



Développement d'une méthode de quantification par PCR en temps-réel afin d'étudier la distribution de trois espèces de levures indigènes dans les fromages québécois

Mémoire

Andréanne Lamarche

Maîtrise en sciences et technologie des aliments - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Andréanne Lamarche, 2019

**Développement d'une méthode de
quantification par PCR en temps-réel afin
d'étudier la distribution de trois espèces de levures
indigènes dans les fromages québécois**

Mémoire

Andréanne Lamarche

Sous la direction de :
Steve Labrie

RÉSUMÉ

Les fromages de spécialités supportent un écosystème complexe regroupant des bactéries, des levures et des moisissures. Bien que des ferments d'acidification et des cultures d'affinage soient ajoutés lors du procédé de fabrication, plusieurs autres microorganismes peuvent s'y développer. Ainsi, les levures indigènes, naturellement présentes dans l'environnement laitier, pourraient contribuer de façon directe et/ou indirecte au développement des propriétés sensorielles (saveur, odeur, texture) des fromages. Une étude précédente a permis de caractériser la microflore des fromages québécois. Trois espèces de levures indigènes (*Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* et *Pichia kudriavzevii*) ont été détectées dans le lait cru et/ou dans les fromages de spécialité provenant de la province de Québec, mais leur prédominance et leur rôle n'avaient pas été déterminés.

Le but de ce projet était d'évaluer la distribution de ces trois espèces de levures indigènes dans les fromages de spécialités du Québec. Pour ce faire, une méthode spécifique et sensible utilisant la PCR quantitative en temps-réel a été développée afin de pouvoir détecter et quantifier ces trois espèces de levures. Par la suite, la croûte et la pâte de fromages québécois ont été analysées afin d'obtenir plus d'indices quant à la localisation de ces espèces dans les fromages et leur importance dans l'affinage de ceux-ci. Ce projet a permis de mettre en évidence que *C. jadinii* et *P. kudriavzevii* sont des levures fréquemment retrouvées dans la majorité des fromages de spécialités du Québec. Il serait donc intéressant d'approfondir leur impact au niveau de la production de composés aromatiques et d'analyser si le développement de nouveaux ferments qui contiendraient ces espèces serait bénéfique.

ABSTRACT

The complex fungal ecosystems of specialty cheeses are increasingly studied because of the potential contribution of indigenous yeasts to the development of the cheese's sensory properties. They may contribute directly or indirectly by their interaction with the fungal ecosystem or the modification of the cheese matrix. Previous studies detected *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* and *Pichia kudriavzevii* in both raw milk and/or artisanal specialty cheeses from the province of Québec.

The aim of this project was to analyze the distribution of these three yeast species in cheeses made in the province of Québec. A highly specific and quantitative real time PCR assay was developed to quantitate these yeast species. The rind and the core of cheeses made in the province of Québec were sampled and analyzed using this method. Tracking of *C. jadinii* and *P. kudravzevii* revealed that these yeasts are found within the majority of the analyzed cheeses. This study is the first step toward a better understanding of the possible contribution of these indigenous yeasts species in the development of cheese flavors, and their role in the cheese's fungal ecosystem.

Table des matières

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS	xi
AVANT-PROPOS.....	xii
INTRODUCTION.....	1
Section 1 : Revue de littérature	4
1.1 Fabrication fromagère	4
1.1.1 Matière première : le lait	4
1.1.2 Étapes de fabrication des fromages	5
1.1.2.1 La préparation du lait.....	6
1.1.2.2 Coagulation.....	8
1.1.2.3 L'égouttage et la synérèse	9
1.1.2.4 Le moulage et le salage.....	10
1.1.2.5 Affinage.....	11
1.2 Le fromage, un milieu propice à la croissance des microorganismes	12
1.2.1 Caractéristiques du milieu	12
1.2.2 Écosystèmes microbiens	13
1.2.3 Microflore indigène.....	15
1.2.3.1 Sources directes et indirectes des microorganismes de la microflore indigène	17
1.2.3.2 Dominance de la microflore indigène.....	18
1.3 Les levures indigènes	20
1.3.1 Caractéristiques générales	20
1.3.2 Importance des levures dans l'écosystème fromager	21
1.3.3 Distribution dans les fromages	22
1.3.3.1 Fromage à croûte fleurie.....	22
1.3.3.2 Fromage à croûte lavée	24
1.3.4 Caractérisation des fromages québécois.....	25
1.3.4.1 <i>Candida jadinii</i> (syn. <i>P. jadinii</i> , <i>S. jadinii</i> , <i>C. utilis</i>).....	26
1.3.4.2 <i>Kazachstania servazzii</i> (syn. <i>S. servazzii</i>).....	27

1.3.4.3	<i>P. kudriavzevii</i> (syn. <i>I. orientalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>S. krusei</i>)	27
1.3.5	Participation des levures dans le développement de la flaveur	28
1.3.5.1	<i>Protéolyse</i>	29
1.3.5.2	<i>Lipolyse</i>	30
1.3.5.3	<i>Production de composés volatils</i>	31
1.4	Méthodes de caractérisation de la microflore naturelle	33
1.4.1	Méthode culture-dépendante.....	33
1.4.2	Méthode culture-indépendante	35
1.4.2.1	<i>Amorces non spécifiques à l'espèce</i>	36
1.4.2.2	<i>Amorces spécifiques à l'espèce</i>	38
Section 2	Problématique, hypothèses et objectifs	41
	Problématique.....	42
	Hypothèses.....	42
	Objectif général	42
	Objectifs spécifiques.....	42
Section 3	43
	Détection par PCR en temps-réel (qPCR) de trois espèces de levures indigènes dans les fromages de spécialités canadiens	43
	RÉSUMÉ	43
	Quantitative PCR (qPCR) reveals the frequency and distribution of three indigenous yeast species across a range of specialty cheeses.....	45
	ABSTRACT	46
	INTRODUCTION.....	48
	MATERIALS AND METHODS	52
	RESULTS.....	56
	DISCUSSION	59
	CONCLUSION	63
	TABLES AND FIGURES	64
	Conclusion générale et perspective	77
	Bibliographie	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principaux constituants du lait et leur proportion moyenne dans 100 g de lait. Adapté de Guinee et O'Brien (2010).	4
Tableau 2. Classification des fromages en fonction de leur humidité. Adapté de Codex Alimentarius (2016).	10
Tableau 3. Caractéristiques physiologiques de certaines levures ayant la capacité de croître dans les produits laitiers.	20
Tableau 4. Caractéristiques physiologiques de <i>C. jadinii</i> , <i>K. servazzii</i> et <i>P. kudriavzevii</i> (Kurtzman 2011b).	26
Tableau 5. Composés aromatiques produits spécifiquement par <i>D. hansenii</i> et <i>Y. lipolytica</i> (Sørensen et al. 2011).	32

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Schéma de production d'un fromage à croûte fleurie de type Camembert ou Brie. Les étapes et les paramètres intervenant dans la coagulation, l'égouttage et l'affinage ont été regroupés. Adaptée de Sousa (2003). 6
- Figure 2.** Présence de gradients entre l'intérieur et l'extérieur du fromage. Adaptée de M.-N. Leclercq-Perlat et al. (1999). 15
- Figure 3.** Recensement des genres de levures et de moisissures retrouvés dans les fromages provenant de plusieurs études. CD : culture-dépendant, CI : culture-indépendant, M : molle, SF : semi-ferme, B : bleu. Adaptée d'Irlinger et al. (2015). 16
- Figure 4.** Biofilms développés à la surface d'un fromage à croûte fleurie (à gauche) et à croûte lavée (à droite). Sous le biofilm, la pâte du fromage est indiquée par le mot Curd. Adaptée de Wolfe et al. (2014). 22
- Figure 5.** Les comptes de levures totales et de LAB sont présentés en fonction de la section du fromage qui a été prélevé, soit la surface (graphiques du haut) ou le centre (graphiques du bas) et en fonction de la saison, été et hiver. Adaptée de Viljoen, Khoury et Hattingh (2003). 24
- Figure 6.** Voies métaboliques menant à la formation de composés volatils aromatiques : (a) protéolyse (b) lipolyse et (c) métabolisme du lactose, lactate et citrate. Traduit et adaptée de McSweeney et Sousa (2000). 29
- Figure 7.** La méthode DGGE a été utilisée avec les amplicons obtenus à la suite d'une PCR avec les amorces ciblant la région D1/D2. Les colonnes C1L1, C10L1, C3L2 représentent des échantillons de fromages, WL2, WL1 de lactosérum et BL1, BL2 de saumure. Les espèces reliées aux différentes bandes sont CP, *C. pararugosa*; CZ, *C. zeylanoides*; YP, *Y. lipolytica*; GG, *G. geotrichum*; DH, *D. hansenii*; KL, *K. lactis*; TO, *Trichosporon ovoides*. Tirée de Šuranská et al. (2016). 37
- Figure 8.** Principe de la technologie de détection par qPCR avec des sondes fluorescentes hydrolytique TaqMan. La première étape est la dénaturation de l'ADN (a) suivie de l'appariement des amorces et de la sonde (b) et finalement l'élongation entraîne l'hydrolyse de la sonde lors de la polymérisation de l'ADN (c). Tirée de Poitras et Houde (2002). 40

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
A_w	Activité de l'eau
CCIL	Centre canadien d'information laitière
CMP	Caséinomacropeptique
HR	Humidité relative
ITS	Espaceurs internes transcrits (<i>Internal transcribed spacers</i>)
LAB	Bactéries lactiques (<i>Lactic acid bacteria</i>)
LMA	Laboratoire de mycologie alimentaire
MG	Matière grasse
NaCl	Chlorure de sodium
NSLAB	Bactéries lactiques autres que les ferments lactiques (<i>Non-starter LAB</i>)
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase (<i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	Réaction PCR en temps-réel
SE	Erreur type (Standard error)
TEFD	Pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé
UFC	Unité formatrice de colonie (<i>colony forming unit, CFU</i>)

À Antoine,

Pour m'avoir accompagné dans cette aventure, t'y être laissé emporter et pour tes précieux conseils.

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements sont adressés à mon directeur de maîtrise, Monsieur Steve Labrie. J'ai bénéficié de ses conseils judicieux, de sa grande expérience et de ses corrections minutieuses. Merci, Steve, pour m'avoir communiqué ton sens de la rigueur, ta passion et de m'avoir permis de participer à des activités de perfectionnement dans le domaine. Le congrès de la FIL à Dublin était une très belle expérience !

Je tiens à exprimer ma gratitude envers l'aide précieuse de Marie-Hélène Lessard et de Catherine Viel, nos professionnelles de recherche. Vos compétences complémentaires m'ont grandement aidée tout au long de mon cheminement. Sans votre accompagnement, vos commentaires constructifs et votre bonne humeur, je n'y serais pas arrivée! Je remercie également l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de Mycologie Alimentaire. Ariane, Stéphanie, Annick et Julien, ce fut toujours un plaisir d'être à vos côtés!

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements envers les autres membres du jury d'évaluation soit Daniel St-Gelais et Éric Dugat-Bony.

Un merci tout spécial à Nathalie Filion de Yannick Fromagerie. Je garde de très beaux souvenirs de nos rencontres. Merci d'avoir partagé ta passion avec moi. Merci pour ton professionnalisme, ton souci du détail et ta patience.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à la Commission Canadienne du lait ainsi qu'à Novalait pour m'avoir soutenu financièrement durant deux années de même qu'au Conseil de la transformation alimentaire du Québec (CTAQ) et la Fondation Initia pour leur bourse Agro : Inno. Je tiens finalement à remercier les partenaires financiers qui ont cru en les retombés de ce projet pour les fromagers du Québec, soit le Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentaire du Québec (MAPAQ), Novalait, le Consortium de recherche et d'innovation en bioprocédés industriels du Québec (CRIBIQ) et le Fonds de recherche du Québec, Nature et Technologies (FRQNT).

AVANT-PROPOS

Le troisième chapitre de ce mémoire est consacré à un article qui sera prochainement soumis à la revue *Journal of Dairy Science*. Conformément aux règles de cette revue, l'article a été rédigé en anglais. Ce dernier met de l'avant les résultats obtenus lors de cette maîtrise.

Les coauteurs de l'article sont Steve Labrie, actuel directeur de recherche, ainsi que Marie-Hélène Lessard, professionnelle de recherche dans le laboratoire de mycologie alimentaire (LMA) et Catherine Viel anciennement professionnelle de recherche. Steve et Marie-Hélène sont tous deux membres de l'Institut sur la nutrition et les aliments fonctionnels (INAF), du Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA) et du Département des sciences des aliments à l'Université Laval. Daniel St-Gelais et Sylvie Turgeon ont aussi été impliqués dans le financement du projet ainsi que dans la rédaction de cet article. Dr St-Gelais et Dr Turgeon sont membres de l'INAF et du STELA. Dr St-Gelais est chercheur pour Agriculture et Agroalimentaire Canada.

L'étudiante a été la principale auteure de cet article puisqu'elle a réalisé les expérimentations, rédigé l'ensemble des parties et apporté les corrections des coauteurs.

INTRODUCTION

La filière canadienne est régie par un système de gestion de l'offre. Le Canada est l'un des seuls pays au monde à déterminer sa production laitière bovine en fonction de la consommation (de l'ensemble des produits laitiers) de ses habitants. Les producteurs achètent des quotas qui les autorisent à produire un certain volume de lait exprimé en kilogramme de matière grasse. Ce système a des répercussions sur l'ensemble du secteur, de la production à la transformation, car il détermine le prix du lait en assurant une juste rétribution aux producteurs. Cet engagement national limite par ailleurs ses échanges internationaux, c'est-à-dire qu'il limite les entrées et les sorties de produits laitiers sur son territoire (Heminthavong, 2015). La prise en compte de ce système de gestion de l'offre est essentielle à la compréhension du secteur de la transformation laitière canadienne.

Sur la scène internationale, le Canada se démarque par la qualité de son lait, et ce, avec un rendement annuel d'environ 10 292 kg de lait par vache (Agriculture et Agroalimentaire Canada-DIA 2016). Par contre, le Canada n'est pas compétitif en ce qui a trait au volume de lait produit étant donné que la production canadienne dépend de la consommation de produits laitiers à l'intérieur du pays (Heminthavong 2015). La qualité du lait est visée plutôt qu'uniquement la quantité. Au 1^{er} décembre 2015, le Canada comptait 11 450 fermes laitières produisant un total d'environ 82 millions d'hectolitres. Le Québec se démarque des autres provinces non seulement par son nombre important de fermes laitières, mais aussi par ses 190 usines de transformation laitières sur 478 à l'échelle du Canada (Centre canadien d'information laitière 2017). À lui seul, le Québec produit près de la moitié de la production canadienne de fromage soit 234 632 t sur un total de 497 280 t (Centre canadien d'information laitière 2018a).

C'est au milieu des années 80 que la consommation de fromages fins a dépassé celle du cheddar, qui était jusqu'à lors le principal fromage consommé (Statistique Canada et CANSIM 2016). Depuis, l'offre s'est diversifiée bien que la consommation de Cheddar reste importante. En 2017, le Canada a produit 124 590 t de fromages de spécialités (excluant Cheddar, Mozzarella, fromage cottage, fromage à la crème et à pizza)

comparativement à 162 355 t pour le Cheddar. Les pâtes fermes et semi-fermes comptent pour 76,19 % des fromages consommés, les pâtes molles représentent 16,59 % (Centre canadien d'information laitière 2018c).

Au Québec, les consommateurs estiment que la qualité des fromages fins est la même que celles des fromages importés. Ils les associent à des fromages non industriels et plus typiques (Groupe AGECO 2006). Les fromages québécois se classent parmi les finalistes de concours internationaux et commencent à être reconnus mondialement pour leur typicité. Le Camembert l'Extra, produit par Agropur, a d'ailleurs remporté le World Championship Cheese Contest de Madison (Agropur Coopérative laitière 2018). Malgré tout, les fromagers du Québec ont encore d'importants défis à relever, notamment celui d'offrir aux détaillants un produit de qualité organoleptique constante. Certains consommateurs perçoivent le manque de stabilité dans le goût et l'odeur qu'ils associent le plus souvent à des défauts de fabrication ou de mauvaises conditions d'entreposage (Groupe AGECO 2006). Les microorganismes des fromages étant à l'origine de ces variations sensorielles, il est primordial de contrôler et de mieux comprendre l'écosystème fromager afin d'offrir aux consommateurs un produit de qualité constante. L'amélioration de la qualité sensorielle des fromages serait bénéfique aussi bien aux producteurs et transformateurs, qu'aux consommateurs.

La transformation du lait en fromage nécessite l'utilisation de ferments lactiques (bactéries) et de ferments d'affinage (selon le type de fromage). L'écosystème microbien des fromages de spécialité fait l'objet d'un nombre croissant d'études scientifiques en raison de sa complexité. Bien que des ferments soient ajoutés lors du procédé de fabrication, plusieurs autres microorganismes peuvent s'y développer. Ces microorganismes indigènes ont plusieurs origines, provenant de l'environnement de la ferme et de la fromagerie. Ainsi, les levures indigènes, naturellement présentes dans l'environnement laitier, se retrouvent dans les fromages et pourraient contribuer de façon directe et/ou indirecte au développement des propriétés sensorielles (saveur, odeur, texture) des fromages. Cette étude constitue un premier pas vers une meilleure compréhension des rôles joués par trois espèces de levures (*Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* et *Pichia kudriavzevii*) dans l'écosystème

microbien. L'analyse des quantités relatives de ces levures par rapport aux ferments permettrait de mieux cibler l'influence de ces levures sur la flaveur des produits.

Section 1 : Revue de littérature

1.1 Fabrication fromagère

1.1.1 Matière première : le lait

Une multitude de fromages est produite à travers le monde. Le Répertoire des fromages canadiens compte plus de 1 050 variétés différentes (Centre canadien d'information laitière 2018b). Et ils ont tous été développés à partir d'un même ingrédient : le lait. Le Codex Alimentarius définit le fromage comme suit : produit obtenu à la suite d'une série d'étapes où la concentration en protéines du lait est supérieure à celle des ingrédients de départ (Codex Alimentarius 2016). Le lait est composé d'eau, de protéines, de matière grasse, de lactose et de minéraux (Guinee et O'Brien 2010) (Tableau 1).

Tableau 1. Principaux constituants du lait et leur proportion moyenne dans 100 g de lait. Adapté de Guinee et O'Brien (2010).

Constituant	Composition moyenne (%)
Eau	87,96
Matière grasse	3,55
Lactose	4,42
Protéines totales	3,25
Caséines	2,51
Protéines sériques	0,54
Azote non protéique	0,01
Minéraux	0,74
Autres (vitamines, gaz dissous, enzymes)	Traces

Les caractéristiques physico-chimiques ainsi que les taux de matière grasse, de protéines et de minéraux dans le lait varient en fonction des mammifères (Park et al. 2007). Le degré d'hydratation des micelles de caséines, la proportion des caséines regroupées sous la forme de micelles et leur minéralisation diffèrent également. La composition du lait varie aussi à l'intérieur même d'une espèce (teneur en lactose, en protéines, en minéraux) selon les races

(Côté 2016). Par exemple, les quantités des différentes caséines ont varié entre les races Canadienne, Suisse Brune, Jersey et Holstein (Côté 2016).

Les protéines laitières sont divisées en deux groupes : les caséines ($\approx 80\%$ des protéines) et les protéines sériques (Tableau 1). Les protéines sériques se trouvent à l'état soluble dans le lait tout comme le lactose, tandis que les caséines sont en suspension colloïdale, regroupées sous forme de micelles. Les caséines sont responsables de la formation d'un coagulum lors de la fabrication du fromage (acide ou présure) et se divisent en cinq types (α_{s1} , α_{s2} , β , κ , γ) ayant chacune leurs propriétés (résidus de phosphosérine, glucide, nombre de ponts disulfures possibles, poids moléculaires) et leurs concentrations spécifiques. Par exemple, les caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ ont la capacité de se lier au calcium grâce aux résidus de phosphosérine. Leur capacité diffère cependant, car elles ont respectivement 8, 10-13, 5 et 1 résidus de phosphosérine par mole de caséines (Guinee et O'Brien 2010). Elles sont liées entre elles par des interactions de faibles intensités (liaisons hydrophobes, hydrogènes, électrostatiques) (P.F. Fox et Brodkorb 2008; Lucey 2004). En comparaison, la caséine κ est peu sensible aux concentrations de calcium dans le lait puisqu'elle n'a qu'un seul résidu de phosphosérine. Par contre, elle possède un groupement glucidique hydrophile qui permet de stabiliser les caséines sous la forme de micelles (Guinee et O'Brien 2010). Les micelles sont soumises à une répulsion stérique, à une répulsion ionique et à une couche d'hydratation qui les éloignent les unes des autres (P.F. Fox et Brodkorb 2008). L'organisation des caséines dans le lait fait l'objet de plusieurs modèles (Walstra 1990, 1999; David S. Horne 2006; De Kruif et al. 2012) qui ne seront pas détaillés dans le cadre de ce mémoire.

