera such as *Pichia* and *Saccharomyces* were only present at day 42.
- These results were consistent with culture-dependent analyses and bring complementary information on fungal dynamics.
- Bacterial communities were dominated by *Celerinatantimonas*, a diazotrophic halotolerant and fermentative bacteria, suggesting a potential role during fermentation.
- Lactic acid bacteria such as *Lactococcus* and *Leuconostoc* genera were detected at very low abundances which might explain the culture-dependent counts.

## Acknowledgements

We would like to thank our olive producer partner, cooperative VIGNOLIS (Nyons, France) for collaborating in this project and providing the samples.

PROMEDFOODS is a project funded through the ARIMNet2 2017 Call by the following funding agencies: ANR, ELGO-DEMETER, MESSR, MIPAF, INIA and MHESR. ARIMNet2 (2014-2017) has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement n° 618127.



Marine PENLAND



PhD student  
•  
2017-2020



UMR INRA - Agrocampus Ouest  
Science and Technology  
of Milk and Eggs

**MicroBio Team**  
Microbiology of milk  
and egg sectors

LUBEM EA3882 - UBO  
Laboratoire Universitaire de  
Biodiversité et Ecologie  
Microbienne

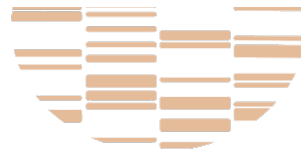
**Microbial ecology Team**

**Keywords**  
Diversity  
Lactic Acid Bacteria  
Yeasts  
Metagenetics  
Natural fermentation

**Funders**



**Collaborators**



# Deciphering the microbial diversity of Pélardon cheese: which function for which microbe ?

## Socio-economic context

- **Pélardon** is a Protected Designation of Origin **French artisanal raw goat's milk** cheese produced without commercial starter but **backslopping** method
- Raw milk PDO cheeses are produced in a specifically in **defined geographical areas** using specific know-how and skills
- Cheeses are described as having **diverse and distinctive sensory properties**<sup>[1]</sup>

## Scientific context

- Traditional and artisanal fermented cheese-making mainly relies on **autochthonous microorganisms**
- Microorganisms ensure **acidification** and **stabilization** but also influence the **organoleptic properties**
- **Complex bacterial and fungal consortia** are often poorly characterized despite their major contribution to **unique properties** and **typicity** of artisanal cheeses

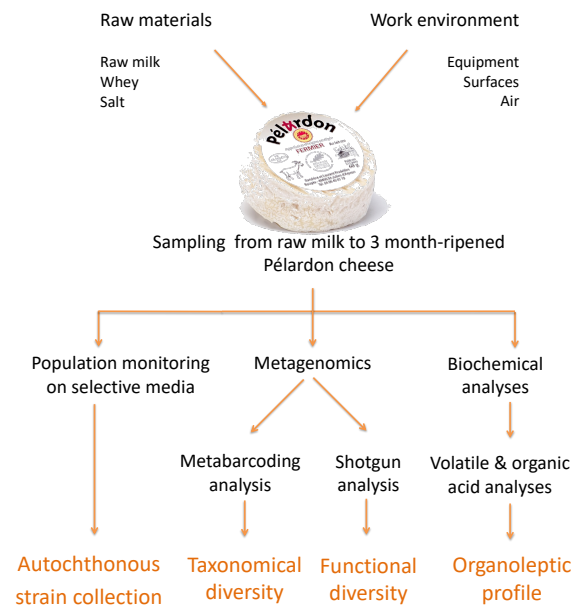
## Research question

- What microbial populations are encountered during Pélardon traditional cheese-making and how can we exploit microbial diversity to achieve better fermentation control and product quality?

## Expected results

- Identify **microbial vectors** and **key-steps** of the Pélardon cheese-making process
- Understand the **dynamics of fungal and bacterial communities** involved in the cheese-making process
- Unravel their **potential functional roles** related to the **organoleptic properties** of Pélardon cheese
- Characterize the dominant species and **identify beneficial autochthonous strains**

### Potential microbial sources



## Research perspectives

- Better knowledge about **taxonomic and functional diversity** of autochthonous strains
- Provide the local producer with a **consortia of autochthonous strains** of technological interest to better **manage and control** the cheese-making process while respecting **traditional know-how**

[1] Guerrero *et al.*, 2009. Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study

# Microbial diversity of Pélardon, an artisanal raw goat milk cheese

1,2PENLAND Marine, 1COTON Monika, 1,2MOUNIER Jérôme, 2PARAYRE Sandrine, 1COTON Emmanuel, 2FALENTIN Hélène, 2DEUTSCH Stéphanie Marie

## Context

Pélardon is a Protection Designation of Origin (PDO) French artisanal soft rind cheese. It is exclusively produced from raw goat's milk using a back slopping method in mountainous areas in southern France. Like most artisanal fermented foods, its manufacture and unique organoleptic properties rely on the autochthonous microbiota and activities. The aim of this work is thus to study Pélardon microbial ecology and dynamics during cheese-making process by culture-dependent and -independent approaches.

## Experimental approach

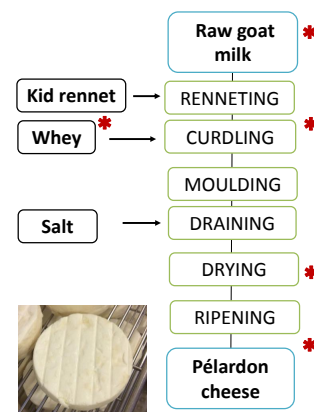
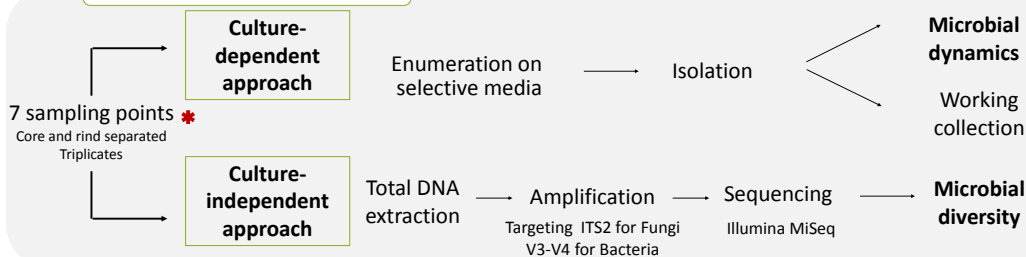


Figure 1. Pélardon cheese-making process. Red stars correspond to the sampling points.

## Microbial dynamics during cheese-making

A culture-dependent analysis was used to monitor microbial dynamics during Pélardon cheese-making process in both core and rind.

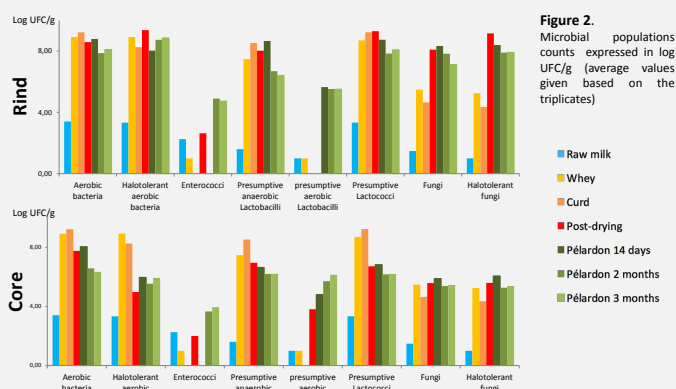


Figure 2. Microbial populations counts expressed in log UFC/g (average values given based on the triplicates)

- Both higher bacterial and fungal populations were observed in whey used as an inoculum compared to raw milk
- Populations were higher in the rind compared to the core
- As expected, halotolerant fungi and bacteria were higher in core and rind after salting and drying steps.

Working collection of 2104 isolated created

## Conclusion

An entire Pélardon cheese production was followed. Culture-dependent results underlined the importance of the whey as inoculum for bacterial and fungal populations. Preliminary metagenetic analysis performed at two different steps of the process gave a first insight of the microbial diversity and dynamics.

## Microbial diversity by metagenetics

Optimization experiments for metagenetic analysis were performed on curd and 3-month ripened cheese from a previous batch.

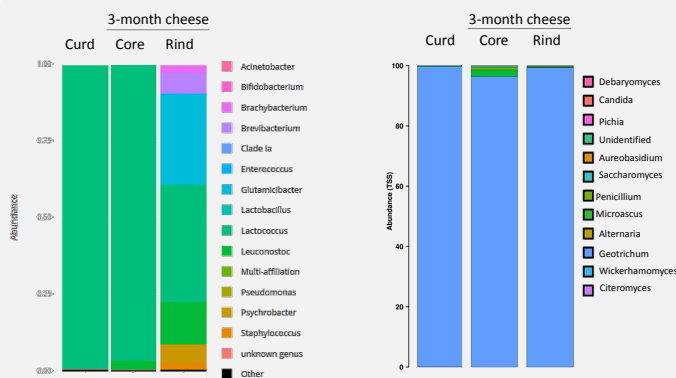


Figure 2. Bacterial composition of the samples at the genus level. Data were analysed using FROGS pipeline and Silva132 database.

Figure 3. Fungal composition of the samples at the genus level. Data were analysed using an intern Qiime pipeline and UNITE database.

Preliminary results:

- *Lactococcus* genus is dominant in all samples
- Core and curd showed similar composition
- Higher bacterial diversity in the rind: up to 6 taxa, mainly *Corynebacteria* and Gram-negative bacteria, with relative abundance >2%
- Fungal populations dominated by *Geotrichum*

## On-going work

The isolated collected during the production will be identified. Metagenetic analysis will be performed for all sampling points. These results altogether with population counts will be correlated and give us a better understanding of the microbial population's diversity and evolution during the process.