1.1.2 Étapes de fabrication des fromages

Dans le cadre de ce travail, l'accent sera mis sur les fromages à croûte fleurie et lavée. Un schéma de fabrication d'un fromage à pâte molle à croûte fleurie est présenté à la figure 1 (Sousa 2003). Sa fabrication suit les étapes suivantes; la préparation du lait, la coagulation, l'égouttage, le salage et l'affinage. La diversité des produits retrouvés sur le marché découle de la modification de différents paramètres (ex. ferments, temps de coagulation,

taille des grains, etc.). Les fromagers et industriels sélectionnent les leviers technologiques nécessaires pour fabriquer des fromages ayant les qualités désirées (Montserrat et Mietton 2014).

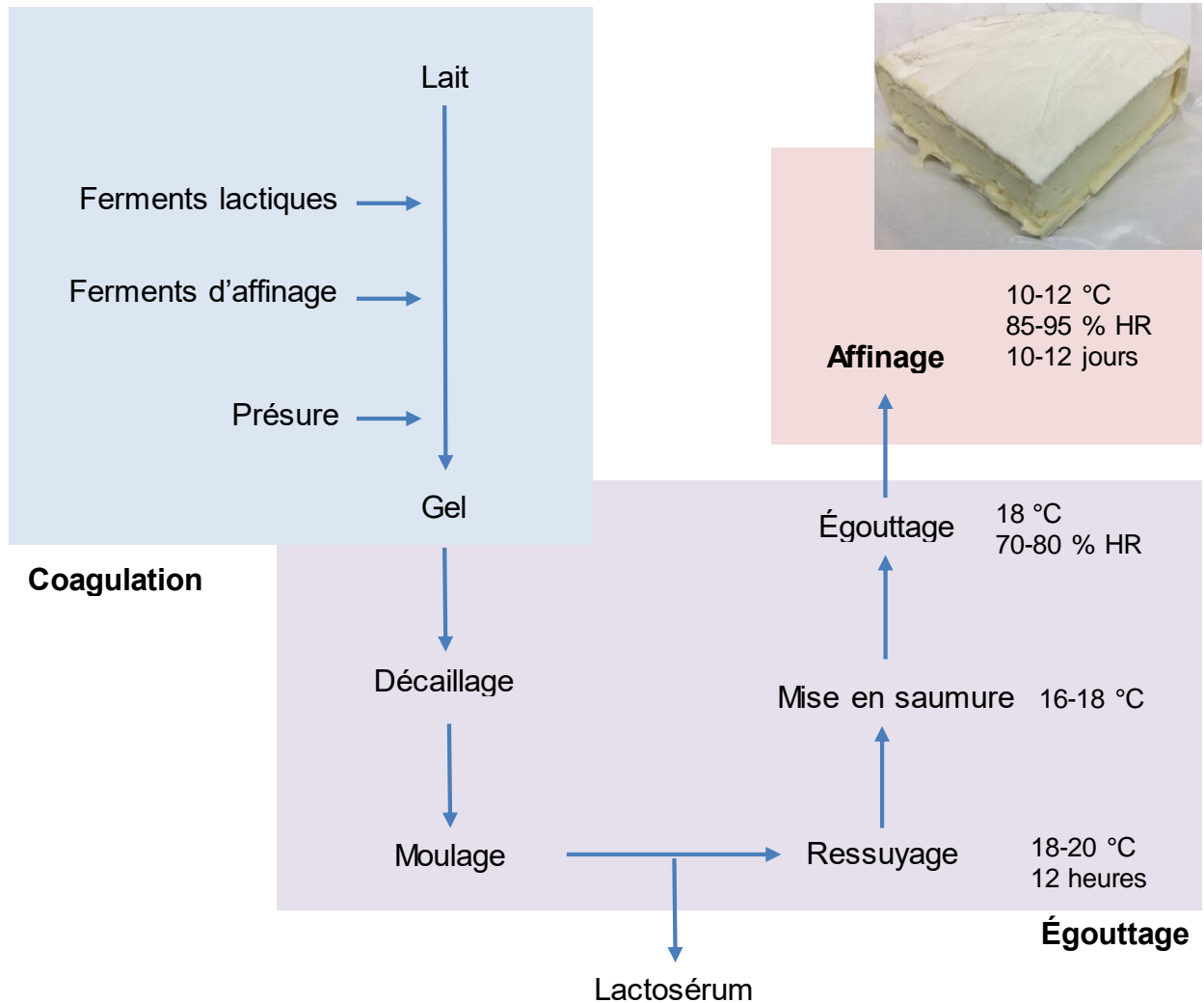


Figure 1. Schéma de production d'un fromage à croûte fleurie de type Camembert ou Brie. Les étapes et les paramètres intervenant dans la coagulation, l'égouttage et l'affinage ont été regroupés. Adaptée de Sousa (2003).

1.1.2.1 La préparation du lait

La préparation du lait inclut généralement une étape de traitement thermique. La pasteurisation a pour objectif la destruction des microorganismes pathogènes, sous forme

végétative, tels que *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 et *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* et la réduction des bactéries non pathogènes (P.F. Fox et Cogan 2004; Bazinet, Pouliot, et Castaigne 2010; Meunier-Goddik et Sandra 2011). Elle s'effectue selon un couple temps-température, c'est-à-dire que le lait doit être chauffé durant un temps déterminé à une température précise. La durée de vie du produit est ainsi améliorée, car la microflore résiduelle (les bactéries mésophiles et psychrophiles et leurs enzymes thermosensibles par exemple) est réduite (Quigley et al., 2013b; Grappin et Beuvier, 1997). Le traitement thermique peut se faire en *batch*, appelé *LTLT* (*low-temperature, long time*) ou en continu (*HTST; high temperature, short-time*) (Meunier-Goddik et Sandra 2011). De manière générale, les petites fromageries utilisent plutôt la pasteurisation en batch, par exemple, le lait atteint une température de 63 °C durant 30 min (Meunier-Goddik et Sandra 2011). Celles qui le font en continu à l'aide d'un pasteurisateur à plaques utilisent des températures plus élevées, par exemple 72 °C durant 15 s ou 100 °C durant 0,01 s. Le traitement de pasteurisation entraîne aussi la dénaturation partielle des protéines sériques du lait, modifie l'aptitude du lait à coaguler et facilite le développement des ferments en réduisant la compétition microbienne. Par contre, la pasteurisation active ou inactive certaines molécules comme des molécules antimicrobiennes présentes dans le lait ce qui influence le milieu dans lequel les ferments se développent (Grappin et Beuvier 1997).

D'autres possibilités, telles que la thermisation et l'utilisation d'un lait n'ayant reçu aucun traitement thermique de départ (lait cru), peuvent être utilisées en fromagerie. Le lait thermisé est un lait non pasteurisé qui a été chauffé selon un couple temps-température moindre que celui de la pasteurisation comme 60 °C durant 30 minutes (Rukke, Sørhaug, et Stepaniak 2011). Ces deux méthodes sont habituellement couplées à d'autres barrières microbiologiques afin de diminuer les risques de contamination et de toxi-infection. Ces barrières peuvent être intrinsèques au produit (faible pH, une A_w moindre ou une microflore compétitive) ou extrinsèques (temps de conservation plus long en fromagerie ou hausse du temps cuisson du caillé) (Fox et Cogan 2004; Donnelly 2004). La microflore indigène du lait sera abordée dans la section 1.3.

1.1.2.2 Coagulation

La coagulation marque le passage de la forme liquide du lait à la formation d'un réseau tridimensionnel appelé gel (Beresford et Williams 2004). Les caillés mixtes sont obtenus par une combinaison de l'action de l'enzyme coagulante et de l'acidité générée par les ferments lactiques. Les ferments lactiques sont ajoutés après le traitement thermique du lait lorsque celui-ci est encore chaud (non refroidit à 4 °C). Les micelles de caséines sont soumises à une répulsion stérique causée par la partie C-terminale des caséines- κ (partie hydrophile) (Dejmek et Walstra 2004). L'hydrolyse de la partie hydrophile par des enzymes protéolytiques permet le rapprochement des micelles de caséines et diminue leur degré d'hydratation (Dejmek et Walstra 2004). La coagulation par voie enzymatique peut se faire à l'aide d'enzymes d'origine animale (ruminant et monogastrique), microbienne (bactérie, levure, moisissure) ou végétale. Celles-ci diffèrent au niveau de leur spécificité et de leur stabilité. La présure de ruminants contient principalement de la chymosine et un peu de pepsine. Le mécanisme d'action de la chymosine est très spécifique. Celle-ci permet d'hydrolyser la caséine- κ entre les acides aminés Phe₁₀₅ et Met₁₀₆ et de former un composé hydrophobe nommé paracaséine- κ et un composé hydrophile, le caséinomacropeptique (CMP). Le détachement du CMP déstabilise les micelles de caséines, les rendant insolubles (Horne et Banks 2004). Des enzymes moins spécifiques comme les protéases microbiennes de *Rhizomucor miehei* peuvent aussi être utilisées. Ces protéases peuvent entraîner un gel moins ferme, des pertes dans le lactosérum et des rendements moindres. Le rapprochement des micelles causé par la perte du CMP amène la formation d'un gel (interactions hydrophobes) (Horne et Banks 2004).

En plus de l'effet des coagulants, les bactéries lactiques permettent la coagulation partielle ou complète des protéines (Beresford et Williams 2004). Les bactéries utilisées, qui sont nommées ferments mésophiles ou thermophiles, consomment le lactose et le métabolisent en acide lactique. Elles sont sélectionnées en fonction de leur capacité à réduire le pH du lait par la production d'acide (microflore désirée). En six heures, elles doivent être en mesure d'abaisser le pH sous 5,3 à une température variant entre 30 et 37 °C (T. Beresford et Williams 2004). Lors d'une étude sur les capacités fermentaires des bactéries lactiques,

il a été démontré que, parmi plus de 2 000 isolats, seulement 8 % des lactocoques et 2 % des lactobacilles étaient capables d'atteindre ce pH optimal (Cogan et al. 1997). La fermentation réalisée par les bactéries lactiques crée une diminution du pH ce qui engendre une diminution des forces de répulsion entre les micelles de caséines (chargées négativement), ainsi qu'une dissolution du phosphate de calcium (Hickey et al. 2015). Cet abaissement de pH est nécessaire à la formation du gel lactique ou mixte. Le fromager choisit les espèces bactériennes les plus appropriées pour le type de fromage qu'il désire obtenir. *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc* sp. sont ajoutés au procédé de fabrication de la majorité des types de fromages. D'autres espèces comme *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lb. helveticus* font aussi partie des LAB ajoutés comme ferments lactiques en fonction des variétés de fromage produites (Parente et Cogan 2004). L'utilisation plus ou moins importante des enzymes coagulantes et des ferments lactiques a des répercussions sur la minéralisation du gel, sa contractilité, sa friabilité, sa perméabilité et sa structure micellaire (Lucey 2004; Horne et Banks 2004).

1.1.2.3 L'égouttage et la synérèse

Après la coagulation du lait, de façon conjointe, le phénomène de synérèse et les traitements mécaniques permettent de concentrer les protéines en éliminant le lactosérum du gel. Le gel sera d'abord décaillé, c'est-à-dire qu'il sera coupé en cubes. En raison de l'accroissement de la surface de contact, plus les cubes seront fins, plus le caillé sera sec (Whitehead et Harkness 1954). Au niveau microscopique, la coagulation du lait a pour conséquence la réorganisation des protéines, notamment des micelles de paracaséines. Cette réorganisation est à la base de la synérèse qui est l'expulsion du lactosérum. Celle-ci est liée à la baisse du degré d'hydratation des micelles de paracaséines et au rétrécissement des cubes de caillé (favorisé par la baisse de pH et une température supérieure à 30 °C) (Dejmek et Walstra 2004). En plus du décaillage, le brassage, le lavage du caillé et l'augmentation de la température (cuisson) permettent un égouttage plus important (Janhøj et Qvist 2010). L'emmental est d'ailleurs un exemple de fromage dont les grains sont chauffés jusqu'à une température de 52-53 °C puis le caillé est pressé pour compléter

l'égouttage. Le moulage, le salage et le pressage sont aussi des éléments qui influencent l'humidité du fromage (section 1.1.2.4).

Les fromages peuvent être classés selon leur teneur en eau (Groupe AGEFO 2006; Montserrat et Mietton 2014). Selon Codex Alimentarius, un fromage à pâte molle correspond à un fromage dont le pourcentage de la teneur en eau du fromage dégraissé est supérieure à 67 % (Tableau 3) (Codex Alimentarius 2016).

Tableau 2. Classification des fromages en fonction de leur humidité. Adapté de Codex Alimentarius (2016).

TEFD (%) *	Classification
< 51	Pâte extra dure
49-56	Pâte dure
54-69	Pâte ferme/semi-ferme
> 67	Pâte molle

*TEFD : Pourcentage de la teneur en eau dans le fromage dégraissé.

1.1.2.4 Le moulage et le salage

Les grains de caillé sont ensuite mis en moules pour une durée déterminée et peuvent être pressés pour compléter l'égouttage (Janhøj et Qvist 2010). Le salage du caillé peut se faire dans la masse, comme pour le Cheddar (Lawrence et al. 2004) en surface ou en saumure (Law et Tamime 2010). Le temps de saumurage varie en fonction de la quantité de sel désirée dans le produit final ainsi qu'en fonction de la taille du fromage. Un fromage plus petit aura un temps de saumurage plus court (Brennan et al. 2004). Le fromage peut aussi être salé en saumure puis en surface durant l'affinage (Brennan et al. 2004). Le sel a pour rôle d'influencer le développement des microorganismes et l'activité enzymatique, de favoriser la synérèse (diminution de l'humidité du caillé), de modifier l'organisation des protéines (Guinee et Fox 2004) et les caractéristiques aromatiques du produit (Delahunty et Drake 2004). Le pH du fromage est ainsi affecté par le biais de l'influence du sel sur la fermentation des microorganismes. Ces derniers ont des seuils d'inhibition, c'est-à-dire,

d'arrêt de croissance, et de résistance qui leurs sont propres. D'ailleurs, l'activité des ferments lactiques est affectée par un taux de NaCl supérieur à 1,5 % (Guinee et Fox 2004). À l'opposé, *Penicillium roqueforti* résiste à des taux de 20-25 % de sel.

1.1.2.5 Affinage

Une fois le moule retiré, le fromage peut être consommé tout de suite (non affiné), après quelques semaines pour les pâtes molles et après plusieurs mois pour les pâtes fermes. Le Parmesan est un exemple de fromage affiné pour un minimum de 12 mois (Gobbetti 2004). La durée de l'affinage est un moyen de modifier les qualités sensorielles du produit final. Il peut être affiné par l'action de microorganismes d'affinage tels que des bactéries, des moisissures et des levures. Les microorganismes ajoutés pour l'affinage sont nommés ferments d'affinage.

L'affinage des fromages à croûte fleurie et celui des fromages à croûte lavée est complexe puisqu'une microflore diversifiée s'y développe comprenant des bactéries, des levures et des moisissures (Spinnler et Gripon 2004; Bockelmann 2011). Les fromages à croûte fleurie sont identifiables par leur couche de mycélium blanc, composé de *Penicillium camemberti*, à leur surface (Spinnler et Gripon 2004). Un exemple typique est le Camembert (Spinnler et Gripon 2004). Généralement, des saveurs de noisettes et de champignons sont présentes (Lamontagne et al. 2010). Dans le cas des fromages à croûte lavée, le fromage est frotté avec une solution saline (saumure) pouvant contenir des microorganismes d'affinage. Ce type de fromage a une surface lisse pouvant prendre plusieurs teintes allant de jaune paille à orange foncé. Des exemples français typiques seraient le Comté et le Livarot (Brennan et al. 2004). Le développement des microorganismes durant l'affinage de ces types de fromages sera décrit plus en détail dans les sections qui suivent. Les microorganismes d'affinage représentent des leviers importants mis à la disposition des fromagers puisque l'orientation et le contrôle de la microflore d'affinage déterminent les qualités sensorielles des fromages.

1.2 Le fromage, un milieu propice à la croissance des microorganismes

1.2.1 Caractéristiques du milieu

Le lait représente un milieu propice au développement des microorganismes en raison des nutriments qu'il contient (Tableau 1). Les hydrates de carbone tels que le lactose (principal sucre du lait), ainsi que le glucose et le galactose (monosaccharides composant le lactose) supportent le développement des microorganismes (Deák 1991; Beresford et al. 2001). Ces nutriments sont aussi présents dans les différents fromages, mais la quantité varie selon le temps d'affinage et selon le type de produit. Dans certains cas, le lactose peut être consommé complètement en 12 heures par les bactéries lactiques (métabolisé en acide lactique). Pour les fromages frais, 1-2 % de lactose résiduel peut être observé (McSweeney 2011). Dans le cas du Camembert, 10 jours suffisent pour que l'ensemble du lactose soit consommé en surface tandis que cela prend environ 20 jours pour le centre du fromage (Leclercq-Perlat et al. 2004). En plus des hydrates de carbone, les produits laitiers fournissent aux microorganismes de l'azote organique (acides aminés et urée) et des acides gras libres (Deák 1991; Büchl et Seiler 2011). Ces derniers leur sont accessibles grâce aux enzymes protéolytiques et lipolytiques extracellulaires qu'ils fabriquent (Roostita et Fleet 1996a; McSweeney 2011). La présence de ces nutriments fait des produits laitiers un substrat idéal pour la croissance des bactéries, des levures et des moisissures.

De nombreuses études, de plus en plus spécifiques, ont porté sur la caractérisation de la microflore des différents produits laitiers : le lait, le beurre, le babeurre, le yogourt, la crème glacée, la crème sure et divers types de fromage. Ces études ont permis de répertorier une grande diversité de microorganismes (Fleet, Graham et Mian 1987; Fleet 1990; Lopandic et al. 2006; Büchl et Seiler 2011). Une seconde vague d'études a porté sur l'effet de cette diversité sur la typicité fromagère. Elles ont cherché à établir des liens entre la microflore et le développement de la saveur et de la texture des fromages (Lavoie et al. 2012; Panelli et al. 2014; Atanassova et al. 2016).

1.2.2 Écosystèmes microbiens

Non seulement les microorganismes sont présents dans les produits laitiers, mais leurs activités sont essentielles à la fabrication des fromages. Les bactéries, levures et moisissures interagissent entre elles et forment un écosystème complexe (Fleet 1990; Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001). Cet écosystème est formé d'une diversité d'espèces dont les proportions changent tout au long de la fabrication soit du traitement thermique à la fin de l'affinage des fromages (Beresford et Williams 2004; Bokulich et Mills 2013). La croissance de certaines peut être favorisée par l'activité métabolique des autres membres de l'écosystème (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Chamba et Irlinger 2004; Mounier et al. 2008). Dans les fromages où la croûte est dominée par des bactéries, la remontée du pH par les levures apparaît comme étant un prérequis fondamental à l'affinage des fromages. Au départ, les levures se développent grâce à leur capacité à croître en milieu acide et riche en sels (croûte des fromages salés en surface). Une remontée du pH est observée dû au métabolisme du lactate et à la dégradation des acides aminés par les levures (McSweeney 2011). Le catabolisme de la matière azotée mène à la formation d'ammoniac par la désamination oxydative, ce qui contribue à rendre le pH de la croûte plus proche de la neutralité (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001). La vitesse d'alcalinisation de la croûte varie en fonction de la taille du fromage et de son pourcentage d'humidité (Büchl et Seiler 2011). Pour le Taleggio (pâte molle, croûte fleurie), le pH est passé 5,2 à 6,5 lors de la période de maturation (Gobbetti et al. 1997). Cette remontée permet à d'autres microorganismes dont *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium* sp. et d'*Arthrobacter* sp. de se développer étant donné que ces bactéries sont acido-sensibles (Purko, Nelson, et Wood 1951; Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Büchl et Seiler 2011). Pour le Limburger, c'est l'atteinte d'un pH minimal de 5,85 qui permet à *B. linens* de commencer à croître (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001). Pour les fromages à croûte fleurie se sont *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti* qui favorisent la croissance des bactéries (Spinnler et Gripon 2004). L'alcalinisation de la croûte contribue aussi à la texture et à la flaveur des fromages (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Ferreira 2003) puisqu'elle permet d'atteindre une zone de pH compatible avec les activités métaboliques de certaines espèces de bactéries. Les protéinases des corynébactéries, des microcoques et des levures ont habituellement un pH

optimal qui se situe entre 6,0 et 7,0 (Reps 1993). L'assouplissement de la pâte est relié à la digestion enzymatique du réseau protéique du fromage (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001).

En plus de l'influence du pH, une compétition pour les nutriments limitants de même que la production de bactériocines peuvent aussi interférer avec la croissance des microorganismes (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Beresford et Williams 2004). Les paramètres d'affinage tels que la température, l'humidité relative et la durée de l'affinage influenceront l'écosystème. La manipulation des fromages, notamment l'action de frotter ceux-ci avec une solution saline a aussi des impacts sur les populations microbiennes (Brennan et al. 2004). Par exemple, dans le cas des croûtes lavées, ce frottage ralentit la croissance des moisissures, au profit des bactéries et levures, en plus d'uniformiser leur développement et de réduire le risque de croissance des contaminants (Brennan et al. 2004; Bockelmann 2011). La signature d'un fromage, son unicité, pourrait être expliquée par la diversité et le dynamisme de cette communauté de microorganismes se développant naturellement (Irlinger et al. 2015).

L'évolution des populations microbiennes est liée aux changements de l'environnement chimique du lait et du fromage. En effet, les nutriments disponibles, la température, les équilibres salins et l'activité de l'eau affectent la croissance et le développement des espèces microbiennes (Chamba et Irlinger 2004; Beresford et Williams 2004). Ces facteurs abiotiques auraient plus d'impacts sur les populations que les facteurs biotiques tels que l'ajout d'un microorganisme (Wolfe et al. 2014). Par conséquent, le dynamisme au sein des communautés microbiennes diffère entre les fromageries, les types de fromage et les fromages d'une même variété (Montel et al. 2014). Des gradients sont aussi présents à l'intérieur d'un fromage et influencent les communautés microbiennes (Fig. 2).



Figure 2. Présence de gradients entre l'intérieur et l'extérieur du fromage. Adaptée de M.-N. Leclercq-Perlat et al. (1999).

1.2.3 Microflore indigène

Une diversité de microorganismes est retrouvée dans le lait et le fromage. C'est d'ailleurs le sujet de plusieurs articles et revues de la littérature dont celui de Montel et al. (2014) qui recensent plus de 400 espèces réparties dans 100 genres microbiens au niveau du lait. D'autres études se concentrent davantage sur la microflore des fromages, soit au niveau de la croûte, de la pâte ou d'une section du fromage. Plus de 100 genres bactériens, 21 moisissures et 18 levures ont été répertoriés à travers 33 études de croûte de fromages (Irlinger et al. 2015). La figure 3 met en évidence la diversité des genres de levures et de moisissures retrouvés dans les fromages à croûte lavée et fleurie. Parmi ces microorganismes, plusieurs font partie de la microflore indigène. Autrement dit, ces microorganismes proviennent de l'environnement (non délibérément inoculées) et se retrouvent dans le lait et les fromages. Une recherche d'envergure où 137 croûtes de fromages (lait cru ou pasteurisé) provenant des États-Unis et de l'Europe ont été analysées a montré que la microflore indigène représentait au moins 60 % des bactéries et 25 % des mycètes retrouvés (Wolfe et al. 2014).

types de fromages. Ces études ont montré que leur croissance crée un profil aromatique plus complexe (Montel et al. 2014) et certaines espèces ont le potentiel d’agir en tant que probiotique (Beresford et Williams 2004).

1.2.3.1 Sources directes et indirectes des microorganismes de la microflore indigène

L’origine des microorganismes indigènes est diverse. Le lait à l’intérieur du pis d’un mammifère en bonne santé est stérile. Par contre, dès qu’il entre en contact avec l’environnement extérieur il se contamine (Beresford et Williams 2004; Montel et al. 2014). À la ferme, plusieurs réservoirs microbiens sont présents. Les trayons de l’animal sont l’une des sources potentielles d’ensemencement du lait, car une microflore indigène est localisée à la surface de la peau de l’animal (Frétin et al., 2018). En effet, les trayons peuvent aussi avoir été contaminés par la litière sous l’animal (paille, sable, excréments), par les mains des travailleurs et par le matériel utilisé pour la préparation et durant la traite (lingette, savons, trayeuse). D’autres réservoirs d’ensemencement sont présents dans les fermes tels que l’air de l’étable, la ration alimentaire (foin, ensilage, grains et supplément), la tuyauterie et le réservoir de lait (Verdier-Metz et al. 2009; Vacheyrou et al. 2011; Montel et al. 2014; Quigley et al. 2013). Une étude menée auprès de 16 fermes situées en Franche-Comté a montré que des levures et moisissures étaient présentes à la fois dans le lait, à la surface des trayons, dans l’air de l’étable, dans l’alimentation et dans la poussière (Vacheyrou et al. 2011). Des levures ont été isolées de tous ces réservoirs. Au niveau des bactéries, plus de 60 % des espèces retrouvées dans la litière n’ont pas été retrouvées dans le lait (Vacheyrou et al. 2011). Il a aussi été démontré que les microorganismes varient en espèce et en nombre en fonction de la ferme (Verdier-Metz et al. 2009) et du type d’animal (vache, chèvre, brebis) (Quigley et al. 2013).

Une diversité de microorganismes se retrouve aussi dans les usines de transformation et influence la microflore des fromages. D’ailleurs, des différences qualitatives et quantitatives sont observées entre l’été et l’hiver pour une même usine (Viljoen, Khoury, et Hattingh 2003), ainsi qu’entre les usines, même si des fromages similaires sont produits

(Antonsson, Ardö, et Molin 2001; Mounier et al. 2005). Autrement dit, tous les Reblochon, même s'ils sont produits de la même façon, n'auront pas une microflore identique.

De plus, dans le cas où les fromages produits sont différents, les étapes du procédé de fabrication ont une influence sur la sélection des microflores. Par exemple, le temps de réfrigération a aussi un impact quantitatif et qualitatif sur les espèces retrouvées dans le lait cru et pasteurisé. Les lactocoques et streptocoques sont les principaux genres bactériens dominant en début de réfrigération, tandis que les bactéries psychrophiles prennent le dessus après 24 heures (Li et al. 2016). Autrement dit, l'utilisation d'un lait ayant été réfrigéré plus longtemps sera différente d'un point de vue microbiologique qu'un lait frais. Toutefois, des espèces similaires d'un point de vue génétique se retrouvent lors de la comparaison des écosystèmes de différentes usines. Somme toute, les deux étapes où les espèces diffèrent largement sont la coagulation (formation du gel) et l'affinage, probablement en raison de l'acidité formée pour la première et de la haute teneur en sel pour la seconde (Bokulich et Mills 2013). Une plus grande diversité est retrouvée dans les fromages fabriqués plus tard en journée comparativement à ceux fabriqués le matin (O'Sullivan et al. 2015). Des bactéries d'origine marine sont souvent retrouvées dans les fromages à croûte lavée, probablement à cause de leur tolérance à des concentrations élevées en sel (Feurer, Irlinger, et al. 2004).

1.2.3.2 Dominance de la microflore indigène

Des microorganismes indigènes sont présents autant à l'intérieur que sur la croûte des fromages. En revanche, la microflore présente sur la croûte des fromages serait plus complexe que celle comprise dans la pâte. D'ailleurs, les ferments d'affinage ne réussissent pas à dominer la microflore indigène présente à la surface des fromages et dans les salles d'affinage (Bokulich et Mills 2013). Le contact de la croûte avec l'environnement de la fromagerie expliquerait cette particularité (Montserrat et Mietton 2014). Le traitement thermique du lait est un autre élément influençant la présence de microorganismes indigènes. En effet, la pasteurisation favorise l'établissement des ferments au détriment des

NSLAB, ce qui augmente la probabilité de retrouver les ferments lactiques en grand nombre (Van Hoorde et al. 2010).

La microflore des fromages à croûte lavée est composée principalement de bactéries et de levures indigènes. Une étude portant sur ce type de fromage a montré que *B. linens*, communément appelé ferment du rouge, disparaissait après 21 jours d'affinage, malgré un lavage répété en utilisant une solution saline contenant ce ferment d'affinage. Ce sont plutôt des bactéries indigènes (bactéries à Gram négatif et des *Glutamicibacter* sp.) qui réussissent à se développer, et ce plus rapidement que le ferment du rouge (Feurer, Vallaeys, et al. 2004). Autrement dit, les ferments d'affinage ne s'implantent pas ou se développent très peu dans des fromages à croûte lavée de type Gubbeen, Livarot et Limburger (Mounier et al. 2005; Larpin-Laborde et al. 2011; Cogan et al. 2014). Le même constat a aussi été observé pour des fromages allemands (Mounier et al. 2005; Goerges et al. 2008), danois (Petersen, Westall, et Jespersen 2002) et irlandais (Durrus, Millens, Gubbeen et Ardahan). Par exemple, différentes espèces du genre *Brevibacterium* ont été inoculées dans les fromages irlandais, mais aucune n'a été isolée en milieu d'affinage. *D. hansenii* a été la levure dominante retrouvée dans ces quatre fromages irlandais, tandis que pour les bactéries les espèces identifiées variaient d'un fromage à l'autre (Mounier et al. 2005).

Le traitement thermique du lait semble aussi influencer la distribution des microorganismes. Certaines bactéries réussissent à se faire dominantes lorsque les fromages sont fabriqués avec un lait pasteurisé (dominance *Glutamicibacter arilaitensis*), tandis que les différentes bactéries semblent être distribuées plus également lorsque du lait cru est utilisé (Feurer, Irlinger, et al. 2004). Les ferments d'affinage joueraient donc un rôle mineur dans l'écosystème fromager durant la période d'affinage. Bokulich et Mills (2013) avancent que cette microflore indigène présente dans l'environnement de la fromagerie fait compétition aux ferments d'affinage, et ce, malgré les cycles de nettoyage et d'assainissement. Pour résumer, ces études démontrent que la microflore indigène des fromages à croûte lavée est diversifiée et qu'elle occupe une place importante dans l'écosystème fromager. Ainsi, les microorganismes dominants durant l'affinage des

fromages ne correspondent pas nécessairement aux microorganismes ajoutés comme ferments. Ces résultats confirment l'importance des microorganismes de la microflore indigène dans le processus d'affinage des fromages (Mounier et al. 2005).

1.3 Les levures indigènes

1.3.1 Caractéristiques générales

Les levures sont des microorganismes eucaryotes unicellulaires qui se reproduisent surtout de façon asexuée par fission binaire ou bourgeonnement (Fleet 2011). Bien qu'elles soient majoritairement retrouvées sous forme planctonique ou isolée, certaines espèces peuvent se présenter sous forme de filaments tels que des hyphes ou des pseudohyphes. Les levures sont retrouvées dans de multiples biotopes (sol, plante, animal, eau douce, eau salée) notamment en raison de leur principal vecteur, les insectes (Deák 1991). Leur origine dans les produits laitiers est diverse (section 1.3) et leur croissance est possible grâce à de nombreuses adaptations physiologiques. Bien qu'une grande variabilité existe entre les genres et les espèces, de manière générale les levures ont la capacité de croître à une A_w faible et dans un large spectre de températures, de pH et de concentrations en sel (Tableau 3).

Tableau 3. Caractéristiques physiologiques de certaines levures ayant la capacité de croître dans les produits laitiers.

Espèces	Temp. Écart °C	Écart pH	Max. NaCl (% w/v)	Min. A_w
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0-37	2,5-9,0	12-24	0,81-0,91
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1-47	2,5-8,0	10	0,96
<i>Pichia membranifaciens</i>	5-30	2,5-7,5	5-12	0,84-0,93
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5-37	2,0-8,0	10-12	0,85-0,89

Adapté de Fleet (2011). Ces valeurs peuvent être modifiées en fonction de l'environnement dans lequel se trouvent les différentes souches de levures.

1.3.2 Importance des levures dans l'écosystème fromager

Les levures contribuent de manière significative au processus d'affinage des fromages que ce soit par leur dégradation du milieu (ex. protéolyse et lipolyse) que par leurs interactions avec les autres microorganismes (Ferreira 2003). Leurs interactions avec les bactéries et les moisissures influencent le développement de la texture et de la saveur des fromages (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001). De plus, leur présence en grand nombre au début de l'affinage peut aussi bien favoriser que freiner ou qu'inhiber le développement des microorganismes, que ceux-ci soient désirés ou non. La croissance des levures peut donc supporter celle des ferments lactiques et d'affinage (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Ferreira 2003). Elles libèrent entre autres des facteurs de croissance utiles aux bactéries. Les vitamines du groupe B dont l'acide pantothénique, la niacine, la riboflavine et la biotine sont ainsi excrétés (Fleet 1990; Ferreira 2003). Aussi, lors de la mort cellulaire des levures, les bactéries peuvent utiliser les nucléotides, les peptides et les autres métabolites qui se trouvaient dans le cytoplasme. D'ailleurs, l'ajout de sel au fromage peut provoquer une plasmolyse des levures moins halotolérantes.

L'effet des levures *Pichia fermentans*, *Issatchenkia orientalis* et *Yarrowia lipolytica* a été étudié en modèle fromager de type Camembert (Chen et al. 2011). Ces trois levures ont été inoculées séparément en combinaison avec un ferment de bactéries lactiques, en plus du ferment d'affinage habituel composé de *Geotrichum candidum* et de *Penicillium camemberti*. Afin d'étudier l'évolution des populations microbiennes, un suivi de la croissance des microorganismes a été réalisé à l'aide de décomptes microbiens (méthode développée par Leclercq-Perlat et al. 1999). Par rapport au groupe contrôle, une croissance plus lente de *P. camemberti* a été observée dans les Camemberts inoculés avec les levures étudiées. Ces dernières ont eu une croissance exponentielle durant les huit premiers jours, puis seulement *I. orientalis* a continué à cette vitesse de croissance. Les deux autres se sont stabilisées à une concentration de 1×10^7 UFC/g de fromage (Chen et al. 2011). Ainsi, l'effet des levures sur les ferments dépend des espèces présentes.

1.3.3 Distribution dans les fromages

La communauté microbienne présente à la surface des fromages à croûte fleurie serait significativement différente de celle des fromages à croûte lavée, notamment en raison de leur humidité (Wolfe et al. 2014). Pour cette raison, ces deux types de fromages seront traités séparément (Fig. 4).

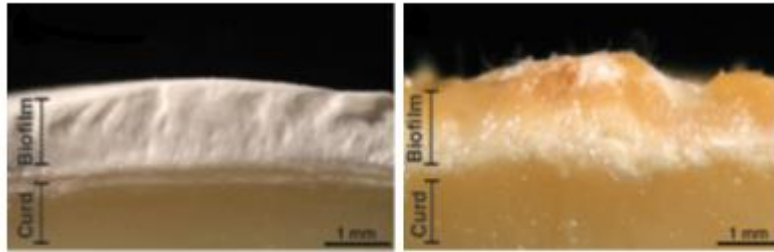


Figure 4. Biofilms développés à la surface d'un fromage à croûte fleurie (à gauche) et à croûte lavée (à droite). Sous le biofilm, la pâte du fromage est indiquée par le mot *Curd*. Adaptée de Wolfe et al. (2014).

1.3.3.1 Fromage à croûte fleurie

Dans le cas du Camembert traditionnel, en fin d'égouttage, l'acidification à un pH de 4,6-4,7 sélectionne une microflore acidophile composée de levures et de moisissures (Spinnler et Gripon 2004). *Geotrichum candidum* fait partie des premiers à se développer à la surface de fromages (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001). Sa croissance est cependant ralentie par la teneur élevée en sel. *Kluyveromyces marxianus* et *Debaryomyces hansenii* sont aussi habituellement ajoutées au procédé en raison de leur consommation respective de lactose ou de lactate. *Penicillium camemberti*, qui commencera à croître à la surface après cinq à six jours, occupera rapidement une place importante dans la microflore. Par ailleurs, l'augmentation du pH vers le 15^e jour d'affinage permet aux bactéries de se développer (Spinnler et Gripon 2004). En plus de ces ferments, des levures indigènes se trouvent dans l'écosystème des fromages à croûte fleurie. Ces genres de levures : *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, ont été isolés de fromages à croûte fleurie d'origine européenne,

australienne, canadienne et africaine (Viljoen, Khoury, et Hattingh 2003; Irlinger et al. 2015; Lavoie et al. 2012).

Dès les premiers jours, la concentration de levures atteindrait entre 10^6 et 10^8 UFC par gramme en surface alors qu'au 14^e jour elle serait de 10^5 à 10^7 UFC par gramme dans la pâte (Schmidt, Lenoir, et Schmidt 1980). Une augmentation de la quantité totale de levures à la surface est observée au moment où la concentration en LAB devient stable (Viljoen, Khoury, et Hattingh 2003). La production d'acides organiques par les LAB peut favoriser la croissance des levures. Des quantités similaires de levures ont été retrouvées dans la partie supérieure de Camemberts provenant de quatre producteurs (Roostita et Fleet 1996b; Viljoen, Khoury, et Hattingh 2003). Des quantités similaires de levures semblent être observées autant pour le Camembert que pour le Brie et la quantité de levures par gramme de mycélium varie aussi en fonction de la saison (Fig. 5).

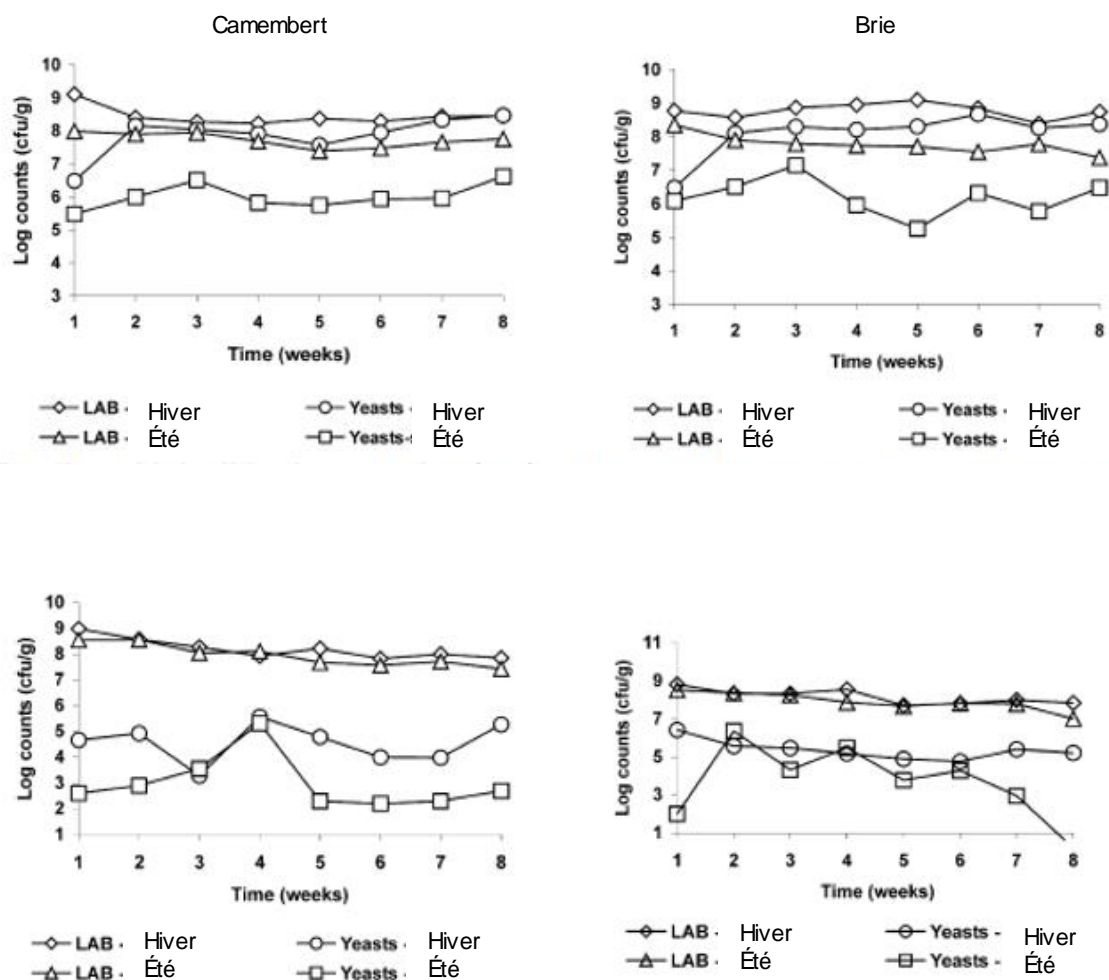


Figure 5. Les comptes de levures totales et de LAB sont présentés en fonction de la section du fromage qui a été prélevé, soit la surface (graphiques du haut) ou le centre (graphiques du bas) et en fonction de la saison, été et hiver. Adaptée de Viljoen, Khoury et Hattingh (2003).