## Acknowledgements

PROMEDFOODS is a project funded through the ARIMNet2 2017 Call by the following funding agencies: ANR, ELGO-DEMETER, MESRS, MIPAF, INIA and MHESR. ARIMNet2 (2014-2017) has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement N° 618127.

**Promouvoir les aliments fermentés méditerranéens grâce à une meilleure connaissance de leur diversité microbienne**

<sup>1</sup>Marine PENLAND, <sup>2</sup>Stéphanie Marie DEUTSCH, <sup>2</sup>Hélène FALENTIN, <sup>1</sup>Emmanuel COTON, <sup>1</sup>Jérôme MOUNIER et <sup>1</sup>Monika COTON

<sup>1</sup>Université de Brest, EA 3882, Laboratoire Universitaire de Biodiversité et Ecologie Microbienne, IBSAM, ESIAB, Technopôle Brest-Iroise, 29280 Plouzané, France

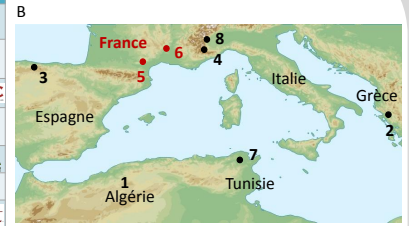
<sup>2</sup>Institut National de la Recherche Agronomique, UMR1253, Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, F-35042 Rennes, France  
Email : Marine.Penland@univ-brest.fr

**Le projet ProMedFoods (2017-2020)**

Les **aliments fermentés traditionnels** occupent une place importante dans le régime méditerranéen et constituent un **patrimoine gastronomique** riche **parfois en danger** du fait de l'industrialisation et de la standardisation associée. La production et les qualités organoleptiques uniques associées à ces aliments reposent principalement sur l'activité du **microbiote naturellement présent**. Ces consortia microbiens, parfois très complexes, sont encore mal connus.

Le projet européen ProMedFoods a pour objectif de **valoriser** les produits fermentés méditerranéens en étudiant leur diversité et, par une **meilleure maîtrise** de ces écosystèmes, de permettre aux producteurs artisanaux d'améliorer la **qualité organoleptique** et **sanitaire** des produits. Le projet réunit **6 pays** et repose sur une étroite collaboration avec des **producteurs locaux** pour chacun des **8 produits** étudiés.

A	Aliment fermenté	Type d'aliment	Pays d'origine	Equipe d'étude
1	Smen/ D'han	Beurre	Algérie	
2	Galotyri	Fromage	Grèce	
3	Varé	Fromage frais	Espagne	CSIC
4	Castelmagno	Fromage	Italie	DISAFA
5	<b>Pélaridon</b>	<b>Fromage</b>	<b>France</b>	INRA
6	<b>Olives de Nyons</b>	<b>Olives</b>	<b>France</b>	UBO
7	Meski	Olives	Tunisie	nsat
8	Salame piemonte	Saucisse	Italie	DISAFA



Aliments fermentés traditionnels étudiés (A), dont deux en France et leur lieu respectif de production (B)

**Comprendre la typicité & le savoir-faire associés à l'aliment fermenté**

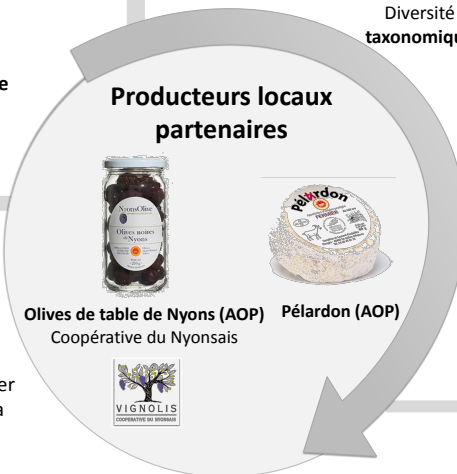
- Étude ethno-biologique de l'aliment fermenté  
Caractéristiques attendues de l'aliment fini  
Utilisation et mode de consommation traditionnels  
Existence d'un cahier des charges propre à sa production  
...

- Etude du savoir-faire  
Caractéristiques des matières premières  
Etude de l'environnement de production (matériel)  
Description complète du processus de fabrication  
Inventaire des qualités et des défauts des produits

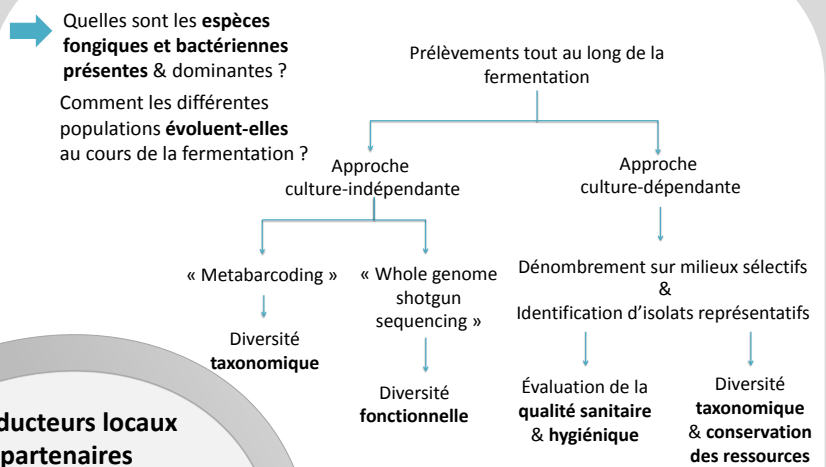
- ➔ Quelle est la **place de l'aliment** dans la **culture locale** et les **freins** à son développement?  
Quels sont les éléments contribuant à la **typicité** des produits ?

**Exploiter les ressources microbiennes au profit des producteurs**

- ➔ Comment une meilleure connaissance des **souches indigènes** peut contribuer à améliorer la **maîtrise de la fermentation**, la **qualité** et la **durée de vie** des aliments ?



**Révéler la diversité microbienne associée...**



**...et la préserver**

- Constitution d'une collection de microorganismes d'intérêt isolés par approche culture-dépendante
- ```

    graph LR
        A[Souches autochtones isolées] --> B[Identification de souches bénéfiques à la fermentation]
        A --> C[Evaluation de l'innocuité des souches (résistance aux antibiotiques, production d'amines biogènes, mycotoxines...)]
        B --> D[Sélection de souches et/ou consortia]
        C --> D
        D --> E[Test à l'échelle pilote chez le producteur des cultures sélectionnées]
        E --> F[Comparaison aux produits originaux]
        F --> G[Transfert des solutions développées au producteur]
        H[Amélioration de l'hygiène des procédés de production] --> G
    
```

**Financements**

PROMEDFOODS est un projet financé dans le cadre de l'édition 2017 de d'ARIMNet2 par l'ANR, la ELGO-DEMETER, le MESRS, le MIPAF, l'INIA et le MHESR.  
ARIMNet2 (2014-2017) est un ERA-Net soutenu et financé par la Commission Européenne via le 7<sup>ème</sup> Programme Cadre (FP7) pour la recherche, le développement technologique et la démonstration selon l'accord de subvention n° 618127.



Colloque de l'AFEM – 17 au 20 octobre 2017 – Camaret-sur-Mer





---

**RÉFÉRENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez-Pulido, R., et al. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology* 32, 308–316. doi:10.1016/j.fm.2012.07.006.
- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., and Gálvez, A. (2011). Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. *International Journal of Food Microbiology* 144, 487–496. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.006.
- Achilleos, C., Berthier, F., 2013. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food microbiology* 36, 286–95. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.024>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544. doi:10.1093/nar/gky379.
- Aguiar, C., Lucas, C. (2000). Yeasts killer/sensitivity phenotypes and halotolerance.
- Anagnostopoulos, D. A., Kamilari, E., and Tsaltas, D. (2020). Evolution of Bacterial Communities, Physicochemical Changes and Sensorial Attributes of Natural Whole and Cracked Picual Table Olives During Spontaneous and Inoculated Fermentation. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01128.
- Almli, V. L., Naes, T., Enderli, G., Sulmont-Rossé, C., Issanchou, S., and Hersleth, M. (2011). Consumers' acceptance of innovations in traditional cheese. A comparative study in France and Norway. *Appetite* 57, 110–120. doi:10.1016/j.appet.2011.04.009.
- Alves, M., Gonçalves, T., and Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control* 23, 363–368. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.033.
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A., (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Lett. Appl. Microbiol.* 30, 5–9. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00589.x>
- Ansorena, D., and Astiasarán, I. (2016). “Fermented Foods: Composition and Health effects,” in *Encyclopedia of Food and Health*, eds. B. Caballero, P. M. Finglas, and F. Toldrá (Oxford: Academic Press), 649–655. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00285-3.
- Aponte, M., Blaiotta, G., La Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., et al. (2012). Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology* 30, 8–16. doi:10.1016/j.fm.2011.10.005.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., et al. (2010). Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses. *Food Microbiol.* 27, 162–170. doi:10.1016/j.fm.2009.09.010.