1.3.3.2 Fromage à croûte lavée

Comme pour les fromages à croûte fleurie, en début d'affinage, les levures sont les premières à se développer à la surface des fromages à croûte lavée. Elles seraient mieux adaptées au pH acide que les bactéries (Monnet et al. 2015). Toutefois, les bactéries halotolérantes s'y développer en surface et domine de manière générale la microflore de ces fromages (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Brennan et al. 2004). Les moisissures

réussissent difficilement à s'établir en surface. Leur vitesse de croissance est désavantagée dans cette technologie fromagère à cause du frottage avec une solution saline (Brennan et al. 2004). La microflore de surface des fromages à croûte lavée est plus diversifiée que celle des fromages à croûte fleurie. Elle est largement influencée par l'environnement de la fromagerie. C'est pourquoi il est commun de manipuler d'abord les fromages affinés et de terminer avec les plus jeunes. Il s'agit d'une technique permettant l'inoculation de la surface des fromages jeunes avec la microflore désirée (Bockelmann 2011). La microflore varie aussi en fonction de la variété de fromage. Le Limburger, le Reblochon, le Livarot, le Tilsit et le Gubbeen ont, chacun, une microflore différente à leur surface (Cogan et al. 2014).

La majorité des études portant sur les levures indigènes dans les fromages à croûte lavée avait pour objectif de caractériser la microflore globale. Une grande diversité a été retrouvée dont les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Cyberlindnera*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hansenula*, *Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Yarrowia* et *Zygosaccharomyces* (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Lavoie et al. 2012; Cogan et al. 2014; Irlinger et al. 2015). Cependant, peu d'études ont porté sur la quantification de la microflore indigène. Une récente étude portant sur le Limburger a montré que les levures peuvent atteindre des concentrations de 10^5 - 10^7 UFC par gramme de croûte tandis qu'aucune n'a été détectée dans la pâte du fromage. Les levures semblent atteindre un pic de concentration après sept jours d'affinage et leur compte diminue ou se stabilise par la suite (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Ryssel et al. 2015). Des concentrations supérieures à 10^5 UFC par cm^2 ont été enregistrées pour ces quatre fromages à croûte lavée : Durus, Milleens, Gubbeen, Ardraham (Mounier et al. 2005) et des quantités supérieures ont été rapportées pour le Tilsit et le Reblochon (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001).

1.3.4 Caractérisation des fromages québécois

Lavoie *et al.* (2012) sont les seuls à avoir répertorié les levures présentes dans la pâte et dans la croûte des fromages québécois faits à partir de laits crus, thermisés et pasteurisés

de vaches laitières. Parmi les levures et les moisissures indigènes, 73 % des isolats représentaient des levures. Certaines d’entre elles étaient présentes dans le fromage et le lait telles qu’*Issatchenkia orientalis* (syn. *Pichia kudriavzevii*) et *Candida jadinii* (syn. *Pichia jadinii*, *Cyberlindnera jadinii*). *Kazachstania servazzii* (syn. *Saccharomyces servazzii*) a été trouvée uniquement dans le fromage. *I. orientalis* a été l’espèce la plus fréquemment isolée (Lavoie et al. 2012). Ces trois levures indigènes sont des ascomycètes anaérobies facultatives possédant des caractéristiques métaboliques différentes (Jacques et Casaregola 2008) (Tableau 4).

Tableau 4. Caractéristiques physiologiques de *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* (Kurtzman 2011b).

	Levures indigènes		
	<i>C. jadinii</i>	<i>K. servazzii</i>	<i>P. kudriavzevii</i>
Fermentation			
glucose	+	+	+
galactose	-	+	-
lactose	-	-	-
Croiss. en milieu liquide			
galactose	-	+	-
lactose	-	-	-
dl-lactate	+	-	+
citrate	+	-	+
10 % NaCl/5 % glucose	-	+	+

1.3.4.1 *Candida jadinii* (syn. *P. jadinii*, *S. jadinii*, *C. utilis*)

Cette levure indigène a été répertoriée dans quelques aliments, comme des grains de café en cours de fermentation et de la saumure de concombre (Silva et al. 2000; Tornai-Lehoczki 2003). Bien que *C. jadinii* ne fasse pas partie des levures les plus fréquemment retrouvées dans les produits laitiers, elle a été retrouvée dans de la saumure, du babeurre et du fromage (Büchl et Seiler 2011). Elle a notamment été isolée de la croûte d’un fromage de type Livarot en début d’affinage fait avec du lait cru et thermisé (Larpin et al. 2006; Larpin-Laborde et al. 2011; Cogan et al. 2014) et dans un Münster (Wyder, Bachmann, et Puhan 1999). En ce qui a trait aux fromages québécois, elle a été isolée seulement dans la

pâte d'un fromage semi-ferme fait avec un lait thermisé et non sur la croûte (Lavoie et al. 2012). Sa capacité à croître dans un milieu contenant du DL-lactate pourrait favoriser sa croissance dans la pâte des fromages (Tableau 4). La croissance de cette levure dans un caillé modèle a influencé significativement le pH de ce caillé en plus de créer des arômes sucrés, fruités, acides et de fromage (Wyder, Bachmann, et Puhan 1999). L'ajout de cette levure dans la fabrication de fromage à Raclette a confirmé son influence sur la production de composés aromatiques ainsi que sur sa capacité à dégrader les protéines et les peptides (Wyder, Bachmann, et Puhan 1999).

1.3.4.2 *Kazachstania servazzii* (syn. *S. servazzii*)

K. servazzii est aussi une levure retrouvée dans les produits fermentés tels que les radis japonais fermentés et le kéfir (Tominaga 2004; Büchl et Seiler 2011; Yurkov, Kemler, et Begerow 2012; Garofalo et al. 2015). Peu de recherches font état de sa présence dans les produits laitiers. Elle a toutefois été isolée jusqu'au 15^e jour d'affinage de Camemberts fabriqués avec un ferment à kéfir tibétain (Mei et al., 2014). La croûte et la pâte ont été mélangées et broyées puis mises en culture afin d'isoler les différentes espèces de levures et de bactéries (Mei et al., 2014). Une levure du genre *Kazachstania* a aussi été isolée d'un ferment à kéfir italien, par contre l'analyse de la région D1 de la grande sous-unité de l'ADNr (28S) de son génome ne permettait pas de l'identifier jusqu'à l'espèce (Garofalo et al. 2015). Pour une première fois, *K. servazzii* a été isolée de la pâte d'un fromage fabriqué au Québec (Lavoie et al. 2012). Curieusement, cette levure est la seule dont aucune croissance n'est observée en milieu liquide contenant du DL-lactate et du citrate (Tableau 4).

1.3.4.3 *P. kudriavzevii* (syn. *I. orientalis*, *C. krusei*, *S. krusei*)

P. kudriavzevii a été retrouvée dans un plus grand nombre d'aliments comparativement aux deux autres levures indigènes. Cette espèce a été isolée d'échantillons de vin, de cacao et de saumure d'olives vertes (Koné et al. 2016; Romero-Gil et al. 2016; Mónaco, Rodríguez, et Lopes 2016). Dans les produits laitiers, elle a été isolée d'échantillons de saumure, de babeurre, de kéfir, de yogourt, de fromage et à plusieurs occasions dans le lait et dans

l'environnement de fromageries (Büchl et Seiler 2011). En ce qui a trait à sa présence dans les fromages, elle a été isolée de la surface du Limburger (Goerges et al. 2008), d'un fromage frais et d'un caillé acide australiens (Lopandic et al. 2006) et, à plusieurs occasions, de la croûte et de la pâte de fromages québécois (Lavoie et al. 2012). En effet, *P. kudriavzevii* a été l'espèce indigène la plus isolée des 28 fromages québécois à l'étude et représentait 25 % de l'ensemble des isolats de levures effectués. Une analyse plus approfondie des différents isolats a montré que sa présence dans l'environnement fromager était récurrente dans le temps. L'analyse du profil génétique des isolats montre qu'il est possible de retrouver des souches ayant un profil génétique différent dans la même fromagerie (Lavoie et al. 2012). L'inoculation de cette levure dans des Camemberts a augmenté significativement l'azote non protéique et l'ammoniaque (Chen et al. 2011). Certaines souches de *P. kudriavzevii* pourraient donc influencer la dégradation des protéines du fromage, et ainsi en influencer la texture et la flaveur.

1.3.5 Participation des levures dans le développement de la flaveur

Globalement, les microorganismes de l'écosystème interagissent et modifient de façon plus ou moins importante les caractéristiques organoleptiques des fromages. Ces interactions surviennent durant la phase d'affinage du fromage et conditionnent le développement de la flaveur (Gori et al. 2013). Chaque membre du consortium utilise la matrice fromagère pour sa croissance. Plusieurs voies métaboliques sont sollicitées dont celles de la dégradation des protéines et des lipides (Fig. 6). Plusieurs enzymes sont donc impliquées durant le processus de fabrication et durant la période d'affinage. En effet, les enzymes naturelles du lait, les enzymes coagulantes, les enzymes produites par les ferments lactiques et d'affinage et ceux de la microflore indigène participent aux transformations biochimiques (Urbach 1997). De plus, des enzymes protéolytiques et lipolytiques sont libérés lors de l'autolyse des cellules microbiennes, ce qui peut engendrer la production des composés aromatiques (Beresford et Williams 2004).

Les levures participent de façon indirecte et directe au développement de la flaveur. D'une part, elles permettent le développement des bactéries et des moisissures. D'autre part, elles

assimilent le lactate et le citrate, fermentent le lactose, participent à la lipolyse et à la protéolyse. Ces différentes voies métaboliques empruntées par les levures mènent à la formation de composés aromatiques (McSweeney et Sousa 2000; Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001) (Fig. 6). Par exemple, la dégradation des acides aminés mène à la formation de composés aromatiques tels que des aldéhydes, des alcools, des acides et des composés soufrés (Marilley et Casey 2004).

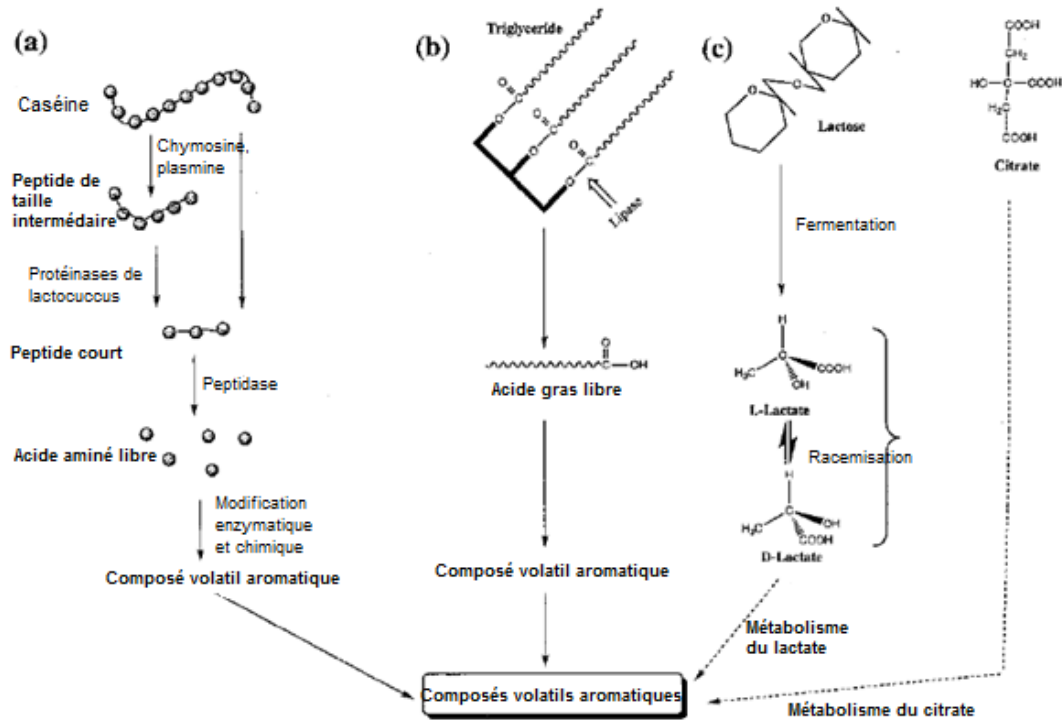


Figure 6. Voies métaboliques menant à la formation de composés volatils aromatiques : (a) protéolyse (b) lipolyse et (c) métabolisme du lactose, lactate et citrate. Traduit et adaptée de McSweeney et Sousa (2000).

1.3.5.1 Protéolyse

L'ajout de levures dans la fabrication fromagère peut modifier la composition en matière grasse et en protéine des fromages (De Freitas et al. 2009; Chen et al. 2011). Par exemple, les ratios entre les différents acides aminés libres peuvent varier. Dans un modèle de type Camembert, Chen *et al.* (2011) ont inoculé *P. fermentans*, *I. orientalis* et *Y. lipolytica* séparément en présence du ferment d'affinage habituel. Après 45 jours d'affinage, la

majorité des acides aminés libres (Glu, Gly, Val, Met, Ile, Phe et Leu) ont été retrouvés en plus grande quantité dans le Camembert contrôle soit celui inoculé avec *P. camemberti* et *G. candidum*. D'autre part, les acides aminés Asp, His, Thr et Pro ont été retrouvés en quantité significativement plus élevée dans les Camemberts inoculés avec la levure indigène *I. orientalis* après 45 jours d'affinage (Chen et al. 2011). Une autre équipe a analysé des fromages de type Cantal où *K. lactis*, *Y. lipolytica* et *P. fermentans* ont été inoculées ensemble. Aucun ferment d'affinage n'a été ajouté dans cette expérience. La concentration en certains acides aminés libres a été modifiée, mais la quantité totale d'acides aminés libres n'a pas été significativement différente entre les fromages où aucune levure n'a été ajoutée et ceux comportant les trois levures (De Freitas et al. 2009). Dans cette étude, l'ajout des levures n'a pas modifié l'intensité de la protéolyse. La concentration en acides aminés libres varie donc en fonction de l'activité protéolytique des espèces de levures présentes, du type de fromage et de la présence de ferment d'affinage.

1.3.5.2 Lipolyse

Des résultats semblables sont observés pour la dégradation des lipides en acides gras libres. Ces derniers influencent directement le développement d'arômes dans les fromages affinés (Chen et al. 2011). Les acides gras libres permettent la formation de composés aromatiques tels que des méthylcétones, des alcools secondaires, des lactones et des esters (Marilley et Casey 2004; Sørensen et al. 2011). Dans les fromages de type Cantal, à la fin de l'affinage, la concentration totale en acides gras libres a augmenté de 11 et 15 % pour les fromages inoculés avec *K. lactis*, *Y. lipolytica* et *P. fermentans* comparé au contrôle ($p < 0,09$) (De Freitas et al. 2009). Cette augmentation de la lipolyse se reflète significativement ($p < 0,05$) au niveau de la production d'acide gras palmitique (C16:0), stéarique (C18 :0) et oléique (C18 :1) (De Freitas et al. 2009). Par contre, dans un écosystème de type Camembert, les acides gras libres totaux ont été retrouvés en plus grande quantité lorsque le ferment d'affinage habituel a été inoculé seul (Chen et al. 2011). L'acide dodécanoïque (C12:0), le 9-hexadodécanoïque (C16:1) et l'acide linoléique (C18:2) ont été significativement plus élevés dans le Camembert contrôle ($p < 0,05$) (Chen et al. 2011). L'ajout de levures pourrait avoir déstabilisé l'activité lipolytique de *P. camemberti* et de *G. candidum*. Ces dernières

sont associées à une production d'acides gras à longue chaîne (14:0- 18:0) (Leclercq-Perlat, Corrieu et Spinnler 2007). De plus, dans les fromages à pâte molle, les acides gras volatils représentent la majeure partie des composés volatils (Chen et al. 2011). La matière grasse contribue de façon importante aux propriétés organoleptiques des fromages durant l'affinage. Le suivi de la dégradation des lipides et des protéines permet d'obtenir des indications concernant le développement de la saveur. Une protéolyse et une lipolyse intenses peuvent contribuer au développement de l'amertume, d'une saveur rance et d'une pâte plus molle (Fleet 1990).

1.3.5.3 Production de composés volatils

La saveur est le résultat d'une synergie entre l'ensemble des composés aromatiques d'un fromage et leurs proportions respectives (Gori et al. 2013). Des centaines de composés aromatiques différents ont été répertoriés. À chaque variété de fromage est associé un profil aromatique. Par exemple, pour le profil aromatique du Cheddar plus de 60 composés ont été identifiés. Ceux-ci se développent durant la phase d'affinage du fromage (McSweeney et Sousa 2000). L'utilisation des levures comme ferment d'affinage est principalement liée à leur importance dans la production de composés aromatiques (Corsetti, Rossi, et Gobbetti 2001; Gori et al. 2013).

Plusieurs recherches ont porté sur la variation des composés volatils produits par certaines levures. Dans plusieurs cas, les levures ont été ajoutées séparément afin d'étudier leur effet spécifique. Ce fut le cas notamment pour *Yarrowia lipolytica* CBS 2075, *Saccharomyces cerevisiae* D7 et *Debaryomyces hansenii* D18335 (Sørensen et al. 2011). Ces dernières ont été inoculées à une concentration de $1,6 \times 10^3$ cellules.cm⁻² dans un modèle imitant la surface d'un fromage. Les composés ayant une volatilité intermédiaire ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Cette méthode d'analyse est grandement utilisée pour ce type d'expérience car elle permet de séparer les composés volatils sur une colonne capillaire puis de les identifier. Plus de la moitié des composés volatils détectés étaient des aldéhydes, des cétones, des alcools et des esters, lesquels jouent un rôle important dans le développement de la saveur

(Sørensen et al. 2011). Des différences significatives pour certains composés ont été associées spécifiquement à *D. hansenii* et à *Y. lipolytica* (Tableau 5) (Sørensen et al. 2011). *D. hansenii* a produit principalement des aldéhydes, ce qui concorde avec des résultats obtenus précédemment (Martin et al. 2001; Arfi et al. 2004; Sørensen et al. 2011). La production significative d'un composé volatil ne signifie pas qu'il sera détecté par l'odorat humain. Par exemple, l'alcool 3-méthyl-1-butanol, a été identifié, mais ne contribue pas de manière importante à la flaveur des fromages (Urbach 1997).

Tableau 5. Composés aromatiques produits spécifiquement par *D. hansenii* et *Y. lipolytica* (Sørensen et al. 2011).

Levure	Famille chimique	Composés aromatiques	Odeur
<i>D. hansenii</i>	Aldéhydes	2-méthylpropanal, 2/3-méthylbutanal,	Vert, malt, chocolat, amande
<i>D. hansenii</i>	Alcools	2-méthyl-1-propanol 2/3-méthyl-1-butanol	Fruité, solvant, alcool, essence résidu de pomme
<i>Y. lipolytica</i>	Soufrés	Diméthylsulphide, diméthyltrisulphide	Chou, ail, fromage, gaz
<i>Y. lipolytica</i>	Cétone	2-propanone, 2-butanone, 2-pentanone, 3-méthyl-2-pentanone	Acétone, pâte de bois, pelure d'orange, fruit, caramel

Des études similaires ont été réalisées pour différentes levures. *Kluyveromyces lactis* a été associée à une production d'esters révélant des arômes de fruits (Martin et al. 2001; Arfi et al. 2004). *P. fermentans* a été hautement corrélée à la présence d'acide dodécanoïque (0,980), octanoïque (0,959), 3-buten-2-one (0,991) et pentanoïque (0,974). Ces résultats ont été obtenus après 15 jours d'affinage dans un modèle de type Camembert et ont expliqué 59,7 % de la variance lors d'une analyse en composante principale (Chen et al. 2011). Ces composés volatils sont associés à différentes flaveurs soit : la rancidité, le gras, les fruits, l'acétone, le fromage, le sucre et la cire. Par contre, certaines recherches montrent que les composés aromatiques produits par la levure d'intérêt diffèrent si elle est placée avec d'autres microorganismes d'affinage. La caractérisation de l'impact des levures

indigènes sur la saveur d'un fromage nécessite donc l'inoculation de ses levures seules et en écosystème. Le développement de la saveur d'un fromage pourrait être influencé de manière importante par l'espèce de levure présente majoritairement (Sørensen et al. 2011). Ainsi, la présence de levures indigènes en quantité suffisante dans le fromage pourrait également influencer la saveur des fromages.