- Argyri, A. A., Nisiotou, A. A., Mallouchos, A., Panagou, E. Z., and Tassou, C. C. (2014). Performance of two potential probiotic *Lactobacillus* strains from the olive microbiota as starters in the fermentation of heat shocked green olives. *Int. J. Food Microbiol.* 171, 68–76. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.003.
- Argyri, K., Doulgeraki, A. I., Manthou, E., Grounta, A., Argyri, A. A., Nychas, G.-J. E., et al. (2020). Microbial Diversity of Fermented Greek Table Olives of Halkidiki and Konservolia Varieties from Different Regions as Revealed by Metagenomic Analysis. *Microorganisms* 8, 1241. doi:10.3390/microorganisms8081241.
- Arroyo-López, F. N., Durán-Quintana, M. C., Ruiz-Barba, J. L., Querol, A., and Garrido-Fernández, A. (2006). Use of molecular methods for the identification of yeast associated with table olives. *Food Microbiology* 23, 791–796. doi:10.1016/j.fm.2006.02.008.
- Arroyo-López, F. N., Medina, E., Ruiz-Bellido, M. Á., Romero-Gil, V., Montes-Borrego, M., and Landa, B. B. (2016). Enhancement of the Knowledge on Fungal Communities in Directly Brined Aloreña de Málaga Green Olive Fermentations by Metabarcoding Analysis. *PLOS ONE* 11, e0163135. doi:10.1371/journal.pone.0163135.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology* 128, 189–196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018.
- Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., et al. (2012). Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology* 160, 42–49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003.
- Ayrapetyan, M., and Oliver, J. D. (2016). The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Food Science* 8, 127–133. doi:10.1016/j.cofs.2016.04.010.

## B

---

- Bagwell, C. E., Piceno, Y. M., Ashburne-Lucas, A., and Lovell, C. R. (1998). Physiological Diversity of the Rhizosphere Diazotroph Assemblages of Selected Salt Marsh Grasses. *Appl Environ Microbiol* 64, 4276–4282.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Videira, S. S., Boddey, L. H., and Baldani, V. L. D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384, 413–431. doi:10.1007/s11104-014-2186-6.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., Klopp, C., 2014. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics* 15, 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-293>
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food*

*Microbiology* 147, 89–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013.

- Bautista Gallego, J., Arroyo López, F. N., Romero Gil, V., Rodríguez Gómez, F., García García, P., and Garrido Fernández, A. (2011). Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology* 28, 1316–1325. doi:10.1016/j.fm.2011.06.002.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-López, F., Rantsiou, K., Jiménez-Díaz, R., Garrido Fernández, A., and Cocolin, L. (2013). Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International*. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.004.
- Bavaro, S. L., Susca, A., Frisvad, J. C., Tufariello, M., Chytiri, A., Perrone, G., et al. (2017). Isolation, Characterization, and Selection of Molds Associated to Fermented Black Table Olives. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01356.
- Beeck, M. O. D., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J., and Colpaert, J. V. (2014). Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies. *PLOS ONE* 9, e97629. doi:10.1371/journal.pone.0097629.
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., and Santos, A. (2017). The Biology of *Pichia membranifaciens* Killer Toxins. *Toxins* 9, 112. doi:10.3390/toxins9040112
- Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., et al. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. *Methods in Ecology and Evolution* 4, 914–919. doi:10.1111/2041-210X.12073.
- Benítez-Cabello, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., Rantsiou, K., Cocolin, L., Jiménez-Díaz, R., et al. (2016). RT-PCR–DGGE Analysis to Elucidate the Dominant Bacterial Species of Industrial Spanish-Style Green Table Olive Fermentations. *Front Microbiol* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01291.
- Bentzon-Tilia, M., Farnelid, H., Jürgens, K., and Riemann, L. (2014). Cultivation and isolation of N<sub>2</sub>-fixing bacteria from suboxic waters in the Baltic Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 88, 358–371. doi:10.1111/1574-6941.12304.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., and Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274. doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Bertuzzi, A.S., Walsh, A.M., Sheehan, J.J., Cotter, P.D., Crispie, F., McSweeney, P.L.H., Kilcawley, K.N., Rea, M.C., (2018). Omics-Based Insights into Flavor Development and Microbial Succession within Surface-Ripened Cheese. *mSystems* 3. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00211-17>

- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., and Sinigaglia, M. (2012). Selection of Yeasts as Starter Cultures for Table Olives: A Step-by-Step Procedure. *Front Microbiol* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00194.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Kirk, P. M., and Kausrud, H. (2013). ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources* 13, 218–224. doi:10.1111/1755-0998.12065.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Grieco, F., Ramires, F. A., Mita, G., et al. (2015). Physico-chemical characterization of natural fermentation process of Conservolea and Kalamàta table olives and development of a protocol for the pre-selection of fermentation starters. *Food Microbiology* 46, 368–382. doi:10.1016/j.fm.2014.08.021.
- Bleve, G., Tufariello, M., Durante, M., Perbellini, E., Ramires, F. A., Grieco, F., et al. (2014). Physico-chemical and microbiological characterization of spontaneous fermentation of Cellina di Nardò and Leccino table olives. *Front Microbiol* 5, 570. doi:10.3389/fmicb.2014.00570.
- Bokulich, N. A., and Mills, D. (2013). Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and environmental microbiology* 79. doi:10.1128/AEM.00934-13.
- Bonatsou, S., Benítez Cabello, A., Rodriguez-Gómez, F., Panagou, E., and Arroyo-López, F. (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in natural black table olive processing. *Food Microbiology* 46, 66–73. doi:10.1016/j.fm.2014.07.011.
- Bonnarme, P., Lapadatescu, C., Yvon, M., and Spinnler, H. E. (2001). L-methionine degradation potentialities of cheese-ripening microorganisms. *J. Dairy Res.* 68, 663–674. doi:10.1017/s002202990100509x.
- Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E., and Gatti, M. (2010). Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1676–1684. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04564.x.
- Boutrou, R., and Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 1–20. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.028.
- Brenes, M., and Castro, A. de (1998). Transformation of oleuropein and its hydrolysis products during Spanish-style green olive processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 353–358. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(199807)77:3<353::AID-JSFA50>3.0.CO;2-G.

## C

---

- Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., et al. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology* 54, 115–126. doi:10.1016/j.fm.2015.10.008.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S.

- P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869.
- Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Crémoux, R., et al. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 547–560. doi:10.1016/j.syapm.2007.05.004.
- Campus, M., Sedda, P., Cauli, E., Piras, F., Comunian, R., Paba, A., et al. (2015). Evaluation of a single strain starter culture, a selected inoculum enrichment, and natural microflora in the processing of Tonda di Cagliari natural table olives: Impact on chemical, microbiological, sensory and texture quality. *LWT - Food Science and Technology* 64, 671–677. doi:10.1016/j.lwt.2015.06.019.
- Capozzi, V., Di Toro, M. R., Grieco, F., Michelotti, V., Salma, M., Lamontanara, A., et al. (2016). Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* 59, 196–204. doi:10.1016/j.fm.2016.06.007.
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., and Spano, G. (2017). Spontaneous Food Fermentations and Potential Risks for Human Health. *Fermentation* 3, 49. doi:10.3390/fermentation3040049
- Caputo, V., Sacchi, G., and Lagoudakis, A. (2018). “Chapter 3 - Traditional Food Products and Consumer Choices: A Review,” in *Case Studies in the Traditional Food Sector* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition., eds. A. Cavicchi and C. Santini (Woodhead Publishing), 47–87. doi:10.1016/B978-0-08-101007-5.00004-X.
- Carbonnelle, É., and Nassif, X. (2011). Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l’identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Med Sci (Paris)* 27, 882–888. doi:10.1051/medsci/20112710017.
- Casaregola, S., Jacques, N., Louis-Mondesir, C., Coton, M., and Coton, E. (2013). *Citeromyces nyonsensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from black olive brine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3086–3090. doi:10.1099/ijms.0.049296-0.
- Ceugniet, A., Taminiau, B., Coucheney, F., Jacques, P., Delcenserie, V., Daube, G., et al. (2017). Use of a metagenetic approach to monitor the bacterial microbiota of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology* 247, 65–69. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.034.
- Chamba, J.-F., and Irlinger, F. (2004). “Secondary and Adjunct Cultures,” in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* General Aspects., eds. P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee (Academic Press), 191–206. doi:10.1016/S1874-558X(04)80068-X.
- Cheng, Z., Zhan, M., Yang, Z., Zumstein, K., Chen, H., and Huang, Q. (2017). The Major Qualitative Characteristics of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivated in Southwest China. *Front Plant Sci* 8. doi:10.3389/fpls.2017.00559.
- Chytiri, A., Tasioula-Margari, M., Bleve, G., Kontogianni, V. G., Kallimanis, A., and



- Kontominas, M. G. (2020). Effect of different inoculation strategies of selected yeast and LAB cultures on Conservolea and Kalamàta table olives considering phenol content, texture, and sensory attributes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100, 926–935. doi:10.1002/jsfa.10019.
- Chilton, S. N., Burton, J. P., and Reid, G. (2015). Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. *Nutrients* 7, 390–404. doi:10.3390/nu7010390.
- Ciafardini, G., and Zullo, B. A. (2019). Use of selected yeast starter cultures in industrial-scale processing of brined Taggiasca black table olives. *Food Microbiology* 84, 103250. doi:10.1016/j.fm.2019.103250.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., and Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology* 23, 60–67. doi:10.1016/j.fm.2005.01.009.
- Cocolin, L., Alessandria, V., Botta, C., Gorra, R., De Filippis, F., Ercolini, D., et al. (2013). NaOH-debittering induces changes in bacterial ecology during table olives fermentation. *PLoS ONE* 8, e69074. doi:10.1371/journal.pone.0069074.
- Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance) (2005). Available at: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/eng> [Accessed September 14, 2020].
- Comunian, R., Ferrocino, I., Paba, A., Daga, E., Campus, M., Di Salvo, R., et al. (2017). Evolution of microbiota during spontaneous and inoculated Tonda di Cagliari table olives fermentation and impact on sensory characteristics. *LWT* 84, 64–72. doi:10.1016/j.lwt.2017.05.039.
- Conte, P., Fadda, C., Del Caro, A., Urgeghe, P. P., and Piga, A. (2020). Table Olives: An Overview on Effects of Processing on Nutritional and Sensory Quality. *Foods* 9. doi:10.3390/foods9040514.
- Corsetti, A., Perpetuini, G., Schirone, M., Tofalo, R., and Suzzi, G. (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00248.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., and Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 130–135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016.
- Coton, M., Delbés-Paus, C., Irlinger, F., Desmasures, N., Le Fleche, A., Stahl, V., et al. (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiol.* 29, 88–98. doi:10.1016/j.fm.2011.08.020.
- Coton, M., Pawtowski, A., Taminau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., et al. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 93. doi:10.1093/femsec/fix048.
- Cramer, M. J., Haghshenas, N., Bagwell, C. E., Matsui, G. Y., and Lovell, C. R. (2011). *Celerinatantimonas diazotrophica* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium representing a new family in the Gammaproteobacteria, Celerinatantimonadaceae fam.

nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1053–1060. doi:10.1099/ijs.0.017905-0.