1.4 Méthodes de caractérisation de la microflore naturelle

Plusieurs méthodes d'identification et de quantification existent afin d'en apprendre davantage sur les levures indigènes, variable non contrôlée par les fromagers. Les méthodes de microbiologie traditionnelle, nécessitant la mise en culture (méthodes culture dépendante), peuvent être utilisées de même que les techniques utilisant la biologie moléculaire (méthodes culture indépendante).

1.4.1 Méthode culture-dépendante

L'identification et la caractérisation des microorganismes par les méthodes dites traditionnelles sont basées sur des analyses physiologiques, morphologiques et biochimiques.

De manière générale, la caractérisation des microorganismes contenus dans un aliment nécessite d'abord l'inoculation de milieux de culture appropriés pour le type de microorganismes recherché. Les espèces viables s'y développent et sont ensuite isolées pour être soumises à divers tests (Valdés-Stauber, Scherer, et Seiler 1997; Feurer, Irlinger, et al. 2004). Au niveau biochimique, des tests de fermentation et d'assimilation de plusieurs sources de carbone doivent être effectués en plus de tests pour l'assimilation d'azote, les besoins en vitamines, la croissance à plusieurs températures, l'osmotolérance, etc. (Lopandic et al. 2006). Des clés d'identification comprenant une liste d'analyses à faire dans un ordre précis sont disponibles afin d'arriver à une identification juste. Par exemple, une réponse positive à l'assimilation du sucrose, à la croissance dans un milieu sans

vitamine et à l'assimilation de maltose et/ou L-rhamnose conduit à l'identification de *C. jadinii* si les ascospores sont en forme de chapeau (*hat-shaped*) (Kurtzman, 2011b). Une étude menée sur l'identification des levures présentes dans différents produits laitiers par une caractérisation phénotypique a nécessité plus de 60 tests différents (Lopandic et al. 2006). Tous ces tests prennent beaucoup de temps et nécessitent la mise en culture de levures (cité par Hermet et al. 2014).

Ces méthodes peuvent aussi mener à de mauvaises identifications, car leur interprétation est parfois difficile. Seulement 54 % des 513 isolats de levures ont été correctement identifiés à l'aide des méthodes traditionnelles (Lopandic et al. 2006). Rohm, Eliskases-Lechner, et Brauer (1992) ont montré qu'une non-concordance est possible entre les données physiologiques et biochimiques obtenues pour des levures isolées de produits laitiers. Plus précisément, ils avancent qu'une association levure-produit expliquerait qu'une espèce de levure puisse emprunter des voies métaboliques différentes selon le produit laitier duquel elle a été isolée (Lopandic et al. 2006). Les méthodes traditionnelles sont donc laborieuses en plus d'avoir un faible pouvoir discriminatoire pouvant mener à de mauvaises identifications.

De plus, lorsque l'écosystème étudié est complexe, comme c'est le cas avec les fromages, les espèces présentes en faible nombre sont parfois non détectées (Feurer, Irlinger, et al. 2004; Jany et Barbier 2008; Šuranská et al. 2016). Une sous-estimation des espèces indigènes est alors possible parce qu'elles sont difficiles à isoler (Quigley et al. 2013). De plus, certaines levures ont de la difficulté à croître *in vitro* (Head, Saunders et Pickup 1998; Jany et Barbier 2008).

Pour résumer, les méthodes traditionnelles présentent certains avantages : elles requièrent peu d'équipements, sont non dispendieuses et permettent soit de caractériser les espèces et d'apporter des informations phénotypiques concernant leur métabolisme. Elles permettent également d'isoler et donc de conserver les microorganismes identifiés pour une utilisation ultérieure. Par contre, elles nécessitent beaucoup de temps de laboratoire, ont un pouvoir

discriminatoire parfois insuffisant et, lorsque l'écosystème est diversifié, ne permettent pas de répertorier l'ensemble des espèces présentes (Quigley et al. 2013).

1.4.2 Méthode culture-indépendante

Les méthodes utilisant la biologie moléculaire pour la caractérisation des microorganismes ne nécessitent pas la mise en culture des espèces. Plutôt que d'être basé sur le phénotype, (l'expression des gènes compris dans le génome des espèces), elles sont basées sur leur génotype, c'est-à-dire la séquence des gènes de leur génome. La première étape pour l'étude d'un écosystème alimentaire est l'extraction de l'ADN ou de l'ARN de la partie de l'aliment étudié. Le matériel génétique des cellules vivantes et mortes sera extrait, sauf si un traitement des cellules à l'ethidium monoazide (EMA) ou au propidium monoazide (PMA) est préalablement réalisé afin de ne considérer que les cellules intactes (Rudi et al. 2005; Josefsen et al. 2010). L'extraction du matériel génétique peut se faire de différentes façons. Plusieurs compagnies, dont Invitrogen, ont développé des kits qui permettent une extraction rapide des acides nucléiques. L'homogénéisation de l'aliment avant l'extraction du matériel génétique, l'efficacité de la lyse cellulaire et la précision avec laquelle l'extraction a été réalisée, influencent la quantité et la qualité du matériel extrait (Feurer, Vallaeys, et al. 2004; Jany et Barbier 2008). Une fois l'extraction de l'ADN effectuée, plusieurs méthodes existent afin de quantifier ou d'identifier les microorganismes présents dans l'aliment analysé. Quigley et al. (2011) ont mis en évidence les avantages des techniques de biologie moléculaire tout en comparant des études ayant porté sur la caractérisation des mycètes contenues dans le lait et le fromage.

Les principales méthodes utilisent la PCR pour amplifier des régions précises du génome. Globalement, la PCR permet l'amplification d'une séquence précise d'acide nucléique pour en générer des milliards de copies à l'aide d'amorces spécifiques à cette séquence. Pour ce faire, la première étape est la dénaturation des brins d'ADN. Cela permettra aux amorces de s'hybrider à un endroit précis en raison de la complémentarité de la séquence ciblée avec les amorces (appariement). Une ADN polymérase, comme la TAQ polymérase, viendra synthétiser la séquence d'acides nucléiques complémentaires. Cette étape est appelée élongation (Fig. 10). La région amplifiée est ensuite analysée. Les sections

subséquentes décriront plus en détail les méthodes qui permettent une étude plus approfondie et plus complète de la microflore (Jany et Barbier 2008; Quigley et al. 2011).

1.4.2.1 *Amorces non spécifiques à l'espèce*

La détection de l'ensemble des microorganismes contenu dans une matrice est facilitée par le choix d'un gène présent chez l'ensemble des microorganismes d'intérêt. Les régions conservées chez les levures permettent ainsi la création et l'utilisation d'amorces universelles. Ainsi, des amplifications PCR peuvent être réalisées avec les mêmes amorces pour l'ensemble des échantillons et les régions variables entre les régions conservées permettront l'identification des microorganismes. La sélection du gène qui sera utilisé pour le développement d'amorces est très importante puisque la séquence doit être unique à l'espèce (Schoch et al. 2012; Cocolin et al. 2013).

Il existe déjà plusieurs amorces universelles pour les levures ce qui constitue un avantage de ce type de méthode. Les amorces basées sur le gène codant pour l'ARN ribosomique semblent être plus efficaces dans le cas des mycètes. Les régions D1/D2 de la grande sous-unité (28S) et les espaceurs transcrits internes (ITS1 et ITS2) peuvent être utilisées (Schoch et al. 2012). Un autre avantage est la grande disponibilité des séquences de ces régions dans les banques publiques de séquence (ex. GenBank) pour plusieurs espèces. Le lien entre la séquence amplifiée et celle disponible dans les bases de données permet d'identifier l'espèce selon un pourcentage d'identité. Par contre, il arrive que la séquence amplifiée ne permette pas la discrimination jusqu'à l'espèce (Cocolin et al. 2013). Également, les amorces universelles n'amplifient pas 100 % des genres et espèces présents dans la nature puisqu'il y a toujours possibilité d'un mésappariement entre les amorces et les régions génomiques ciblées (Feurer, Irlinger, et al. 2004; Schoch et al. 2012).

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) ou en gradient de température (TTGE) peut être réalisée à l'aide des amplicons obtenus à la suite de PCR réalisée avec des amorces universelles. Ces amplicons peuvent alors être séparés selon leur poids moléculaire dans la direction du courant électrique avec ou sans gradient de température et

comprenant des agents dénaturants (urée, formamide) (Quigley et al. 2011; Jany et Barbier 2008). La caractérisation de fromages, de lactosérum et de saumure a été réalisée à l'aide de cette technique (Fig. 7). Le séquençage massif d'amplicons (*metabarcoding*) est une autre technique, devenu une référence pour étudier la biodiversité des microorganismes d'un écosystème (Sharpton, 2014).

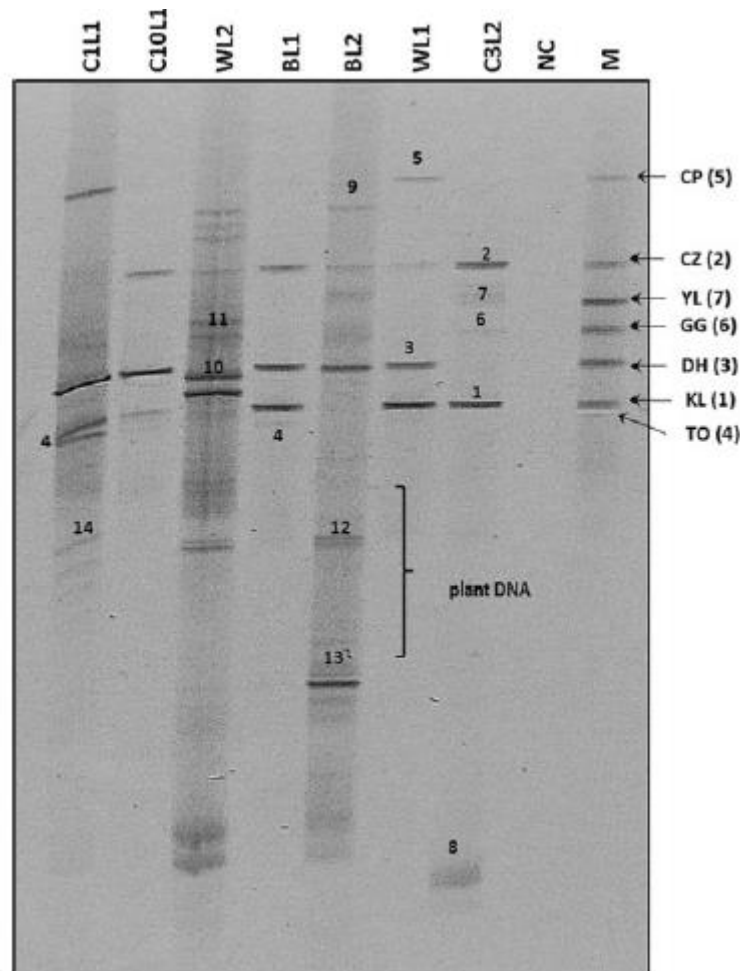


Figure 7. La méthode DGGE a été utilisée avec les amplicons obtenus à la suite d'une PCR avec les amorces ciblant la région D1/D2. Les colonnes C1L1, C10L1, C3L2 représentent des échantillons de fromages, WL2, WL1 de lactosérum et BL1, BL2 de saumure. Les espèces reliées aux différentes bandes sont CP, *C. pararugosa*; CZ, *C. zeylanoides*; YL, *Y. lipolytica*; GG, *G. geotrichum*; DH, *D. hansenii*; KL, *K. lactis*; TO, *Trichosporon ovoides*. Tirée de Šuranská et al. (2016).

Finalement, plusieurs autres techniques existent comme le *single-strand conformation polymorphism* (SSCP) qui se base sur les différences dans la conformation des simples

brins d'ADN ou le *terminal restriction fragment length polymorphism* (T-RFLP). Une description des principales techniques ainsi que leurs limitations sont décrites dans la revue de (Juste, Thomma et Lievens 2008).

1.4.2.2 *Amorces spécifiques à l'espèce*

Les techniques de biologie moléculaire peuvent aussi servir à identifier et à quantifier des espèces en particulier. Des amorces spécifiques doivent être développées en s'appuyant sur la séquence d'un gène précis, et la spécificité des amorces doit être validée préférentiellement à l'aide de PCR ainsi que par séquençage. Plutôt que de répertorier l'ensemble des microorganismes d'un environnement, ces techniques permettent entre autres de suivre l'évolution ou la distribution de microorganismes sélectionnés dans plusieurs produits alimentaires.

La technique de la PCR en temps réel est grandement utilisée, car elle permet non seulement de détecter un microorganisme sélectionné, mais aussi de quantifier sa présence. Deux types de quantification sont possibles, la quantification relative et la quantification absolue. La première permet de comparer la présence relative de divers microorganismes par rapport à une condition de référence, tandis que la quantification absolue permet de déterminer un nombre de copies de gène par superficie ou par quantité d'échantillons en utilisant une courbe standard de calibration.

Cette technologie est basée sur la détection de fluorescence émise lors de l'amplification PCR grâce à l'utilisation d'un fluorophore intercalant ou d'une sonde couplée à un fluorophore. Une relation directement proportionnelle existe entre la quantité d'une séquence cible (amplicons générés) et l'intensité de la fluorescence détectée par l'appareil, et ce, tout au long des cycles PCR (analyse en temps-réel). À l'aide d'une courbe standard, la quantité de départ de la séquence cible dans un échantillon peut être établie. Deux stratégies ont été développées pour la détection et la quantification d'une séquence spécifique d'ADN. La première stratégie consiste à ajouter à la réaction PCR un agent qui lie l'ADN doubles brins et émet de la fluorescence. Le SYBR Green est l'agent intercalant

le plus commun. À chaque cycle, lorsqu'un nouveau brin est formé par l'enzyme polymérase, il y a une quantité plus importante d'agents intercalants se localisant dans les brins d'ADN formés ce qui résulte en une émission plus importante de fluorescence qui sera détectée par l'appareil. La spécificité de l'amplification repose sur la spécificité des amorces pour leurs cibles (Poitras et Houde 2002).

La deuxième stratégie repose sur la sélection et l'utilisation d'une sonde fluorescente. Cette dernière augmente la spécificité de la réaction, car les amorces et la sonde doivent être spécifiques à la cible. Les sondes de type *TaqMan* sont construites de telle sorte qu'un émetteur et un suppresseur sont présents aux extrémités de la sonde. Lors de la synthèse du brin complémentaire pendant la PCR, la polymérase hydrolyse la sonde qui s'est hybridée entre les deux amorces, ce qui permet l'émission de fluorescence par le fluorophore émetteur maintenant séparé du suppresseur (Fig. 8). L'intensité de la fluorescence est donc proportionnelle au taux d'hydrolyse de la sonde et donc au nombre de copies d'ADN générées par PCR (Poitras et Houde 2002). La popularité de cette technique est liée à sa spécificité, à sa rapidité et à sa sensibilité, car de faibles quantités d'acides nucléiques sont détectées et amplifiées. Le temps de développement des amorces et de la sonde doit cependant être considéré de même que la baisse d'efficacité reliée à d'éventuelles mutations au niveau de la séquence cible (Poitras et Houde 2002; Bustin et al. 2009).

Cette technologie a été utilisée par Lessard et al. (2012) pour la quantification de *K. lactis*, *D. hansenii*, *G. candidum* et *P. camemberti* au cours de l'affinage de caillés modèles de type Camembert. Le suivi des espèces a permis de mieux comprendre leur comportement en communauté (Lessard et al. 2012).

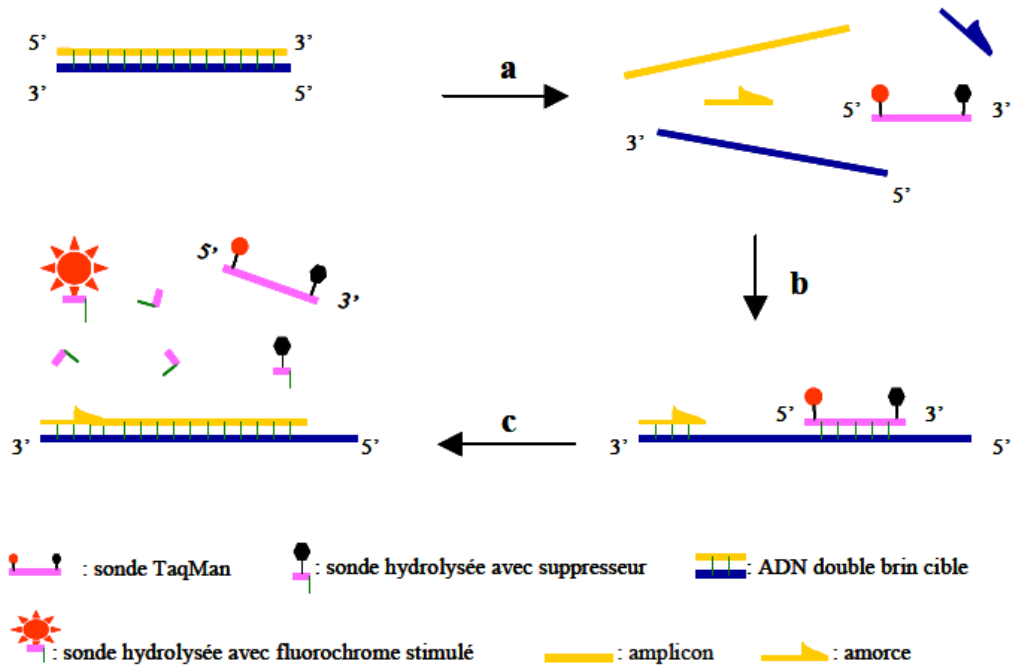


Figure 8. Principe de la technologie de détection par qPCR avec des sondes fluorescentes hydrolytique TaqMan. La première étape est la dénaturation de l'ADN (a) suivie de l'appariement des amorces et de la sonde (b) et finalement l'élongation entraîne l'hydrolyse de la sonde lors de la polymérisation de l'ADN (c). Tirée de Poitras et Houde (2002).

Section 2 Problématique, hypothèses et objectifs

Problématique

Des levures indigènes se développent naturellement à la surface et dans la pâte de fromages québécois. Or, ces dernières ont le potentiel d'influencer de manière directe et/ou indirecte la texture et les propriétés organoleptiques des fromages. *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* ont été retrouvées dans les laits et/ou fromages québécois. Ces dernières représentent donc une variable non contrôlée par les transformateurs et peuvent ainsi modifier la stabilité des produits. Un manque de stabilité a des répercussions économiques négatives pour les fromagers puisque les consommateurs désirent un produit avec des propriétés sensorielles stables à l'année. Ainsi, la persistance de ces levures dans les fromages québécois et leur présence en grand nombre pourraient modifier les qualités sensorielles des fromages.

Hypothèses

Le développement d'une nouvelle méthode de PCR en temps-réel permettra de quantifier *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* de la surface des fromages du terroir québécois. Ces dernières seront en plus grande quantité dans les fromages au lait cru.

Objectif général

L'objectif général de ce projet de recherche est d'analyser la distribution de *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* dans les fromages de spécialité du Québec.

Objectifs spécifiques

1. Développer et valider une méthode d'identification et de quantification de *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* en utilisant la méthode de la PCR en temps réel.
2. Détecter la présence et déterminer la concentration de *C. jadinii*, *K. servazzii* et *P. kudriavzevii* dans les fromages de spécialité québécois.