Crawford, L. M., Holstege, D. M., and Wang, S. C. (2018). High-throughput extraction method for phenolic compounds in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Food Composition and Analysis* 66, 136–144. doi:10.1016/j.jfca.2017.12.013

Crow, V. L., Coolbear, T., Gopal, P. K., Martley, F. G., McKay, L. L., and Riepe, H. (1995). The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal* 5, 855–875. doi:10.1016/0958-6946(95)00036-4.

---

## D

---

Dalmasso, A., Soto del Rio, M. de los D., Civera, T., Pattono, D., Cardazzo, B., and Bottero, M. T. (2016). Characterization of microbiota in Plaisentif cheese by high-throughput sequencing. *LWT - Food Science and Technology* 69, 490–496. doi:10.1016/j.lwt.2016.02.004.

Davis, K. E. R., Joseph, S. J., and Janssen, P. H. (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 826–834. doi:10.1128/AEM.71.2.826-834.2005.

De Angelis, M., Campanella, D., Cosmai, L., Summo, C., Rizzello, C. G., and Caponio, F. (2015). Microbiota and metabolome of un-started and started Greek-type fermentation of Bella di Cerignola table olives. *Food Microbiology* 52, 18–30. doi:10.1016/j.fm.2015.06.002.

De Bellis, P., Valerio, F., Sisto, A., Lonigro, S. L., and Lavermicocca, P. (2010). Probiotic table olives: microbial populations adhering on olive surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in an industrial plant. *Int. J. Food Microbiol.* 140, 6–13. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.024.

de Castro, A., Montañó, A., Casado, F.-J., Sánchez, A.-H., and Rejano, L. (2002). Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology* 19, 637–644. doi:10.1006/fmic.2002.0466.

de Castro, A., Sánchez, A. H., López-López, A., Cortés-Delgado, A., Medina, E., and Montañó, A. (2018). Microbiota and Metabolite Profiling of Spoiled Spanish-Style Green Table Olives. *Metabolites* 8. doi:10.3390/metabo8040073.

De Filippis, F., Parente, E., and Ercolini, D. (2018). Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. *Annu Rev Food Sci Technol* 9, 589–608. doi:10.1146/annurev-food-030117-012312.

de la Roza, C., Laca, A., García, L. A., and Díaz, M. (2003). Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry* 38, 1451–1456. doi:10.1016/S0032-9592(03)00026-8.

De Vero, L., Boniotti, M. B., Budroni, M., Buzzini, P., Cassanelli, S., Comunian, R., et al. (2019). Preservation, Characterization and Exploitation of Microbial Biodiversity: The Perspective of the Italian Network of Culture Collections. *Microorganisms* 7.

doi:10.3390/microorganisms7120685.

- Delcenserie, V., Taminiau, B., Delhalle, L., Nezer, C., Doyen, P., Crevecoeur, S., Roussey, D., Korsak, N., Daube, G., (2014). Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97, 6046–6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225>
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., and Ramírez, R. (2010). Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chemistry* 118, 182–189. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.081.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., Ramírez, R. (2011). Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME-GC-MS. *Food Chem* 129, 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.096>
- Demarigny, Y., Sabatier, C., Laurent, N., Prestoz, S., Rigobello, V., Blachier, M.-J., (2006). Microbial diversity in natural whey starters used to make traditional Rocamadour goat cheese and possible relationships with its bitterness. *Italian Journal of Food Science* 18, 261–276.
- Demarigny Y. and Gerber P. (2014). Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread. *Food and Nutrition Sciences* (2014). doi:10.4236/fns.2014.517181.
- Desmaures, N., Mangin, I., Corroler, D., and Guéguen, M. (1998). Characterization of lactococci isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 85, 999–1005. doi:10.1111/j.1365-2672.1998.tb05264.x.
- Devle, H., Vetti, I., Naess-Andresen, C. F., Rukke, E.-O., Vegarud, G., and Ekeberg, D. (2012). A comparative study of fatty acid profiles in ruminant and non-ruminant milk. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 1036–1043. doi:10.1002/ejlt.201100333.
- Di Cagno, R., Surico, R. F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., et al. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology* 127, 220–228. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.010.
- Didienne, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S., and Montel, M.-C. (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats (‘gerles’) in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 156, 91–101. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., and Cocolin, L. (2008). Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 392–399. doi:10.1016/j.fm.2007.09.006.
- Dols-Lafargue, M., Lonvaud-Funel, A. (2009). Polysaccharide Production by Grapes, Must, and Wine Microorganisms, in: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 241–258. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_13)
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G.-J. E., Tassou, C. C., and Panagou,

E. Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT - Food Science and Technology* 50, 353–356. doi:10.1016/j.lwt.2012.07.003.

Dugat-Bony, E., Straub, C., Teissandier, A., Onésime, D., Loux, V., Monnet, C., Irlinger, F., Landaud, S., Leclercq-Perlat, M.-N., Bento, P., Fraud, S., Gibrat, J.-F., Aubert, J., Fer, F., Guédon, E., Pons, N., Kennedy, S., Beckerich, J.-M., Swennen, D., Bonnarme, P., 2015. Overview of a Surface-Ripened Cheese Community Functioning by Meta-Omics Analyses. *PLOS ONE* 10, e0124360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124360>

Dziuba, B., Babuchowski, A., Nałęcz, D., and Niklewicz, M. (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. *International Dairy Journal* 17, 183–189. doi:10.1016/j.idairyj.2006.02.013.

---

## E

---

Edalatian, M.R., Najafi, M.B.H., Mortazavi, S.A., Alegría, Á., Nassiri, M.R., Bassami, M.R., Mayo, B. (2012). Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy Science & Technol.* 92, 75–90. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0045-2>

Edgar, R.C., 2013. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nat. Methods* 10, 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>

Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., and Coppola, S. (2008). Microbial diversity in Natural Whey Cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 124, 164–170. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.007.

Erkus, O., de Jager, V. C., Spus, M., van Alen-Boerrigter, I. J., van Rijswijck, I. M., Hazelwood, L., et al. (2013). Multifactorial diversity sustains microbial community stability. *The ISME Journal* 7, 2126–2136. doi:10.1038/ismej.2013.108.

Escobar-Zepeda, A., Sanchez-Flores, A., and Quirasco Baruch, M. (2016). Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology* 57, 116–127. doi:10.1016/j.fm.2016.02.004.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., et al. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. doi:10.1093/bioinformatics/btx791.

Eshkol, N., Sendovski, M., Bahalul, M., Katz-Ezov, T., Kashi, Y., and Fishman, A. (2009). Production of 2-phenylethanol from L-phenylalanine by a stress tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *J. Appl. Microbiol.* 106, 534–542. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04023.x.

---

## F

---

Fadda, M. E., Mossa, V., Pisano, M. B., Deplano, M., and Cosentino, S. (2004). Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *International Journal of Food Microbiology* 95, 51–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.02.001.

- Falentin, H., Henaff, N., Le Bivic, P., Deutsch, S.-M., Parayre, S., Richoux, R., et al. (2012). Reverse transcription quantitative PCR revealed persistency of thermophilic lactic acid bacteria metabolic activity until the end of the ripening of Emmental cheese. *Food Microbiol.* 29, 132–140. doi:10.1016/j.fm.2011.09.009.
- Fernandez, A. G., Adams, M. R., and Fernandez-Diez, M. J. (1997). *Table Olives: Production and processing*. Springer Science & Business Media.
- Filippis, F. D., Laiola, M., Blaiotta, G., and Ercolini, D. (2017). Different Amplicon Targets for Sequencing-Based Studies of Fungal Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 83. doi:10.1128/AEM.00905-17.
- Fox, P. F. (1993). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects*. 2nd ed. Springer US doi:10.1007/978-1-4615-2650-6.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., and McSweeney, P. L. H. (2017). “Microbiology of Cheese Ripening,” in *Fundamentals of Cheese Science*, eds. P. F. Fox, T. P. Guinee, T. M. Cogan, and P. L. H. McSweeney (Boston, MA: Springer US), 333–390. doi:10.1007/978-1-4899-7681-9\_11.
- Franco, W., Pérez-Díaz, I.M., Johanningsmeier, S.D., McFeeters, R.F., 2012. Characteristics of Spoilage-Associated Secondary Cucumber Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 78, 1273–1284. <https://doi.org/10.1128/AEM.06605-11>
- Franklin, R. B., Taylor, D. R., and Mills, A. L. (1999). Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Microbiol. Methods* 35, 225–235. doi:10.1016/s0167-7012(99)00003-2.
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., and Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast* 36, 129–141. doi:10.1002/yea.3368.