Section 3

Détection par PCR en temps-réel (qPCR) de trois espèces de levures indigènes dans les fromages de spécialités canadiens

RÉSUMÉ

Les écosystèmes microbiens des fromages de spécialités sont de plus en plus étudiés en raison de la contribution potentielle des levures indigènes au développement des propriétés sensorielles des fromages. Une étude précédente a noté la présence de *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* et *Pichia kudriavzevii* dans le lait cru et/ou dans les fromages de spécialités du Québec. Basée sur ces résultats, une méthode hautement spécifique et sensible a été développée par PCR en temps-réel afin de quantifier ces espèces de levures dans une variété de fromages de spécialité (croûte lavée, fleurie et mixte, lait cru, thermisé et pasteurisé). La spécificité du matériel développé a été testée par qPCR sur un total de 12 microorganismes couramment retrouvés dans les fromages affinés. La spécificité a aussi été validée par bio-informatique (BLASTS, NCBI). Les résultats montrent que ces levures sont persistantes dans les fromages artisanaux fabriqués dans la province. Les comptes de *C. jadinii* et *P. kudriavzevii* observés variaient entre 104-108 copies de gènes par g de pâte de fromage. L'étude de la distribution de ces levures indigènes permet de mieux connaître la diversité levurienne pouvant exister à l'intérieur et à la surface des fromages. Cette étude est la première étape vers une compréhension plus approfondie de la participation des levures indigènes dans le développement de la flaveur et de leurs rôles potentiels dans l'écosystème microbien.

Mots clés: levure indigène, PCR en temps réel, écosystème fromager, *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii*, *Pichia kudriavzevii*

qPCR DETECTION OF INDIGENOUS YEASTS IN CHEESE

A large number of specialty cheeses are produced around the world. However, maintaining consistency between batches and evoking the desired sensory properties in a specific cheese remains a challenge. Even if starter cultures are used, the indigenous microflora naturally present in milk is able to grow in cheese, potentially affecting flavor cheese development. A new qPCR assay was used to determine the presence and more specifically to quantify three indigenous yeast species, *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* and *Pichia kudriavzevii*, which are often isolated from raw milk and cheeses produced in the province of Quebec. Results indicate that indigenous yeasts are present in both the cores and rinds of several types of cheeses from Quebec, suggesting that they may play a role in microorganisms ecosystem development and eventual sensory properties of specialty cheeses.

Quantitative PCR (qPCR) reveals the frequency and distribution of three indigenous yeast species across a range of specialty cheeses.

A. Lamarche* †, M-H. Lessard* †, C. Viel* †, S. J. Turgeon, D. St-Gelais* ‡, S. Labrie* †¹

*Department of Food Sciences, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), STELA Dairy Research Centre, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec City, QC, Canada, G1V 0A6

†Laboratoire de mycologie alimentaire (LMA)

‡Agriculture and Agri-Food Canada, Saint-Hyacinthe Research and Development Centre, 3600 Casavant Blvd. West, Saint Hyacinthe, QC, Canada, J2S 8E3

¹ Corresponding author

Steve Labrie

Département des Sciences des aliments, 2425 rue de l'Agriculture, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Québec City, QC, Canada, G1V 0A6.

Telephone : (418) 656-2131 ext : 3243; Fax : (418) 656-3353

E-mail: steve.labrie@fsaa.ulaval.ca

Article submitted to Journal of Dairy Science

ABSTRACT

Indigenous microorganisms are important components of the complex ecosystem of many dairy foods including cheeses, and are potential contributors to the development of a specific cheese's sensory properties. Among these indigenous microorganisms are the yeasts *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii*, and *Pichia kudriavzevii*, which were previously detected using traditional microbiological methods in both raw milk and some artisanal specialty cheeses produced in the province of Quebec, in Canada. However, their levels across different cheese varieties are unknown. A highly specific and sensitive real-time quantitative PCR (qPCR) assay was developed to quantitate these yeast species in a variety of specialty cheeses (bloomy-, smear-, and mixed-rind cheeses from raw, thermized, and pasteurized milks). The specificity of qPCR assay was validated, and showed no cross-amplification with 11 other fungal microorganisms usually found in bloomy-rind and smear-ripened cheeses. *C. jadinii* and *P. kudriavzevii* were found in the majority of the cheeses analyzed (25 out of 29 and 24 out of 29 cheeses, respectively) in concentrations reaching 10^4 to 10^8 gene copies·g⁻¹ in the cheese cores which are considered oxygen-poor environments and 10^1 to 10^4 gene copies·cm⁻² in the rind. The presence and levels of these two yeast species correlated differentially with the milk heat treatment applied, rind-type, and the plant where the cheese was manufactured. In contrast, *K. servazzii* was present in the rinds of only two cheeses, in concentrations ranging from 10^1 to 10^3 gene copies·cm⁻², and in one cheese core at 10^5 gene copies·g⁻¹. Thus, in the ecosystems of specialty cheeses, indigenous yeasts are highly frequent but variable, with certain species selectively present in specific varieties. These results support a prominent role for indigenous yeasts in the development of specific cheese sensory properties.

Keywords: Cheese ecosystem, indigenous yeasts, Quantitative PCR (qPCR),
Cyberlindnera jadinii, *Kazachstania servazzii*, *Pichia kudriavzevii*

INTRODUCTION

Global cheese consumption has increased substantially in recent years. For example, Canada's annual per capita cheese production rose from 11.85 kg in 2000 to 13.79 kg in 2017 (Statistique Canada, 2017). This growth is driven in large part by specialty cheeses such as bloomy and washed rind cheeses who reached 8.85 kg in 2017 compared to 7.15 in 2000 (Statistique Canada, 2017). Consistent quality and flavor of specific specialty cheeses positively influence consumer choice and helps cheesemakers expand their market (Groupe AGECO, 2006). However, such consistency from batch to batch can be difficult to achieve potentially due to the presence of indigenous microorganisms in cheeses. This inconsistency is considered to be partly due to the complex microbial ecosystem of developing cheeses (Beresford and Williams, 2004), highlighting the need for a comprehensive analysis of their composition in microorganisms.

Recent studies using meta-omics techniques demonstrated that the cheese ecosystem is composed of hundreds of microbial species that emerge during the ripening process (A. Bokulich and A. Mills, 2013; Wolfe et al., 2014). These adventitious microorganisms may arise from multiple origins. For example, they may be introduced into milk at the farm, in animal feed or in the air, or on teats, machinery, employees, etc. They may also be introduced at the dairy plant (Verdier-Metz et al., 2009; Vacheyrou et al., 2011; Bokulich and Mills, 2013; Quigley et al., 2013; Montel et al., 2014).

Yeasts are natural members of the cheese ecosystem because of their capacity to grow in large ranges of pH and temperature, and their tolerance to high salt concentrations and low water activity (Fleet, 2011; Kurtzman, 2011a). Because of their common presence, multiple techniques are used to detect, identify, and quantitate yeast in foods such as cheese,

including traditional microbiology techniques, qPCR and –omics methods (Quigley et al., 2011; Lessard et al., 2014; Wolfe et al., 2014; Dugat-Bony et al., 2016). However, few studies have addressed the frequency and distribution of indigenous yeasts across different cheeses, despite the fact that volatile compounds, such as those produced by growing yeasts, contribute to cheese ripening and flavor (Urbach, 1997).

The presence of certain indigenous yeast species has been established in diverse food environments. *Kazachstania servazzii* (syn.: *Saccharomyces servazzii*), *Cyberlindnera jadinii* (syn.: *Pichia jadinii*, *Saccharomyces jadinii*; anamorph: *Candida utilis*), and *Pichia kudriavzevii* (syn.: *Issatchenkia orientalis*; anamorph: *Candida krusei*) have been previously isolated from various fermented foods. *K. servazzii* has been found in pickles and kefir (Tominaga, 2004; Büchl and Seiler, 2011; Yurkov et al., 2012), *C. jadinii* has been isolated from cucumber brine and coffee cherries (Silva et al., 2000; Tornai-Lehoczki, 2003), and *P. kudriavzevii* has been found in wine, sorghum beer, cocoa, Italian sourdoughs, and green olives brine (Succi et al., 2003; Lyumugabe et al., 2014; Koné et al., 2016; Mónaco et al., 2016; Romero-Gil et al., 2016).

More limited studies of these indigenous yeasts have been performed in dairy foods. *C. jadinii* has been studied in curd slurries due to its presence in Münster, a Protected Designation of Origin (PDO) cheese. Sensory analysis revealed that *C. jadinii* imparted a distinct odor in addition to an elevated pH (Wyder and Puhani, 1999). *P. kudriavzevii* has also been found to influence the chemical environment of cheese by increasing pH and proteolysis in cheese curd slurries (Wyder and Puhani, 1999; Chen et al., 2011). In addition, *P. kudriavzevii* has been proposed as a potential probiotic, as it has the capacity to produce

folate and can survive passage through a simulated *in vitro* human gastrointestinal tract (Greppi et al., 2017).

K. servazzii is found less frequently in dairy products than *C. jadinii* and *P. kudriavzevii*, and fewer studies have been performed on its role in the dairy environment. However, in one study, *K. servazzii* was the most prevalent yeast in Camembert-type cheese that had been inoculated with kefir starter to take advantage of kefir probiotic properties (Mei et al., 2014).

In a previous study, a molecular identification approach was applied using the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA region to identify indigenous yeast, including *C. jadinii*, *P. kudriavzevii*, and *K. servazzii*, in raw milk and/or artisanal specialty cheeses from the province of Quebec, in Canada (Lavoie et al., 2012). *P. kudriavzevii* was found in numerous cheese samples, and *C. jadinii* and *K. servazzii* were also found, albeit less frequently (Lavoie et al., 2012). However, the approach was not quantitative. Therefore, the levels of these yeasts across different cheeses, and consequently their ability to influence the cheese ripening process and the development of texture and flavor, remains unclear.

The aim of this study was to determine the concentrations of *P. kudriavzevii*, *C. jadinii*, and *K. servazzii* in different areas (core and rind) of a range of different types of commercial specialty cheeses (washed-, bloomy- or mixed-rind) produced from raw, thermized, or pasteurized milk. To this end, a qPCR assay was developed that could accurately quantitate even very low levels of yeasts that may be able to proliferate in the low oxygen conditions of the core. The rinds and cores of a selected variety of 29 different cheeses were analyzed using qPCR species-specific primers and TaqMan probes. Specialty cheeses

were classified by their variety (washed-, bloomy- or mixed-rind) and the heat treatment of the milk that comprised each cheese (raw, thermized, or pasteurized), and the presence and quantity of each indigenous yeast in each classification of cheese was determined. This study is the first to demonstrate that *P. kudriavzevii* and *C. jadinii*, the latter of which was previously rarely detected in cheese, are frequent members of both the cores and rinds of specialty cheeses. In addition, this study demonstrated that the presence of *K. servazzii* in specialty cheese is rare, and thus could potentially impart distinctive characteristics to certain specialty cheeses.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material and Genomic DNA Extraction. Reference fungal strains from the Laboratoire de mycologie alimentaire (LMA) collection were used to develop a qPCR assay (Table 1). Strains were cultivated from culture stock stored at -80°C in YEG medium (10 g.L⁻¹ yeast extract, 10 g.L⁻¹ glucose) containing 15% glycerol, and were plated on YEG agar (30 g.L⁻¹ agar). Individual colonies were cultured in YEG liquid medium and used for genomic DNA extraction using a phenol-chloroform extraction protocol (Al-Samarrai and Schmid, 2000). DNA extraction yield and quality were determined using a Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, ThermoFisher Scientific, Wilmington, NC).

Cheese Total DNA Extraction. Cheese total DNA extraction was performed in triplicate for each cheese sample using a Purelink viral RNA/DNA kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with the following modifications: a total of 30-40 mg of each grounded cheese sample was homogenized in 200 µL of a 0.9% NaCl solution, prior to the addition of the proteinase K and the included lysis buffer. After DNA elution, RNA was removed using a 0.5 mg/mL RNase A treatment for 1 h at 37°C. DNA extraction yield and quality were measured using a BioTek microplate reader Synergy HI and Gen5™ software (Winooski, VT, USA).

Target Gene Sequencing and Design of Real-Time qPCR Primers and Probes. Specific gene sequences for the targeted yeast species were selected based on their availability in GenBank (Table 2). The genes *CME1*, *CenH3*, and *GSTY-1* were selected as qPCR gene targets for *C. jadinii*, *K. servazzii*, and *P. kudriavzevii*, respectively. Based on the target gene sequences obtained, qPCR-specific primers and TaqMan probes were designed using

Primer Express v2.0 (ThermoFisher Scientific) and analyzed with OligoAnalyzer v3.1 (Integrated DNA Technologies; IDT) (Table 3). Primer specificity was verified by PCR on several strains of the targeted yeast species (Table 1), and resulting PCR amplicons were sequenced and verified using BLAST (Altschul et al., 1990). Each qPCR design was assessed for cross-amplification against 11 other fungal species commonly found in dairy products (Table 1).

qPCR Absolute Quantification Using Standard Curve Assays. qPCR target genes (*CME1*, *CenH3*, and *GSTY-1*) were individually PCR amplified, cloned in the pCRTM-II TOPO[®] vector, and transformed in *E. coli* TOP10 using a TOPO[®]TA Cloning[®] kit (ThermoFisher Scientific). Recombinant plasmid DNA was purified with a Plasmid DNA Maxiprep kit (Qiagen, Toronto, Ontario, Canada), and then sequenced. To use the recombinant plasmid DNA as a quantification standard, the concentration was measured with a BioTek microplate reader Synergy HI and Gen5TM software (Winooski, VT, USA). When used as a quantification standard during qPCR assays, the recombinant plasmid DNA was six- to tenfold diluted and deposited in triplicate in 96-well plates (dynamic range for target gene *CME1*: 10⁰ to 10⁸ gene copies per reaction; for *CenH3* and *GSTY-1*: 10⁰ to 10⁹ gene copies per reaction). Standard curves were generated to determine the qPCR efficiency and dynamic range of each reaction.

Quantitative PCR was performed on an ABI7500 Fast system apparatus. 96-well qPCR plates were set up using epMotion 5075 VAC automated pipetting system (Eppendorf, Mississauga, Ontario, Canada). DNA concentration and qPCR reagents were used as

described by Lessard et al., (2012). The qPCR program began with an initial denaturation step at 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of denaturation 95°C for 3 s and annealing/extension at 60°C for 30 s. qPCR data were analyzed using 7500 software v2.0.6 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

qPCR Quantification of Indigenous Yeasts in Specialty Cheeses. Three samples of each of twenty-nine (29) specialty cheese varieties from 22 different cheese plants (for a total of 87 individual cheeses sampled) from the province of Quebec in Canada were selected and were coded for confidentiality (Table 4). Cheeses were stored at 4°C for 3 days. A total of 50 cm² was sampled for each cheese rind; specifically, 25 cm² was scraped from each flat surface. In addition, 10 g of each cheese variety's core was sampled for one of the three specimens of each of the 29 cheeses (Fig. 1). All rind and core samples were stored at -80 °C before grinding using a liquid nitrogen cooled CryoMill (Retsch, Haan, Germany). Grinding consisted of a precooling cycle at 5 Hz, followed by a 4 min grinding step at 25 Hz.

Statistical Analysis

Rind and Core Analyses. A one way analysis of variance (ANOVA) was used to analyze the effect of the type of cheese on the detection of each indigenous yeast being tested. Because of the non-normality of the data, the p-value was adjusted using permutation distribution. Variety of cheese was considered a fixed factor, and comparisons were made between specific types of cheese (rind type and heat treatment). SAS® (SAS/STAT

software, 2015) was used for analysis; specifically, the GLM procedure was followed by the MULTTEST procedure.

RESULTS

qPCR Assay Efficiency. A highly specific and sensitive qPCR assays was developed for the quantification of three indigenous yeast species (*C. jadinii*, *K. servazzii* and *P. kudriavzevii*) in samples originating from both the rind and the core of specialty cheeses. The specificity of qPCR amplification was confirmed through the sequencing of obtained qPCR amplicons and by negative qPCR detection using 11 other fungal species isolated from dairy products. BLAST searches of the *CME1*, *GSTY-1*, and *CenH3* target genes revealed that these genes are present in only one copy in the genomes of *C. jadinii* (Whole genome sequencing (WGS) project BAEL01 ; Tomita et al., 2012), *P. kudriavzevii* (WGS project JQFK01; Chan et al., 2012) and *K. servazzii* (unpublished WGS project LMA-647, Food Mycology Laboratory), respectively. Resulting qPCR efficiencies were 98.4%, 96.6%, and 97.8% for *P. jadinii*, *K. servazzii*, and *P. kudriavzevii*, respectively (r^2 -values ≥ 0.990 ; Table 5).

Distribution of *C. jadinii*. *C. jadinii* was detected in 25 of 29 cheese cores at concentrations of 10^5 to 10^8 gene copies·g⁻¹ (Table 6), and was detected in the rinds of 24 of 29 cheeses at 10^0 to 10^4 gene copies·cm⁻² in all cheese variety. *C. jadinii* was absent in both the core and rind of only one cheese, C1, a washed-rind cheese made with raw milk. Population of *C. jadinii* in the cheese core was not dependent on the cheese variety ($p > 0.05$), but was correlated with the milk heat treatment applied ($p < 0.01$), especially in bloomy cheeses made from raw and thermized milk ($p < 0.001$; Fig. 2). At the cheese surface, high *C. jadinii* counts were obtained in bloomy cheeses (12/29 cheeses), as compared to washed-rind cheeses (15/29 cheeses; $p \leq 0.001$), although this difference was

not observed in core samples taken from the same cheese varieties. Cheeses made from raw and thermized milk contained more *C. jadinii* on their surface than pasteurized milk cheeses ($p < 0.001$), but no difference was detected between raw and thermized milk cheeses (Fig. 3).

The presence of *C. jadinii* in multiple cheeses manufactured in a same cheese plant was verified by analyzing two different cheese varieties from each of five different artisanal cheese plants (samples C1-C2; C3-C17; C6-C8; C9-C10; C20-C29). *C. jadinii* counts on the surface of a bloomy- and a washed-rind cheeses (C17 and C3) produced at the same cheese plant were significantly different (10^4 gene copies·cm⁻² and 1 gene copy·cm⁻², respectively; $p < 0.001$). The same significant difference in *C. jadinii* counts was also observed in the cores of these cheeses: *C. jadinii* was more abundant in bloomy cheeses than in washed-rind cheeses ($p < 0.0001$).

Distribution of *P. kudriavzevii*. *P. kudriavzevii* was detected in the surface of six varieties of cheese at 0.9 ± 1.5 gene copies·cm⁻² to $1.2 \pm 2.1 \times 10^2$ gene copies·cm⁻², and in the core of 24 cheeses from $2.4 \pm 4.2 \times 10^5$ gene copies·g⁻¹ to $4.15 \pm 1.03 \times 10^7$ gene copies·g⁻¹ (Table 7). *P. kudriavzevii* was not detected in the rind or core of three cheeses (C1, C12 and C15), nor was it detected in the rind of any hard cheeses ($n = 5$). The type of heat treatment applied to the milk comprising each cheese did not influence the presence or levels of *P. kudriavzevii* in the cores of hard- or washed-rind cheeses. In the bloomy cheeses, however, a significantly higher count of *P. kudriavzevii* was detected in raw milk cheeses than in thermized- and pasteurized-milk cheeses ($p < 0.05$; Fig. 4). This indigenous

yeast was detected in the core of 11 of 12 bloomy-rind cheeses in amounts ranging from 10^5 to 10^7 gene copies·g⁻¹. Finally, different cheeses produced in the same plant did show different levels of *P. kudriavzevii*. For example, a difference was observed between washed- and bloomy-rind cheeses from cheese plant D (10^5 and 10^7 gene copy·g⁻¹ respectively). Only one of the two cheese varieties from cheese plant C contained *P. kudriavzevii*.

Distribution of K. servazzii. *K. servazzii* was detected in the rind of only two cheeses; specifically, mixed-rind cheeses C28 and C29 (both made from thermized milk), at $1.89 \pm 0.51 \times 10^3$ gene copies·cm⁻² and $0.6 \pm 1.0 \times 10^1$ gene copies·cm⁻², respectively (Table 8). *K. servazzii* was detected in only one cheese core; namely, cheese C12 at $0.9 \pm 1.6 \times 10^5$ gene copies·g⁻¹.

DISCUSSION

This study aimed to establish the frequency and distribution of the three indigenous yeast species *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* and *Pichia kudriavzevii* in specialty cheeses. These yeasts have been previously detected in cheeses from Quebec (Lavoie et al., 2012), as well as in other cheese samples worldwide (Borelli et al., 2006; Larpin et al., 2006; Lopandic et al., 2006; Larpin-Laborde et al., 2011; Mei et al., 2014; Padilla et al., 2014; Chombo-Morales et al., 2016; Dugat-Bony et al., 2016). The use of qPCR in this study provided the first quantitative view of indigenous yeast presence in both the rind and core of cheeses with different rind varieties (bloomy-, smear, and mixed-rind), and from milk receiving different heat treatments (raw, thermized, and pasteurized).