---

## G

---

- Gala, E., Landi, S., Solieri, L., Nocetti, M., Pulvirenti, A., and Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology* 125, 347–351. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.008.
- Gantzias, C., Lappa, I. K., Aerts, M., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Papadimitriou, K., et al. (2020). MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *International Journal of Food Microbiology* 323, 108586. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108586.
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science* 2, 106–117. doi:10.1016/j.cofs.2015.03.001.
- Gatti, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., and Mucchetti, G. (2014). Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *Journal of Dairy Science* 97, 573–591. doi:10.3168/jds.2013-7187.

- Ghabbour, N., Lamzira, Z., Thonart, P., Cidalia, P., Markaoui, M., and Asehraou, A. (2011). Selection of oleuropein-degrading lactic acid bacteria strains isolated from fermenting Moroccan green olives. *Grasas y Aceites* 62. doi:10.3989/gya.055510.
- Gillot, G., Jany, J.-L., Poirier, E., Maillard, M.-B., Debaets, S., Thierry, A., et al. (2017). Functional diversity within the *Penicillium roqueforti* species. *International Journal of Food Microbiology* 241, 141–150. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.001.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222. doi:10.1016/s0168-1605(03)00183-1.
- Giraffa, G., and Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 67, 19–34. doi:10.1016/S0168-1605(01)00445-7.
- Glass, N.L., Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol* 61, 1323–1330.
- Godon, J.-J., Delorme, C., Ehrlich, S. D., and Renault, P. (1992). Divergence of Genomic Sequences between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4045–4047.
- Golomb, B. L., Morales, V., Jung, A., Yau, B., Boundy-Mills, K. L., and Marco, M. L. (2013). Effects of pectinolytic yeast on the microbial composition and spoilage of olive fermentations. *Food Microbiol.* 33, 97–106. doi:10.1016/j.fm.2012.09.004.
- Gonzalez-Garcia, R. A., McCubbin, T., Navone, L., Stowers, C., Nielsen, L. K., and Marcellin, E. (2017). Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation* 3, 21. doi:10.3390/fermentation3020021.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Terrat, S., Dequiedt, S., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., et al. (2016). FT-IR spectroscopy: A powerful tool for studying the inter- and intraspecific biodiversity of cultivable non-Saccharomyces yeasts isolated from grape must. *Journal of Microbiological Methods* 121, 50–58. doi:10.1016/j.mimet.2015.12.009.
- Greppi, A., Ferrocino, I., La Storia, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., and Cocolin, L. (2015). Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology* 212, 67–75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.016.
- Guerrero, L., Guàrdia, M. D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., et al. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite* 52, 345–354. doi:10.1016/j.appet.2008.11.008.
- Guinebretiere, M.-H., and Nguyen-The, C. (2003). Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 207–215. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01060.x.

## H

---

- Haard, N. (1999). Fermented cereals: a global perspective. *undefined*. Available at: /paper/Fermented-cereals-%3A-a-global-perspective-Haard/8744d8c8a6da1ee4ff80c3cab3fcddc0d287c4ce [Accessed September 14, 2020].
- Harlé, O., Falentin, H., Niay, J., Valence, F., Courselaud, C., Chuat, V., Maillard, M.-B., Guédon, É., Deutsch, S.-M., Thierry, A. (2020). Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiology* 89, 103410. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103410>
- Heperkan, D. (2013). Microbiota of table olive fermentations and criteria of selection for their use as starters. *Front Microbiol* 4. doi:10.3389/fmicb.2013.00143.
- Hernandez, A., Martin, A., Aranda, E., Perez-Nevado, F., and Cordoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol.* 24, 346–351. doi:10.1016/j.fm.2006.07.022.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M., Benito, M., Aranda, E., and Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International journal of food microbiology* 121, 178–88. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044.
- Holzapfel, W. (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8, 241–258. doi:10.1016/S0956-7135(97)00017-0.
- Huang, C.-W., Walker, M. E., Fedrizzi, B., Gardner, R. C., and Jiranek, V. (2017). Hydrogen sulfide and its roles in *Saccharomyces cerevisiae* in a winemaking context. *FEMS Yeast Res* 17. doi:10.1093/femsyr/fox058.
- Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., and Rozès, N. (2008). Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738–744. doi:10.1016/j.foodres.2008.05.007.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2009). Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of Arbequina table olives. *Food Microbiology* 26, 827–833. doi:10.1016/j.fm.2009.05.010.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. (2012). Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology* 31, 1–8. doi:10.1016/j.fm.2012.01.006.
- Hutkins, R. W. (2008). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. John Wiley & Sons.
- Hwang, J., Kim, J., Moon, H., Yang, J., and Kim, M. (2017). Determination of sodium contents in traditional fermented foods in Korea. *Journal of Food Composition and Analysis* 56, 110–114. doi:10.1016/j.jfca.2016.11.013.
- Hymery, N., Vasseur, V., Coton, M., Mounier, J., Jany, J.-L., Barbier, G., et al. (2014). Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 437–456. doi:10.1111/1541-4337.12069.

---

## I

---

- Ianni, A., Bennato, F., Martino, C., Grotta, L., and Martino, G. (2020). Volatile Flavor Compounds in Cheese as Affected by Ruminant Diet. *Molecules (Basel, Switzerland)* 25. doi:10.3390/molecules25030461.
- Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., and Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiol Lett* 362, 1–11. doi:10.1093/femsle/fnu015.
- Irlinger, F., and Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 142–148. doi:10.1016/j.copbio.2009.02.016.

---

## J

---

- Jacques, N., Louis-Mondesir, C., Coton, M., Coton, E., and Casaregola, S. (2014). Two novel *Saccharomycopsis* species isolated from black olive brines and a tropical plant. Description of *Saccharomycopsis olivae* f. a., sp. nov. and *Saccharomycopsis guyanensis* f. a., sp. nov. Reassignment of *Candida amapae* to *Saccharomycopsis amapae* f. a., comb. nov., *Candida lassenensis* to *Saccharomycopsis lassenensis* f. a., comb. nov. and *Arthroascus babjevae* to *Saccharomycopsis babjevae* f. a., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2169–2175. doi:10.1099/ijs.0.060418-0.
- Johanningsmeier, S.D., Franco, W., Perez-Diaz, I., McFeeters, R.F. (2012). Influence of sodium chloride, pH, and lactic acid bacteria on anaerobic lactic acid utilization during fermented cucumber spoilage. *J. Food Sci.* 77, M397-404. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02780.x>
- Johnson, R. L., and Mitchell, A. E. (2018). Reducing Phenolics Related to Bitterness in Table Olives. *Journal of Food Quality* 2018, e3193185. doi:<https://doi.org/10.1155/2018/3193185>.

---

## K

---

- Kazou, M., Tzamourani, A., Panagou, E. Z., and Tsakalidou, E. (2020). Unraveling the Microbiota of Natural Black cv. Kalamata Fermented Olives through 16S and ITS Metataxonomic Analysis. *Microorganisms* 8, 672. doi:10.3390/microorganisms8050672.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
- Kiai, H., and Hafidi, A. (2014). Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation. *LWT - Food Science and Technology* 57, 663–670. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.011.
- Kim, B., Hong, V.M., Yang, J., Hyun, H., Im, J.J., Hwang, J., Yoon, S., Kim, J.E. (2016). A



Review of Fermented Foods with Beneficial Effects on Brain and Cognitive Function. *Prev Nutr Food Sci* 21, 297–309. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.297>

- Kim, M. J., Kwak, H. S., Jung, H. Y., and Kim, S. S. (2016). Microbial communities related to sensory attributes in Korean fermented soy bean paste (doenjang). *Food Research International* 89, 724–732. doi:10.1016/j.foodres.2016.09.032.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kergourlay, G., Taminiau, B., Daube, G., Champomier Vergès, M.-C. (2015). Metagenomic insights into the dynamics of microbial communities in food. *Int. J. Food Microbiol.* 213, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.010>
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., et al. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41, e1. doi:10.1093/nar/gks808.
- Knights, D., Kuczynski, J., Charlson, E.S., Zaneveld, J., Mozer, M.C., Collman, R.G., Bushman, F.D., Knight, R., Kelley, S.T. (2011). Bayesian community-wide culture-independent microbial source tracking. *Nat. Methods* 8, 761–763. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1650>
- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., and Knight, R. (2011). Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 10, Unit 10.7. doi:10.1002/0471250953.bi1007s36.
- Kupiec, B., and Revell, B. (1998). Speciality and artisanal cheeses today: the product and the consumer. *British Food Journal* 100, 236–243. doi:10.1108/00070709810221454.
- Kwon, D. Y. (2017). Ethnic foods and globalization. *Journal of Ethnic Foods* 4, 1–2. doi:10.1016/j.jef.2017.02.008.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73, 331–371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>

## L

- Lagier, J.C., Hugon, P., Khelaiifia, S., Fournier, P.E., La Scola, B., Raoult, D., 2015. The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* 28, 237–264. <https://doi.org/10.1128/cmr.00014-14>
- Lanza, B., 2013. Abnormal fermentations in table-olive processing: microbial origin and sensory evaluation. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00091>