Prior to this study, the presence of *C. jadinii* was rarely reported in cheese. It had been isolated, but not quantified, in the rind of a Livarot cheese (a soft, red smear-ripened cheese made from raw milk), during the early stage of ripening before salting (Larpin et al., 2006; Larpin-Laborde et al., 2011). It was also reported in the core of a Portuguese Serpa cheese (Gonçalves Dos Santos et al., 2017). In a precedent study by our group, using traditional microbiological methods, *C. jadinii* was isolated only in a single raw milk sample and a single semi-hard washed cheese core made with thermized milk (Lavoie et al., 2012). Interestingly, qPCR method detected and quantified *C. jadinii* in 83 % of the surface and 86 % of the cores, a higher frequency than previously reported. The low detection rate in previous studies could be explained by the lack of specific detection methods (Cogan et al., 2014), and/or the presence of *C. jadinii* as a subdominant species of the cheese ecosystem because it is overborne by other microorganisms. Given that *C. jadinii* was

detected in relatively large quantities in several cheeses varieties, the role of *C. jadinii* in cheese flavor and texture development during ripening warrants further investigation.

K. servazzii was detected in only three varieties of specialty cheese analyzed in this study; specifically, on two mixed-rind cheeses (C28 and C29) and in one washed-rind cheese core (C12). *K. servazzii* was found in the rind (surface) of all three biological and 27 technical replicates of C28. *K. servazzii* was also isolated from the same cheese in 2012 (Lavoie et al., 2012), suggesting that *K. servazzii* is well established in the cheese plant where cheese C28 is produced. *K. servazzii* is rarely reported in cheese, with the exception of a Camembert-type cheese produced using a Tibetan freeze-dried kefir coculture as a starter (Mei et al., 2014). In this particular case, *K. servazzii* was predominantly present during the beginning of the ripening process (days 0 to 15; Mei et al., 2014): 51 isolates of this species were found, compared to 15 isolates of *Debaryomyces hansenii* (Mei et al., 2014). This ecosystem clearly evolved during the ripening process, as *D. hansenii* was found in higher concentrations during the end of the ripening period (days 10 to 35) of the cheese. These results, taken in conjunction with this report, suggest that *K. servazzii* is not well adapted to the cheese matrix and/or is displaced by other yeasts during ripening. This could potentially be explained by *K. servazzii*'s capacity to metabolise galactose but not lactate (Vaughan-Martini et al., 2011). Depending on techniques used during ripening (e.g. lactic vs. rennet coagulum, soft vs. hard cheese), residual galactose can be limited relative to lactate during the ripening process (Fox, 2004).

In previous work, *P. kudriavzevii* was found in raw milk from eight different farms, and was the most frequently isolated yeast species from ripened cheese: seven isolates came from cheese rinds, and 12 from cheese cores (Lavoie et al., 2012). *P. kudriavzevii* (formally named *I. orientalis*) is naturally present in milk, can survive during cheesemaking process, and can be found in cheese. In this study, *P. kudriavzevii* was found in 26 out of 29 cheeses analyzed (6 surface and 24 cores), in all cheese rind varieties (washed-, bloomy-, and mixed) and in cheese from milk submitted to all types of heat treatment (raw, thermized, and pasteurized). Our results confirm that *P. kudriavzevii* is frequently found in cheeses, as also reported in Austrian fresh and sour curd cheeses (Lopandic et al., 2006), Graukäse cheese (Prillinger et al., 1999), and in multiple raw milk cheeses (Borelli et al., 2006; Padilla et al., 2014; Pangallo et al., 2014; Tofalo et al., 2014; Chombo-Morales et al., 2016). *P. kudriavzevii* was found to be one of the dominant species on the surface of Cojita raw milk cheese, as identified by PCR-DGGE (Chombo-Morales et al., 2016). This evidence, in conjunction with this study, suggests that the presence of *P. kudriavzevii* in cheese might have been underestimated in previous studies using traditional microbiological methods (Valdés-Stauber et al., 1997; Cogan et al., 2014).

Although *P. kudriavzevii* appears to be common in cheese microbial ecosystems, its contribution to the cheese ripening process remains unclear. It is generally accepted that yeasts are found in 10 to 1000-fold higher concentrations on the surface of cheese than in the core because of their oxygen and nutritional requirements (Schmidt et al., 1980; Beresford and Williams, 2004; Chamba and Irlinger, 2004; Gkatzionis et al., 2014). However, qPCR quantification method shows that the indigenous yeasts *C. jadinii* and *P.*

kudriavzevii can be found in high concentrations (up to 10^4 - 10^8 gene copy·g⁻¹) in the cheese core, compared to the surface (10^2 - 10^5 gene copy·g⁻¹). As the presence and metabolism of indigenous yeasts in the core and the surface could influence the flavor development of the cheese (Beresford and Williams, 2004; Gkatzionis et al., 2009, 2014), further investigations of the role of *C. jadinii* and *P. kudriavzevii* in cheese ripening is warranted. Furthermore, the presence of these particular yeasts may reflect intrinsic properties, such as an ability to grow under low oxygen conditions, or in the presence of lactate and citrate (Kurtzman, 2011b; c).

In previous studies, it has been reported that the type of heat treatment applied to milk impacts the biodiversity of microorganisms found in cheese made from that milk (Delcenserie et al., 2014; Wolfe et al., 2014; Irlinger et al., 2015). The quantity of *C. jadinii* in the cheese core increased with milk thermization, as compared to cheese from raw and pasteurized milk ($p < 0.01$; Fig. 2). Conversely, *P. kudriavzevii* was more abundant in raw-milk bloomy-rind cheese ($p < 0.05$; Fig. 4). However, caution should be exercised in the interpretation of these results, since the initial concentration of yeast in the milk was not established for the cheeses studied. Indeed, the change in the indigenous yeast counts from raw milk to ripened cheese surface and core should be further studied to provide insight into the sources and impact of these microorganisms.

CONCLUSION

With species-specific primers and probes, a highly specific and sensitive real-time quantitative qPCR method was successfully developed to analyze the presence and the distribution of *Cyberlindnera jadinii*, *Kazachstania servazzii* and *Pichia kudriavzevii* in specialty cheeses. Results confirmed that these three indigenous yeasts are present in cheeses produced in the province of Quebec, and revealed that *C. jadinii* and *P. kudriavzevii* are found in especially large quantities in the cheese core. This study highlights the importance of future research not only on the microbial dynamics of the cheese core, but also on the impact of these indigenous yeast species on sensory properties of specialty cheeses. Finally, understanding the role of these species in complex fungal communities could facilitate the selection of new ripening cultures that will improve the properties, consistency, and quality of specialty cheeses.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Yeast species and isolates used to develop and test the qPCR method.

Species	LMA strains number (isolated from)	Reference
<i>Yarrowia lipolytica</i>	LMA-97 (cheese)	Isolated by Lacerte, P., 2008
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	LMA-361 (milk), LMA-839 (cheese)	Lavoie et al., 2012
<i>Kluyveromyces lactis</i>	LMA-437	Lessard et al., 2012
<i>Candida parapsilosis</i>	LMA-463 (cheese)	Lavoie et al., 2012
<i>Pichia fermentans</i>	LMA-623 (cheese)	Lavoie et al., 2012
<i>Kazachstania servazzii</i>	LMA-647, LMA-687 (milk)	Lavoie et al., 2012
<i>Pichia kudriavzevii</i>	LMA-503, LMA-584, LMA-615, LMA-652 (cheese)	Lavoie et al., 2012
	LMA-660, LMA-666, LMA-726, LMA-845, LMA- 933 (milk)	Lavoie et al., 2012
<i>Cryptococcus curvatus</i>	LMA-784 (milk)	Lavoie et al., 2012
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	LMA-808 (cheese)	Lavoie et al., 2012
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LMA-1019	Lessard et al., 2012
<i>Geotrichum candidum</i>	LMA-1028	Lessard et al., 2014
<i>Penicillium camemberti</i>	LMA-1029	Lessard et al., 2014

Table 2. Genes targeted for qPCR assays and primers used for gene sequencing.

Yeast	Targeted gene	GenBank accession no.	Sequencing Primers (5' → 3')	Amplicon size (pb)
<i>C. jadinii</i>	Malic enzyme (<i>CME1</i>)	DQ173437.1	Forward primer: CTG AAG GTG ACG CCA TTG CT Reverse primer: GTG GAC GAC CAG TGG TGAC A	450
<i>K. servazzii</i>	Centromere H3 (<i>CenH3</i>)	DQ826421.1	Forward primer: TTC CC CCA GTG ACC TTG ATG Reverse primer: TTC GCA TGT TCC AGT AAA CCA A	450
<i>P. kudriavzevii</i>	Glutathione S-transferase Y-1 (<i>GSTY-1</i>)	AB021655.1	Forward primer: CTG AAG GTG ACG CCA TTG CT Reverse primer: AAC AAT GTG CTG TAA GGT TAC GTA TAG G	450

Table 3. Primers and probes used for qPCR quantification of indigenous yeasts.

Yeast species	Targeted gene	Primers (5' → 3') *	Length (pb)
<i>C. jadinii</i>	<i>malic enzyme (CME1)</i>	Forward primer: GGT GTT GGT GGT GTC CGT ATT Reverse primer: GGA TAC CAC CAC AAA GGG TCAT TaqMan Probe: 5'FAM-CCA TCT CTA AGC TTG CC-TAMRA3'	64
<i>K. servazzii</i>	<i>centromere H3 (CenH3)</i>	Forward primer: GCA GTA AGA ATT ACA GAC GCA GAG A Reverse primer: GTT GCA GTT TTA TTT GCT TTT TCC T TaqMan Probe: 5'FAM-TCT AGG TGG TGA GAT TAG-TAMRA3'	82
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>glutathione S-transferase Y-1 (GSTY-1)</i>	Forward primer: TCC TTT GCC AAC TCG GAT TT Reverse primer: TCG TCT TTG CAG AAC CAC ACA TaqMan Probe: 5'FAM-TGG CGC AAT GGT T-TAMRA3'	59

* FAM, 6-carboxyfluorescein; TAMRA, 6-carboxytetramethylrhodamine.

Table 4. Distribution of specialty cheeses selected from the province of Quebec.

Type of rind (surface)	Heat treatment of the milk		
	Raw	Thermized	Pasteurized
Washed	3 (C1 to C3)	5 (C4 to C8)	7 (C9 to C15)
Bloomy	3 (C16 to C18)	2 (C19, C20)	7 (C21 to C27)
Mixed*	0	2 (C28, C29)	0

*No raw or pasteurized mixed-rind cheeses were available at the time of sampling.

Table 5. Efficiency of each indigenous yeast qPCR assay.

Yeast species	Target gene	Dynamic range (gene copy/reaction)	qPCR efficiency (%)	R ²
<i>C. jadinii</i>	<i>CME1</i>	10 ⁰ to 10 ⁸	90.4 to 102.4	≥ 0.99
<i>K. servazzii</i>	<i>CenH3</i>	10 ⁰ to 10 ⁹	92.6 to 100.7	> 0.99
<i>P. kudriavzevii</i>	<i>GSTY-1</i>	10 ⁰ to 10 ⁹	91.5 to 105.3	≥ 0.99

Table 6. qPCR quantification of *C. jadinii* in specialty cheeses.

Type of rind	Milk heat treatment	Cheese number	Surface gene copies · cm ⁻²	Core gene copies · g ⁻¹	
Washed	raw	C2	4.7 ± 1.9 × 10 ¹	1.5 ± 1.3 × 10 ⁶	
		C3 ^d	3.6 ± 6.2	5.4 ± 9.4 × 10 ⁵	
		C4 ^a	< LOD*	1.6 ± 1.6 × 10 ⁶	
	thermized	C5	8.2 ± 3.4 × 10 ²	1.6 ± 0.2 × 10 ⁸	
		C6 ^b	< LOD	1.6 ± 2.8 × 10 ⁶	
		C7	0.6 ± 1.1 × 10 ¹	< LOD	
		C8 ^b	2.4 ± 4.2 × 10 ¹	1.3 ± 1.8 × 10 ⁶	
		pasteurized	C9 ^e	0.6 ± 1.0 × 10 ¹	< LOD
			C10 ^e	1.7 ± 0.8 × 10 ²	3.6 ± 1.3 × 10 ⁶
	C11		1.0 ± 1.8 × 10 ¹	1.0 ± 0.1 × 10 ⁷	
	Bloomy	raw	C12	< LOD	1.9 ± 1.1 × 10 ⁶
			C13	< LOD	1.5 ± 2.1 × 10 ⁶
			C14	1.0 ± 4.0 × 10 ¹	1.5 ± 1.6 × 10 ⁶
			C15	4.1 ± 7.0	2.8 ± 4.9 × 10 ⁶
			C16	8.8 ± 3.0	5.6 ± 0.8 × 10 ⁶
thermized		C17 ^d	1.6 ± 0.4 × 10 ⁴	3.8 ± 1.2 × 10 ⁷	
		C18	1.7 ± 2.9 × 10 ¹	1.4 ± 2.3 × 10 ⁶	
		C19	9.2 ± 2.3 × 10 ³	1.0 ± 0.1 × 10 ⁸	
		C20 ^c	0.9 ± 1.6 × 10 ¹	< LOD	
		pasteurized	C21	9.4 ± 8.1	3.4 ± 0.7 × 10 ⁶
C22	1.0 ± 1.7 × 10 ²		2.9 ± 2.0 × 10 ⁶		
C23	6.6 ± 5.5 × 10 ¹		1.6 ± 0.4 × 10 ⁶		
C24	0.9 ± 1.6 × 10 ¹		2.7 ± 0.4 × 10 ⁶		
C25	3.6 ± 3.6 × 10 ¹		5.1 ± 2.6 × 10 ⁶		
Mixed	thermized	C26	1.0 ± 1.7 × 10 ¹	2.8 ± 0.3 × 10 ⁶	
		C27	3.7 ± 2.1 × 10 ¹	2.4 ± 0.5 × 10 ⁶	
		C28	5.6 ± 7.5	2.7 ± 0.7 × 10 ⁶	
		C29 ^c	4.9 ± 8.4	3.0 ± 5.2 × 10 ⁶	

Cheese samples in which *C. jadinii* was not detected (in both the surface and core) are not presented. Cheeses with the same letter noted in superscript (a, b, c, d, e) were produced by the same cheese plant. Means and SDs were calculated from means of each of three biological replicates (3 technical replicates were performed per biological replicate) for the surfaces of each cheese variety, and from the means of values obtained from 3 technical replicates for each core (one biological replicate was sampled per cheese variety). *LOD: limit of detection

Table 7. qPCR quantification of *P. kudriavzevii* in specialty cheeses.

Type of rind	Milk heat - treatment	Cheese number	Surface gene copies · cm ⁻²	Core gene copies · g ⁻¹		
Washed	raw	C2	$3.9 \pm 6.7 \times 10^1$	< LOD*		
		C3 ^d	< LOD	$2.4 \pm 4.2 \times 10^5$		
	thermized	C4 ^a	< LOD	$1.08 \pm 0.20 \times 10^7$		
		C5	< LOD	$1.3 \pm 1.8 \times 10^7$		
		C6 ^b	< LOD	$4.3 \pm 7.4 \times 10^5$		
		C7	< LOD	$4.27 \pm 7.40 \times 10^6$		
		C8 ^b	< LOD	$0.6 \pm 1.1 \times 10^4$		
		C9 ^e	$1.4 \pm 2.4 \times 10^1$	$9.6 \pm 15.3 \times 10^6$		
	pasteurized	C10 ^e	< LOD	$3.71 \pm 0.54 \times 10^7$		
		C11	< LOD	$2.26 \pm 1.63 \times 10^7$		
		C13	< LOD	$1.6 \pm 2.6 \times 10^7$		
		C14	< LOD	$5.2 \pm 8.9 \times 10^5$		
		Bloomy	raw	C16	0.9 ± 1.5	$1.72 \pm 2.09 \times 10^7$
				C17 ^d	< LOD	$4.15 \pm 1.03 \times 10^7$
C18	5.1 ± 8.9			$1.33 \pm 1.15 \times 10^7$		
thermized	C19		< LOD	$8.76 \pm 1.29 \times 10^6$		
	C20 ^c		< LOD	< LOD		
pasteurized	C21		< LOD	$6.28 \pm 4.72 \times 10^6$		
	C22		< LOD	$7.7 \pm 7.3 \times 10^6$		
	C23	$1.2 \pm 2.1 \times 10^2$	$3.3 \pm 4.7 \times 10^5$			
	C24	< LOD	$1.59 \pm 1.19 \times 10^7$			
	C25	< LOD	$3.33 \pm 3.25 \times 10^6$			
		C26	< LOD	$1.4 \pm 1.4 \times 10^7$		
		C27	< LOD	$1.3 \pm 2.0 \times 10^7$		
	Mixed	thermized	C28	< LOD	$1.08 \pm 0.18 \times 10^7$	
			C29 ^c	$7.1 \pm 6.2 \times 10^1$	$2.41 \pm 1.25 \times 10^7$	

Cheese samples in which *P. kudriavzevii* was not detected (in both the surface and core) are not presented. Cheeses with the same letter noted in superscript (a, b, c, d, e) were produced by the same cheese plant. Means and SDs were calculated from means of each of three biological replicates (3 technical replicates were performed per biological replicate) for the surfaces of each cheese variety, and from the means of values obtained from 3 technical replicates for each core (one biological replicate was sampled per cheese variety). *LOD: limit of detection

Table 8. qPCR quantification of *K. servazzii* in specialty cheeses.

Type of rind	Milk heat-treatment	Cheese number	Surface gene copy·cm ⁻²	Core gene copy·g ⁻¹
Washed	pasteurized	C12	< LOD*	0.9 ± 1.6 × 10 ⁵
Mixed	thermized	C28	1.89 ± 0.51 × 10 ³	< LOD
		C29	0.6 ± 1.0 × 10 ¹	< LOD

Cheese samples in which *K. servazzii* was not detected (in both the surface and core) are not presented. Means and SDs were calculated from means of each of three biological replicates (3 technical replicates were performed per biological replicate) for the surfaces of each cheese variety, and from the means of values obtained from 3 technical replicates for each core (one biological replicate was sampled per cheese variety). *LOD: limit of detection

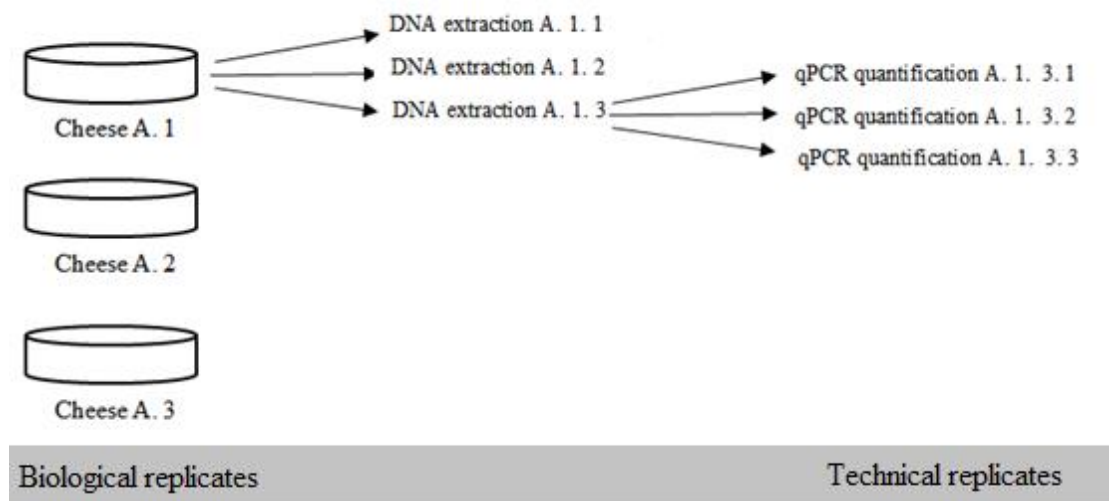


Figure 1. Schematization of analyses performed for each cheese variety. Nine qPCR quantifications were performed per surface (three technical replicates for each DNA extraction), thus 27 qPCR quantifications were obtained for each variety of cheese (Cheese A used for illustration). For core analysis, 10 g of a single biological repetition was used.