- Lazzi, C., Povolo, M., Locci, F., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M. (2016). Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction? The case of Grana Padano. *International Journal of Food Microbiology* 233, 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.009>
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lecellier, A., Gaydou, V., Mounier, J., Hermet, A., Castrec, L., Barbier, G., et al. (2015). Implementation of an FTIR spectral library of 486 filamentous fungi strains for rapid identification of molds. *Food Microbiol.* 45, 126–134. doi:10.1016/j.fm.2014.01.002.
- Leclercq-Perlat, M.-N., Corrieu, G., and Spinnler, H.-E. (2007). Controlled production of camembert-type cheeses: Part III role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. *Journal of Dairy Research* 74, 218–225. doi:10.1017/S0022029906002329.
- Lefier, D., Lamprell, H., and Mazerolles, G. (2000). Evolution of Lactococcus strains during ripening in Brie cheese using Fourier transform infrared spectroscopy. *Lait* 80, 247–254. doi:10.1051/lait:2000123.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Maillard, M.-B., Valence, F., Coton, E., Thierry, A., 2019. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. *Food Chemistry* 301, 125260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>
- Li, Q., Chai, S., Li, Y., Huang, J., Luo, Y., Xiao, L., et al. (2018). Biochemical Components Associated With Microbial Community Shift During the Pile-Fermentation of Primary Dark Tea. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01509.
- Lindgren, Å., Karami, N., Karlsson, R., Åhrén, C., Welker, M., Moore, E.R.B., Stadler, L.S., 2018. Development of a rapid MALDI-TOF MS based epidemiological screening method using MRSA as a model organism. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 57–68. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3101-x>
- Llorente, P., Marquina, D., Santos, A., Peinado, J. M., and Spencer-Martins, I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl Environ Microbiol* 63, 1165–1167.
- Lohmann, C., Sabou, M., Moussaoui, W., Prévost, G., Delarbre, J.-M., Candolfi, E., et al. (2013). Comparison between the Biflex III-Biotyper and the Axima-SARAMIS Systems for Yeast Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 1231–1236. doi:10.1128/JCM.03268-12.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L. K., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology* 23, 341–350. doi:10.1016/j.fm.2005.05.001.
- Lortal, S., and Chapot-Chartier, M.-P. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15, 857–871.

doi:10.1016/j.idairyj.2004.08.024.

Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15, 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.

Lucena-Adrós, H., Caballero-Guerrero, B., Maldonado-Barragán, A., and Ruiz-Barba, J. L. (2014). Genetic diversity and dynamics of bacterial and yeast strains associated to Spanish-style green table-olive fermentations in large manufacturing companies. *International Journal of Food Microbiology* 190, 72–78. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.035.

Lucena-Adrós, H., Jiménez, E., Maldonado-Barragán, A., Rodríguez, J. M., and Ruiz-Barba, J. L. (2015). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity in Spanish-style green table-olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 205, 47–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.033.

Lucena-Adrós, H., and Ruiz-Barba, J. L. (2019). Microbial biogeography of Spanish-style green olive fermentations in the province of Seville, Spain. *Food Microbiology* 82, 259–268. doi:10.1016/j.fm.2019.02.004.

---

## M

---

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ* 3, e1420. doi:10.7717/peerj.1420.

Majcher, M.A., Myszka, K., Kubiak, J., Jeleń, H.H., 2014. Identification of key odorants of fried cottage cheese and contribution of *Galactomyces geotrichum* MK017 to the formation of 2-phenylethanol and related rose-like aroma compounds. *International Dairy Journal* 39, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.08.008>

Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., et al. (2019). Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Critical Reviews in Biotechnology* 39, 603–617. doi:10.1080/07388551.2019.1601679

Maoz, A., Mayr, R., and Scherer, S. (2003). Temporal Stability and Biodiversity of Two Complex Antilisterial Cheese-Ripening Microbial Consortia. *Appl Environ Microbiol* 69, 4012–4018. doi:10.1128/AEM.69.7.4012-4018.2003.

Marcó, M. B., Moineau, S., and Quiberoni, A. (2012). Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* 2, 149–158. doi:10.4161/bact.21868.

Marco, M.L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C.J., Cotter, P.D., Foligné, B., Gänzle, M., Kort, R., Pasin, G., Pihlanto, A., Smid, E.J., Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology, Food biotechnology • Plant biotechnology* 44, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., and Briandet, R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control* 22, 1357–1362. doi:10.1016/j.foodcont.2011.02.012.

- Marino, M., Innocente, N., Maifreni, M., Mounier, J., Cobo-Díaz, J. F., Coton, E., et al. (2017). Diversity within Italian Cheesemaking Brine-Associated Bacterial Communities Evidenced by Massive Parallel 16S rRNA Gene Tag Sequencing. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02119.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F. V., Marques, J. F., Peinado, J. M., and Spencer-Martins, I. (1992). Characterization of the yeast population in olive brines. *Letters in Applied Microbiology* 14, 279–283. doi:10.1111/j.1472-765X.1992.tb00705.x.
- Marquina, D., Santos, A., and Peinado, J. M. (2002). Biology of killer yeasts. *Int Microbiol* 5, 65–71. doi:10.1007/s10123-002-0066-z.
- Massouras, T., Pappa, E. C., and Mallatou, H. (2006). Headspace analysis of volatile flavour compounds of teleme cheese made from sheep and goat milk. *International Journal of Dairy Technology* 59, 250–256. doi:10.1111/j.1471-0307.2006.00268.x.
- Mataragas, M., Alessandria, V., Ferrocino, I., Rantsiou, K., and Cocolin, L. (2018). A bioinformatics pipeline integrating predictive metagenomics profiling for the analysis of 16S rDNA/rRNA sequencing data originated from foods. *Food Microbiol.* 76, 279–286. doi:10.1016/j.fm.2018.05.009.
- Mcfeeters, R. F. (2004). Fermentation Microorganisms and Flavor Changes in Fermented Foods. *Journal of Food Science* 69, FMS35–FMS37. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb17876.x.
- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2014). Waste Not, Want Not: Why Rarefying Microbiome Data Is Inadmissible. *PLOS Computational Biology* 10, e1003531. doi:10.1371/journal.pcbi.1003531.
- McSweeney, P. L. H., and Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293–324. doi:10.1051/lait:2000127.
- Medina, E., Brenes, M., García-García, P., Romero, C., and de Castro, A. (2018). Microbial ecology along the processing of Spanish olives darkened by oxidation. *Food Control* 86, 35–41. doi:10.1016/j.foodcont.2017.10.035.
- Medina, E., Gori, C., Servili, M., Castro, A. D., Romero, C., and Brenes, M. (2010). Main variables affecting the lactic acid fermentation of table olives. *International Journal of Food Science & Technology* 45, 1291–1296. doi:10.1111/j.1365-2621.2010.02274.x.
- Medina, E., Ruiz-Bellido, M. A., Romero-Gil, V., Rodríguez-Gómez, F., Montes-Borrego, M., Landa, B. B., et al. (2016). Assessment of the bacterial community in directly brined Aloreña de Málaga table olive fermentations by metagenetic analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 236, 47–55. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.014.
- Medina-Pradas, E., and Arroyo-López, F. N. (2015). Presence of toxic microbial metabolites in table olives. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00873.

- Medina-Pradas, E., Pérez-Díaz, I. M., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2017). “Chapter 9 - Review of Vegetable Fermentations With Particular Emphasis on Processing Modifications, Microbial Ecology, and Spoilage,” in *The Microbiological Quality of Food* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition., eds. A. Bevilacqua, M. R. Corbo, and M. Sinigaglia (Woodhead Publishing), 211–236. doi:10.1016/B978-0-08-100502-6.00012-1.
- Mo, L., Yu, J., Jin, H., Hou, Q., Yao, C., Ren, D., et al. (2019). Investigating the bacterial microbiota of traditional fermented dairy products using propidium monoazide with single-molecule real-time sequencing. *Journal of Dairy Science* 102, 3912–3923. doi:10.3168/jds.2018-15756.
- Monnet, C., Landaud, S., Bonnarne, P., and Swennen, D. (2015). Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–9. doi:10.1093/femsle/fnu025.
- Montaño, A., Sánchez, A. H., Casado, F. J., de Castro, A., and Rejano, L. (2003). Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry* 82, 297–302. doi:10.1016/S0308-8146(02)00593-9.
- Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177, 136–154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>
- Moro, E. (2016). The Mediterranean Diet from Ancel Keys to the UNESCO Cultural Heritage. A Pattern of Sustainable Development between Myth and Reality. *Procedia - Social and Behavioral Sciences* 223, 655–661. doi:10.1016/j.sbspro.2016.05.380.
- Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 213–229. doi:10.1016/s0168-1605(01)00709-7.
- Mounier, J., Coton, M., Irlinger, F., Landaud, S., and Bonnarne, P. (2017). “Chapter 38 - Smear-Ripened Cheeses,” in *Cheese (Fourth Edition)*, eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, and D. W. Everett (San Diego: Academic Press), 955–996. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00038-7.
- Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., et al. (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology* 101, 668–681. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02922.x.
- Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A., and Irlinger, F. (2009). Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 133, 31–37. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.020.

---

## N

- Nacef, M., Chevalier, M., Chollet, S., Drider, D., and Flahaut, C. (2017). MALDI-TOF mass

spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: The Maroilles. *International Journal of Food Microbiology* 247, 2–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005.

Naumann, D., Helm, D., and Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature* 351, 81–82. doi:10.1038/351081a0.

Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J. E., and Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black Conservolea olives in different brine solutions. *J. Appl. Microbiol.* 108, 396–405. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x.

Nychas, G.-J. E., Panagou, E. Z., Parker, M. L., Waldron, K. W., and Tassou, C. C. (2002). Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 173–177. doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01077.x.

---

## O

---

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., et al. (2013). *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version. 2.0-10. CRAN.

Oliveira, M., Brito, D., Catulo, L., Leitão, F., Gomes, L., Silva, S., Vilas-Boas, L., Peito, A., Fernandes, I., Gordo, F., Peres, C., (2004). Biotechnology of olive fermentation of 'Galega' Portuguese variety. *Grasas y Aceites* 55, 219–226. <https://doi.org/10.3989/gya.2004.v55.i3.169>

Ondov, B. D., Bergman, N. H., and Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics* 12, 385. doi:10.1186/1471-2105-12-385.

Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M., and Torre, P. (2003). PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiol Lett* 227, 271–277. doi:10.1016/S0378-1097(03)00691-8.

Ozdemir, Y., Guven, E., and Ozturk, A. (2014). Understanding the characteristics of oleuropein for table olive processing. *J. Food Process. Technol.* 5, 1–5.

---

## P

---

Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, C. Z. (2006). Effect of different brining treatments on the fermentation of cv. Conservolea green olives processed by the Spanish-method. *Food Microbiology* 23, 199–204. doi:10.1016/j.fm.2005.03.003.

Panagou, E. Z., and Tassou, C. C. (2006). Changes in volatile compounds and related biochemical profile during controlled fermentation of cv. Conservolea green olives. *Food Microbiology* 23, 738–746. doi:10.1016/j.fm.2006.02.005.

Panagou, E. Z., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., and Nychas, G.-J. E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food*

*Microbiology* 25, 348–358. doi:10.1016/j.fm.2007.10.005.

- Peres, C. M., Peres, C., and Xavier Malcata, F. (2017). “Chapter 22 - Role of Natural Fermented Olives in Health and Disease,” in *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, eds. J. Frias, C. Martinez-Villaluenga, and E. Peñas (Boston: Academic Press), 517–542. doi:10.1016/B978-0-12-802309-9.00022-4.
- Pereira, E. L., Ramalhosa, E., Borges, A., Pereira, J. A., and Baptista, P. (2015). YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives ( Negrinha de Freixo cv.). *Food Microbiology* 46, 582–586. doi:10.1016/j.fm.2014.10.003.
- Peruzy, M.F, Murru, N., Yu, Z., Kerkhof., P. -J. (2019). Assessment of microbial communities on freshly killed wild boar meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA amplicon sequencing. *International Journal of Food Microbiology* 301, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.005>
- Perras, A., Koskinen, K., Mora, M., Beck, M., Wink, L., and Moissl-Eichinger, C. (2018). Dead or Alive? Molecular life-dead distinction in human stool samples reveals significantly different composition of the microbial community. *bioRxiv*, 343194. doi:10.1101/343194.
- Pieniak, Z., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Guerrero, L., and Hersleth, M. (2009). Association between traditional food consumption and motives for food choice in six European countries. *Appetite* 53, 101–108. doi:10.1016/j.appet.2009.05.019.
- Pino, A., De Angelis, M., Todaro, A., Van Hoorde, K., Randazzo, C. L., and Caggia, C. (2018). Fermentation of Nocellara Etnea Table Olives by Functional Starter Cultures at Different Low Salt Concentrations. *Front. Microbiol.* 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01125
- Porru, C., Rodríguez-Gómez, F., Benítez-Cabello, A., Jiménez-Díaz, R., Zara, G., Budroni, M., et al. (2018). Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. *Food Microbiol.* 69, 33–42. doi:10.1016/j.fm.2017.07.010.
- Porter, T. M., and Golding, G. B. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? *New Phytol.* 192, 775–782. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x.
- Psani, M., and Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 1329–1336. doi:10.1007/s11274-006-9180-y.

---

## Q

- Quéro, L., Girard, V., Pawtowski, A., Tréguer, S., Weill, A., Arend, S., et al. (2019). Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. *Food Microbiol.* 81, 76–88. doi:10.1016/j.fm.2018.05.001.
- Quigley, L., O’Sullivan, D. J., Daly, D., O’Sullivan, O., Burdikova, Z., Vana, R., et al. (2016). Thermus and the Pink Discoloration Defect in Cheese. *mSystems* 1. doi:10.1128/mSystems.00023-16.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150, 81–94. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., and Cotter, P. D. (2012). High-Throughput Sequencing for Detection of Subpopulations of Bacteria Not Previously Associated with Artisanal Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5717–5723. doi:10.1128/AEM.00918-12.

---

## R

---

Ramírez, E., Brenes, M., García, P., Medina, E., and Romero, C. (2016). Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chemistry* 206, 204–209. doi:10.1016/j.foodchem.2016.03.061.

Randazzo, C. L., Todaro, A., Pino, A., Pitino, I., Corona, O., and Caggia, C. (2017). Microbiota and metabolome during controlled and spontaneous fermentation of Nocellara Etnea table olives. *Food Microbiol.* 65, 136–148. doi:10.1016/j.fm.2017.01.022.

Randazzo, C. L., Rajendram, R., and Caggia, C. (2010). “Chapter 41 - Lactic Acid Bacteria in Table Olive Fermentation,” in *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, eds. V. R. Preedy and R. R. Watson (San Diego: Academic Press), 369–376. doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00041-3.

Randazzo, C. L., Ribbera, A., Pitino, I., Romeo, F. V., and Caggia, C. (2012). Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology* 32, 87–96. doi:10.1016/j.fm.2012.04.013.

Randazzo, C. L., Vaughan, E. E., and Caggia, C. (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR–DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology* 109, 1–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.002.

Reller, L. B., Weinstein, M. P., and Petti, C. A. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin Infect Dis* 44, 1108–1114. doi:10.1086/512818.

Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C. L., Caggia, C., and Spagna, G. (2011). An alkaline  $\beta$ -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Res* 11, 487–493. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00738.x.

Rodríguez-Gómez, F., Ruiz-Bellido, M. Á., Romero-Gil, V., Benítez-Cabello, A., Garrido-Fernández, A., and Arroyo-López, F. N. (2017). Microbiological and Physicochemical Changes in Natural Green Heat-Shocked Aloreña de Málaga Table Olives. *Front Microbiol* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02209.

Romeo, F. V. (2012). Microbiological Aspects of Table Olives. *Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*. doi:10.5772/51479.



- Renye, J.A., Somkuti, G.A., Van Hekken, D.L., Guerrero Prieto, V.M. (2011). Short communication: Characterization of microflora in Mexican Chihuahua cheese. *Journal of Dairy Science* 94, 3311–3315. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4177>
- Ropars, J. (2020). “Yeasts and Molds: *Penicillium camemberti*☆,” in *Reference Module in Food Science* (Elsevier). doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.01091-X.
- Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S., and Dupont, J. (2012). A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International Journal of Food Microbiology* 155, 199–210. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.005.
- Ropars, J., Didiot, E., Vega, R. C. R. de la, Bennetot, B., Coton, M., Poirier, E., et al. (2020). Domestication of the emblematic white cheese-making fungus *Penicillium camemberti* and its diversification into two varieties. *bioRxiv*, 2020.02.12.945238. doi:10.1101/2020.02.12.945238.
- Rossetti, L., and Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods* 63, 135–144. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.001.
- Ruiz-Barba, J. L., Brenes-Balbuena, M., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., and Garrido-Fernández, A. (1993). Inhibition of *Lactobacillus plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 15–19. doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb02990.x.
- Ruggirello, M., Cocolin, L., Dolci, P. (2016). Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiol.* 59, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.001>
- Ruggirello, M., Dolci, P., Cocolin, L. (2014). Detection and viability of *Lactococcus lactis* throughout cheese ripening. *PLoS ONE* 9, e114280. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114280>

## S

---

- Safari, Z., Bruneau, A., Monnoye, M., Mariadassou, M., Philippe, C., Zatloukal, K., et al. (2020). Murine Genetic Background Overcomes Gut Microbiota Changes to Explain Metabolic Response to High-Fat Diet. *Nutrients* 12, 287. doi:10.3390/nu12020287.
- Salma, M., Rousseaux, S., Le Grand, A., Divol, B., and Alexandre, H. (2013). Characterization of the Viable but Nonculturable (VBNC) State in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* 8, e77600. doi:10.1371/journal.pone.0077600.
- Samelis, J., Bleicher, A., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Neuhaus, K., and Montel, M.-C. (2011). FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiology* 28, 76–83. doi:10.1016/j.fm.2010.08.009.
- Sánchez-Juanes, F., Teixeira-Martín, V., González-Buitrago, J. M., Velázquez, E., and Flores-Félix, J. D. (2020). Identification of Species and Subspecies of Lactic Acid Bacteria Present in Spanish Cheeses Type “Torta” by MALDI-TOF MS and pheS gene Analyses. *Microorganisms* 8, 301. doi:10.3390/microorganisms8020301.
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., and Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as

- a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology* 161, 168–175. doi:10.1016/j.resmic.2009.12.007.
- Sarhan, M.S., Hamza, M.A., Youssef, H.H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Nemr, R., Daanaa, H.-S.A., Mourad, E.F., Morsi, A.T., Abdelfadeel, M.R., Abbas, M.T., Fayez, M., Ruppel, S., Hegazi, N.A. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. *Journal of Advanced Research, Special Issue on Plant Microbiome* 19, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.002>
- Saulle, R., and La Torre, G. (2010). The Mediterranean Diet, recognized by UNESCO as a cultural heritage of humanity. *Italian Journal of Public Health* 7, 414–415. doi:10.2427/5700.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 6241–6246. doi:10.1073/pnas.1117018109.
- Schornsteiner, E., Mann, E., Bereuter, O., Wagner, M., Schmitz-Esser, S. (2014). Cultivation-independent analysis of microbial communities on Austrian raw milk hard cheese rinds. *International Journal of Food Microbiology* 180, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.010>
- Scintu, M. F., and Piredda, G. (2007). Typicity and biodiversity of goat and sheep milk products. *Small Ruminant Research* 68, 221–231. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.005.
- Selli, S., Kelebek, H., Kesen, S., and Sonmezdag, A. S. (2018). GC-MS olfactometric and LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of key odorants and phenolic compounds in black dry-salted olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98, 4104–4111. doi:10.1002/jsfa.8927.
- Septembre-Malaterre, A., Remize, F., and Poucheret, P. (2018). Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International* 104, 86–99. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.031.
- Singh, M. P. (2009). Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profiling of closely related fungi. *Journal of Microbiological Methods* 77, 102–108. doi:10.1016/j.mimet.2009.01.014.
- Smid, E. J., and Hugenholtz, J. (2010). Functional genomics for food fermentation processes. *Annu Rev Food Sci Technol* 1, 497–519. doi:10.1146/annurev.food.102308.124143.
- Smith, C.A., Want, E.J., O’Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>

Spano, G., and Capozzi, V. (2011). Food Microbial Biodiversity and “Microbes of Protected Origin.” *Front. Microbiol.* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00237.

Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8, 311–317. doi:10.1016/S0956-7135(97)00050-9.

Stuart, M. R., Chou, L. S., and Weimer, B. C. (1999). Influence of Carbohydrate Starvation and Arginine on Culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 665–673. doi:10.1128/AEM.65.2.665-673.1999.

---

## T

---

Tamang, J. P. (2010). Diversity of Fermented Beverages and Alcoholic Drinks. *Fermented Foods and Beverages of the World*. doi:10.1201/EBK1420094954-7.

Tamang, J. P., Cotter, P. D., Endo, A., Han, N. S., Kort, R., Liu, S. Q., et al. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 184–217. doi:10.1111/1541-4337.12520.

Tamang, J. P., Holzapfel, W. H., Shin, D. H., and Felis, G. E. (2017). Editorial: Microbiology of Ethnic Fermented Foods and Alcoholic Beverages of the World. *Front. Microbiol.* 8, 1377. doi:10.3389/fmicb.2017.01377.

Tamang, J. P., Shin, D.-H., Jung, S.-J., and Chae, S.-W. (2016a). Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00578.

Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016b). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00377.

Tassou, C. C., Panagou, E. Z., and Katsaboxakis, K. Z. (2002). Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology* 19, 605–615. doi:10.1006/fmic.2002.0480.

Thierry, A., Collins, Y. F., Abeijón Mukdsi, M. C., McSweeney, P. L. H., Wilkinson, M. G., and Spinnler, H. E. (2017). “Chapter 17 - Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese,” in *Cheese (Fourth Edition)*, eds. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, and D. W. Everett (San Diego: Academic Press), 423–444. doi:10.1016/B978-0-12-417012-4.00017-X.

Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Angelozzi, G., Suzzi, G., and Corsetti, A. (2012). Microbiological and chemical profiles of naturally fermented table olives and brines from different Italian cultivars. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 121–131. doi:10.1007/s10482-012-9719-x.

Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., and Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental

Samples. *PLOS ONE* 7, e40863. doi:10.1371/journal.pone.0040863.

Treimo, J., Vegarud, G., Langsrud, T., Rudi, K., 2006. Use of DNA quantification to measure growth and autolysis of *Lactococcus* and *Propionibacterium* spp. in mixed populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6174–6182. <https://doi.org/10.1128/AEM.00515-06>

Tufariello, M., Durante, M., Ramires, F. A., Grieco, F., Tommasi, L., Perbellini, E., et al. (2015). New process for production of fermented black table olives using selected autochthonous microbial resources. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01007.

---

## U - V

---

Urso, R., Comi, G., Cocolin, L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 671–680. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.012>

Vacheyrou, M., Normand, A.-C., Guyot, P., Cassagne, C., Piarroux, R., and Bouton, Y. (2011). Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *Int. J. Food Microbiol.* 146, 253–262. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033.

Van Hoorde, K., Vandamme, P., Huys, G., 2008. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dairy Science & Technology* 88, 445–455.

Vaughn, R. H., Stevenson, K. E., Davé, B. A., and Park, H. C. (1972). Fermenting Yeasts Associated with Softening and Gas-Pocket Formation in Olives. *Appl Microbiol* 23, 316–320.

Ventura, M., Canchaya, C., Meylan, V., Klaenhammer, T. R., and Zink, R. (2003). Analysis, Characterization, and Loci of the *tuf* Genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Species and Their Direct Application for Species Identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6908–6922. doi:10.1128/AEM.69.11.6908-6922.2003.

---

## W-Z

---

Wade, M.E., Strickland, M.T., Osborne, J.P., Edwards, C.G., 2019. Role of *Pediococcus* in winemaking. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 25, 7–24. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12366>

Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

Wenning, M., Seiler, H., and Scherer, S. (2002). Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4717–4721. doi:10.1128/AEM.68.10.4717-4721.2002.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). “38 - AMPLIFICATION AND DIRECT

SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS,” in PCR Protocols, eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (San Diego: Academic Press), 315–322. doi:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*, 2nd ed, Use R! Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>

Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4576–4579. doi:10.1073/pnas.87.12.4576.

Wolfe, B. E., Button, J. E., Santarelli, M., and Dutton, R. J. (2014). Cheese Rind Communities Provide Tractable Systems for In Situ and In Vitro Studies of Microbial Diversity. *Cell* 158, 422–433. doi:10.1016/j.cell.2014.05.041.

WOODS, D. R., and BEVAN, E. A. (1968). Studies on the Nature of the Killer Factor Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 51, 115–126. doi:10.1099/00221287-51-1-115.

Xu, Z., He, H., Zhang, S., Kong, J., 2017. Effects of inoculants *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus parafarraginis* on the fermentation characteristics and microbial communities of corn stover silage. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14052-1>

Zamora, R., Alaiz, M., and Hidalgo, F. J. (2001). Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive (*Olea europaea*) Fruit Protein Content, Composition, and Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4267–4270. doi:10.1021/jf0104634.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., et al. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782–2858. doi:10.1099/ijsem.0.004107.

Zinno, P., Guantario, B., Perozzi, G., Pastore, G., and Devirgiliis, C. (2017). Impact of NaCl reduction on lactic acid bacteria during fermentation of Nocellara del Belice table olives. *Food Microbiol.* 63, 239–247. doi:10.1016/j.fm.2016.



---

**Titre :** Étude de la diversité microbienne de produits fermentés traditionnels méditerranéens : olives de table et fromage de chèvre

**Mots clés :** diversité microbienne ; métagénétique ; fermentation naturelle ; fonctionnalités

**Résumé :** Les aliments fermentés artisanaux sont particulièrement appréciés des consommateurs pour leurs caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles, qui sont étroitement liées à l'action des micro-organismes intervenant pendant leur fabrication. L'objectif de cette thèse était d'étudier la diversité microbienne et son influence sur les caractéristiques biochimiques de deux produits méditerranéens artisanaux préparés par fermentation naturelle : le Pélardon, un fromage de chèvre au lait cru et les olives noires de Nyons. Les deux produits se sont révélés porteurs d'une grande diversité de micro-organismes (bactériens et fongiques). L'analyse de communautés microbiennes, par méthode culturale et métagénétique, corrélée aux changements biochimiques, a permis de mettre en évidence les micro-organismes clés impliqués dans les différentes étapes de fabrication.

Des divergences observées entre les deux méthodes ont aussi montré l'intérêt de les combiner pour élucider la diversité et la dynamique des communautés sans biais. Par ailleurs, les travaux menés sur l'origine des micro-organismes ont montré que l'environnement de production constituait un réservoir microbien important par rapport aux matières premières (lait cru et olives) lors de ces fermentations traditionnelles.

Enfin, une culture complexe de levures autochtones a été élaborée et mise en œuvre dans des fermentations dirigées d'olives de Nyons. Les résultats ont été prometteurs, surtout dans le cas d'une fermentation réalisée à un taux de sel réduit, soulignant l'intérêt de l'exploitation des micro-organismes autochtones sans compromettre la typicité et le savoir-faire associés au produit.

---

**Title :** Microbial diversity of traditional Mediterranean fermented foods : table olives and goat cheese

**Keywords :** microbial diversity ; metagenetics ; natural fermentation ; functionality

**Abstract :** Artisanal fermented foods are highly appreciated by consumers for their typical organoleptic and nutritional properties which depend on the metabolic activities of autochthonous microorganisms encountered during the fermentation process. This PhD project aimed at deciphering the microbial diversity and determining its impact on the final biochemical properties of two artisanal Mediterranean products: Pélardon, a raw goat milk cheese, and Nyons black table olives. Microbial communities were analyzed by a cultural approach and metagenetics and both products revealed rich fungal and bacterial diversity. By correlating microbial data with biochemical changes throughout the process, key species could be linked to the changes observed during the different fermentation stages for both products. Discrepancies were however observed between

the two approaches for both fermentations thus confirming the interest of combining both methods to comprehensively study microbial diversity and dynamics in an unbiased way. Microbial sources were also investigated and showed that the process environment constituted a major microbial reservoir compared to raw materials (raw milk and olive fruits) for these natural fermentations.

Finally, a tailor-made complex autochthonous yeast consortium was designed and used in directed fermentations of Nyons table olives. Promising results were obtained, especially for a salt-reduced fermentation. These results evidently highlighted the interest of exploiting autochthonous microorganisms without altering the typicity and know-how associated with artisanal fermented foods.