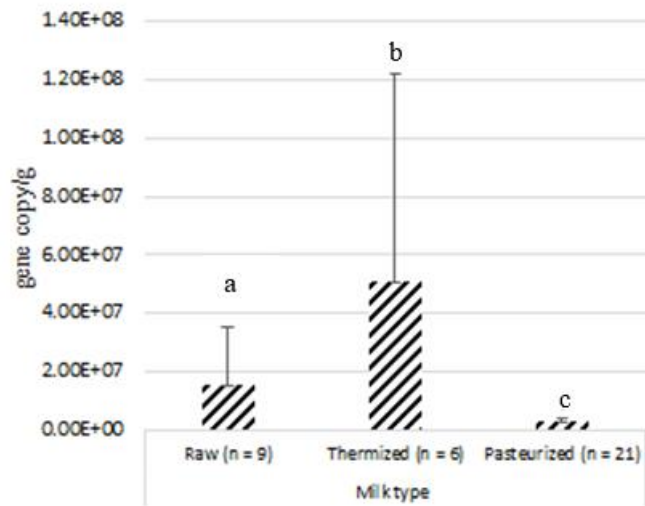


Figure 2. qPCR enumeration of *C. jadinii* in the cores of bloomy-rind cheeses. Different letters mean significant differences ($p < 0.01$) among core samples. Error bars represent standard errors (SD).

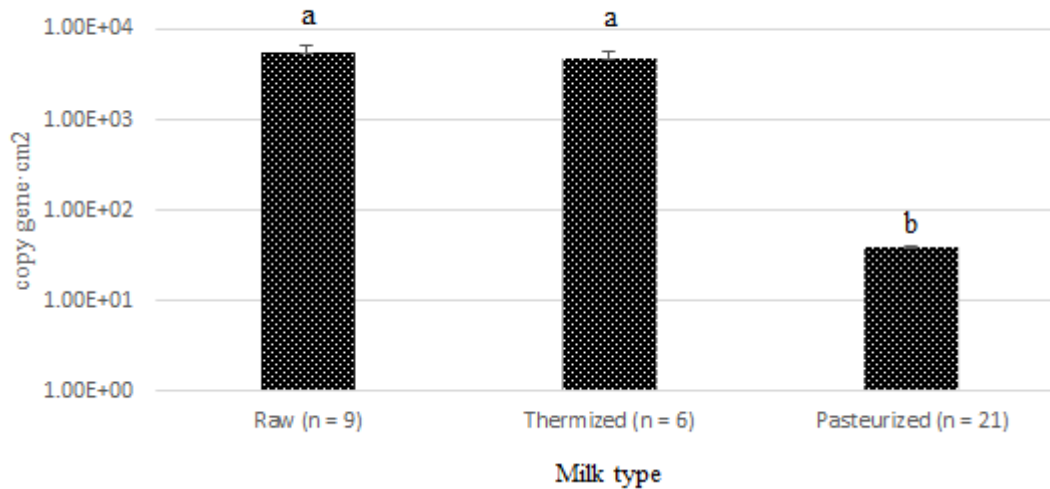


Figure 3. qPCR enumeration of *C. jadinii* on the surface of bloomy-rind specialty cheeses. Different letters mean significant differences ($p < 0.0001$) among surface samples. Error bars represent standard errors (SD).

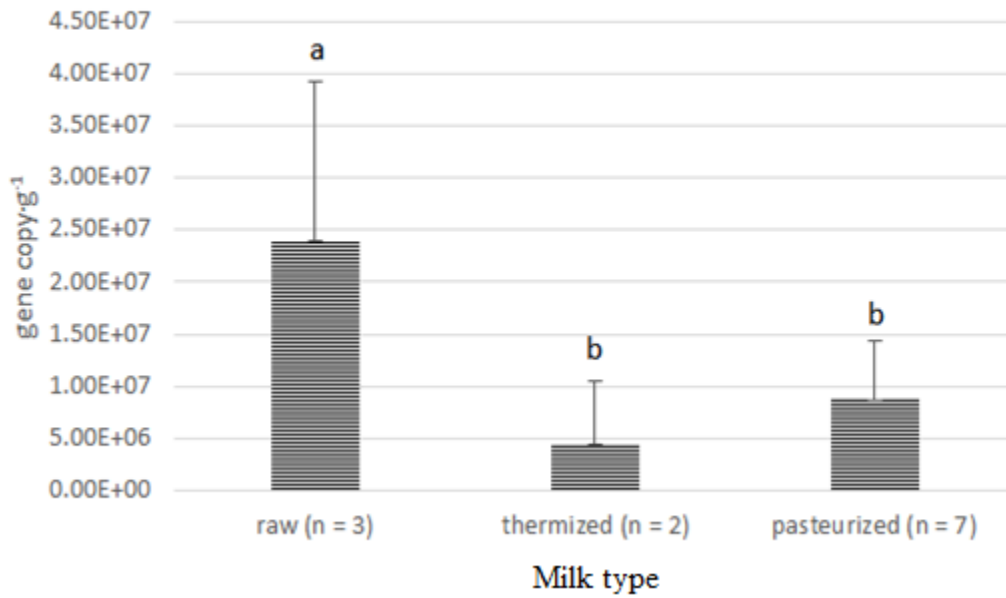


Figure 4. qPCR enumeration of *P. kudriavzevii* in the cores of bloomy-rind cheeses. Values were calculated from means of each variety of cheese (all three biological replicates of each individual cheese were included). Error bars represent standard deviations.

REFERENCES

- Al-Samarrai, T.H., and J. Schmid. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology* 30:53–56. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00664.x.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool 403–410.
- Beresford, T., and A. Williams. 2004. The microbiology of cheese ripening. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, and T.P. Guinee, ed. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press.
- Borelli, B.M., E.G. Ferreira, I.C.A. Lacerda, G.R. Franco, and C.A. Rosa. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1115–1119. doi:10.1007/s11274-006-9151-3.
- Bokulich, A. N., and D. A. Mills. 2013. Facility-specific “House” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and Environmental Microbiology* 79:5214–5223. doi:10.1128/AEM.00934-13.
- Büchl, N.R., and H. Seiler. 2011. *Yeasts and molds| yeasts in milk and dairy products*. Second Edition. J.W. Fuquay, ed. Academic Press, San Diego.
- Chamba, J.-F., and F. Irlinger. 2004. Secondary and adjunct cultures. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, and T.P. Guinee, ed. Academic Press.
- Chan, G.F., H.M. Gan, H.L. Ling, and N.A.A. Rashid. 2012. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryotic Cell* 11:1300–1301. doi:10.1128/EC.00229-12.
- Chen, L., J. Cui, Q. Ding, Y. Ma, L. Chen, J. Dong, T. Jiang, and J. Maubois. 2011. The effect of yeast species from raw milk in China on proteolysis and aroma compound formation in Camembert-type cheese. *Food and Bioprocess Technology* 5:2548–2556. doi:10.1007/s11947-011-0589-4.
- Chombo-Morales, P., M. Kirchmayr, A. Gschaedler, E. Lugo-Cervantes, and S. Villanueva-Rodríguez. 2016. Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food Science and Technology* 65:1153–1161. doi:10.1016/j.lwt.2015.09.044.
- Cogan, T.M., M. Hohenegger, M. Guéguen, R. Beduhn, E. Jamet, S. Goerges, M. Goodfellow, J. Mounier, S. Larpin, H. Sebastiani, J. Swings, N. Bora, M. Vancanneyt, J.-F. Chamba, M.C. Rea, S. Scherer, N. Desmasures, A.C. Ward, R. Gelsomino, and F. Irlinger. 2014. Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen cheeses. *Microbiology Spectrum* 2. doi:10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012.
- Delcenserie, V., B. Taminiau, L. Delhalle, C. Nezer, P. Doyen, S. Crevecoeur, D. Roussey, N. Korsak, and G. Daube. 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of Dairy Science* 97:6046–6056. doi:10.3168/jds.2014-8225.
- Dugat-Bony, E., L. Garnier, J. Denonfoux, S. Ferreira, A.-S. Sarthou, P. Bonnarme, and F. Irlinger. 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology* 238:265–273. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026.
- Fleet, G.H. 2011. Yeast Spoilage of Foods and Beverages. *The Yeasts* 5: 53-63 Elsevier.
- Fox, P.F. ed. . 2004. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1: General Aspects. 3. ed. Elsevier Academic, Amsterdam.
- Gkatzionis, K., R.S.T. Linforth, and C.E.R. Dodd. 2009. Volatile profile of Stilton cheeses: Differences between zones within a cheese and dairies. *Food Chemistry* 113:506–512. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.092.

- Gkatzionis, K., D. Yunita, R.S.T. Linforth, M. Dickinson, and C.E.R. Dodd. 2014. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology* 177:109–116. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016.
- Gonçalves Dos Santos, M.T.P., M.J. Benito, M. de G. Córdoba, N. Alvarenga, and S. Ruiz-Moyano Seco de Herrera. 2017. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches. *International Journal of Food Microbiology* 262:63–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013.
- Greppi, A., F. Saubade, C. Botta, C. Humblot, J.-P. Guyot, and L. Cocolin. 2017. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food Microbiology* 62:169–177. doi:10.1016/j.fm.2016.09.016.
- Groupe AGECO. 2006. Étude de la demande québécoise en fromages fins.
- Irlinger, F., S. Layec, S. Hélinck, and E. Dugat-Bony. 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS Microbiology Letters* 362:1–11. doi:10.1093/femsle/fnu015.
- Koné, M.K., S.T. Guéhi, N. Durand, L. Ban-Koffi, L. Berthiot, A.F. Tachon, K. Brou, R. Boulanger, and D. Montet. 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food Research International* 89:910–917. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010.
- Kurtzman, C.P. 2011a. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and yeast-like Taxa. *The Yeasts*. 13: 293-307 Elsevier.
- Kurtzman, C.P. 2011b. *Lindnera Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers* (2008). *The Yeasts* 42: 521-543 Elsevier.
- Kurtzman, C.P. 2011c. *Pichia E.C. Hansen* (1904). *The Yeasts* 57: 685-707 Elsevier.
- Larpin, S., C. Mondoloni, S. Goerges, J.-P. Vernoux, M. Guéguen, and N. Desmasures. 2006. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Research* 6:1243–1253. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00127.x.
- Larpin-Laborde, S., M. Imran, C. Bonaiti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges, F. Irlinger, M. Goodfellow, A.C. Ward, M. Vancanneyt, J. Swings, S. Scherer, M. Guéguen, and N. Desmasures. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian Journal of Microbiology* 57:651–660. doi:10.1139/w11-050.
- Lavoie, K., M. Touchette, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* 92:455–468. doi:10.1007/s13594-011-0051-4.
- Lessard, M.-H., G. Bélanger, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2012. The composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1813–1819. doi:10.1128/AEM.06645-11.
- Lessard, M.-H., C. Viel, B. Boyle, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2014. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. *BMC Genomics* 15:235. doi:10.1186/1471-2164-15-235.
- Lopandic, K., S. Zelger, L.K. Bánszky, F. Eliskases-Lechner, and H. Prillinger. 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.
- Lyumugabe, F., J.P. Uyisenga, E.B. Songa, and P. Thonart. 2014. Production of traditional sorghum beer “Ikigage” using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and *Issatchenkia orientalis* as starter cultures. *Food and Nutrition Sciences* 05:507–515. doi:10.4236/fns.2014.56060.
- Mei, J., Q. Guo, Y. Wu, and Y. Li. 2014. Microbial diversity of a Camembert-type cheese using freeze-dried Tibetan kefir coculture as starter culture by culture-dependent and culture-independent methods. *PLoS ONE* 9:e111648. doi:10.1371/journal.pone.0111648.

- Mónaco, S.M. del, M.E. Rodríguez, and C.A. Lopes. 2016. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International Journal of Food Microbiology* 230:31–39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.017>.
- Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D.A. Vuitton, N. Desmasures, and F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology* 177:136–154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.
- Padilla, B., P. Manzanares, and C. Belloch. 2014. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology* 38:160–166. doi:[10.1016/j.fm.2013.09.002](https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.002).
- Pangallo, D., N. Šaková, J. Koreňová, A. Puškárová, L. Kraková, L. Valík, and T. Kuchta. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of *Maybryndza* cheese. *International Journal of Food Microbiology* 170:38–43. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015).
- Prillinger, H., O. Molnar, F. Eliskases-Lechner, and K. Lopandic. 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75:267–283.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150:81–94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, C. Stanton, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, and P.D. Cotter. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37:664–698. doi:[10.1111/1574-6976.12030](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030).
- Romero-Gil, V., L. Rejano-Zapata, A. Garrido-Fernández, and F.N. Arroyo-López. 2016. Effect of zinc formulations, sodium chloride, and hydroxytyrosol on the growth/no-growth boundaries of table olive related yeasts. *Food Microbiology* 57:71–80. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.007>.
- SAS/STAT software. 2015. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmidt, J.L., J. Lenoir, and M. Schmidt. 1980. Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert (II). *Le Lait* 60:272–282. doi:[10.1051/lait:1980595-59616](https://doi.org/10.1051/lait:1980595-59616).
- Silva, C.F., R.F. Schwan, E. Sousa Dias, and A.E. Wheals. 2000. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 60:251–260. doi:[10.1016/S0168-1605\(00\)00315-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00315-9).
- Statistique Canada. 2017. Consommation de produits laitiers par habitant.
- Succi, M., A. Reale, C. Andrighetto, A. Lombardi, E. Sorrentino, and R. Coppola. 2003. Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour. *FEMS Microbiology Letters* 225:143–148. doi:[10.1016/S0378-1097\(03\)00500-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00500-7).
- Tofalo, R., G. Fasoli, M. Schirone, G. Perpetuini, A. Pepe, A. Corsetti, and G. Suzzi. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International Journal of Food Microbiology* 187:41–49. doi:[10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029).
- Tominaga, T. 2004. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 238:43–48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.015>.
- Tomita, Y., K. Ikeo, H. Tamakawa, T. Gojobori, and S. Ikushima. 2012. Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*. *PLoS ONE* 7:e37226. doi:[10.1371/journal.pone.0037226](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037226).
- Tornai-Lehoczki, J. 2003. CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology* 86:189–200. doi:[10.1016/S0168-1605\(03\)00256-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00256-3).
- Urbach, G. 1997. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology* 50:79–89.

- Vacheyrou, M., A.-C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, and Y. Bouton. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of Food Microbiology* 146:253–262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033>.
- Valdés-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 34:115–129. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01171-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01171-3).
- Vaughan-Martini, A., M.-A. Lachance, and C.P. Kurtzman. 2011. The Yeasts. *Kazachstania* Zubkova (1971). 34: 439-470. Elsevier.
- Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbès, and M.-C. Montel. 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26:305–310. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005>.
- Wolfe, B.E., J.E. Button, M. Santarelli, and R.J. Dutton. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for *In situ* and *In vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158:422–433. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>.
- Wyder, M.-T.M.-T., and Z. Puhán. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *International Dairy Journal* 9:117–124. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00032-1).
- Yurkov, A.M., M. Kemler, and D. Begerow. 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology* 5:24–35. doi:10.1016/j.funeco.2011.07.004.

Conclusion générale et perspective

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de ce mémoire ont permis d'étudier la distribution de *Cyberlindnera jadinii*, *Saccharomyces servazzii* et *Pichia kudriavzevii* dans 29 fromages de spécialités. Les résultats obtenus permettent non seulement d'apporter plus d'information sur la distribution de ces espèces dans des fromages de spécialités, mais aussi de mettre en perspective la contribution potentielle des levures indigènes sur la typicité des fromages québécois et leur importance dans la pâte des fromages.

Développement d'une méthode de quantification

La réalisation de ce projet a nécessité le développement d'un outil permettant de quantifier les trois espèces d'intérêt spécifiquement et de manière indépendante. La disponibilité des séquences génétiques reliées à différents gènes dans les bases de données publiques a facilité le démarrage de ce premier objectif. Le partage des séquences entre les membres de la communauté scientifique facilite l'acquisition de nouvelles connaissances à travers les différentes équipes ce qui peut permettre des avancées plus rapides en ce qui a trait aux rôles des levures dans les fromages. Le séquençage de gènes cibles entiers chez les souches isolées des fromages québécois a permis, par la biologie moléculaire, de créer des amorces et des sondes TaqMan sur mesure pour chacune des espèces. La méthode de PCR en temps-réel est rapide et ne nécessite pas les étapes de culture de la microbiologie traditionnelle. Cette nouvelle méthode pourra être utilisée lors d'études futures afin d'approfondir nos connaissances sur les impacts des levures indigènes dans les fromages ou pour toute autre matrice alimentaire. En effet, les amorces et les sondes de qPCR pourront être utilisées sur d'autres échantillons d'ADN.

Des sondes ont déjà été développées par le laboratoire de mycologie alimentaire de l'Université Laval pour les microorganismes suivants; *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum* (teleomorph, *Galactomyces candidus*), *Kluyveromyces lactis* et *Debaryomyces hansenii*. Ces derniers entrent dans la fabrication de différents fromages sous forme de ferments d'affinage. Il serait donc intéressant lors d'éventuelles recherches de suivre l'évolution de ces

microorganismes en plus des trois levures indigènes. Ainsi, il serait possible de mieux comprendre les interactions entre les espèces et d'observer si une synergie ou une compétition est présente entre les souches.

La principale limite de la méthode développée est liée aux séquences disponibles dans les bases de données et celles générées par séquençage lors du déroulement du projet. Il n'est pas certain que les amorces et la sonde développées détectent uniquement les espèces d'intérêts, et ce, pour tout type d'écosystème compte tenu de l'existence d'un grand nombre d'espèces. Par contre, les risques de détection de faux positifs sont limités par la technologie utilisée (TaqMan) comparativement à SYBR Green. De plus, les risques ont été minimisés par des tests PCR sur des espèces apparentées et par bioinformatique.

Un autre paramètre qui pourrait influencer la détection des espèces est la possibilité que les gènes ciblés soient présents en plusieurs copies dans le génome des levures ciblées. Ceci entraînerait une surestimation du nombre de microorganismes détectés. La probabilité que les gènes cibles se retrouvent à plusieurs endroits dans le génome est cependant faible puisque les gènes ciblés ne sont pas reconnus pour être en multiples copies dans les génomes des autres espèces. Cela pourra toutefois être vérifié lorsque les génomes des organismes ciblés seront complètement séquencés et assemblés. Cependant, l'objectif général a été atteint puisque l'idée était d'obtenir une image globale de la distribution des levures dans les fromages.

Analyse des fromages québécois

L'originalité de ce projet tient au fait qu'il s'agit de la première étude portant spécifiquement sur ces trois levures indigènes : *Cyberlindnera jadinii*, *Saccharomyces servazzii* et *Pichia kudriavzevii*. Dans la majorité des cas où ces levures ont été identifiées il s'agissait d'études portant sur la caractérisation des levures dans différents produits laitiers. Leur présence a pu être notée dans la littérature, mais il s'agit de la première fois où une étude porte spécifiquement sur leur distribution dans les fromages et qu'une quantification est réalisée.

Un second aspect novateur est l'étude de la surface (croûte) et de l'intérieur (pâte) des fromages. L'intérieur a peu été étudié en partie car la microflore semble moins complexe puisqu'elle n'est pas en contact constant avec l'environnement extérieur. Les résultats obtenus sont par contre très intéressants bien qu'un seul échantillon de pâte par type de fromage ait été analysé (étude prospective). *C. jadinii* et *P. kudriavzevii* se retrouvent à l'intérieur de la majorité des fromages analysés et en quantités assez élevées chez les fromages à croûte fleurie fabriqués avec un lait cru et/ou thermisé. Il serait intéressant qu'une étude portant sur leur contribution soit envisagée. Des quantités significativement plus faibles d'ADN par gramme de fromages sont observées lorsque le lait a été pasteurisé. Ainsi, il serait pertinent d'analyser qualitativement et quantitativement la microflore totale de la pâte des fromages échantillonnés dans cette étude. L'abondance relative des microorganismes pourrait nous permettre de mieux comprendre la place qu'occupent ces levures indigènes dans cet écosystème complexe comportant les ferments et les autres microorganismes indigènes (bactéries, d'autres levures et des moisissures). D'ailleurs, Mme Annick Raymond-Fleury étudie cet aspect lors de sa maîtrise et a utilisé les échantillons prélevés lors de cette étude comme base de travail. L'étude des voies métaboliques empruntées par l'ensemble des microorganismes couplé à la quantification des ferments et levures indigènes nous permettrait de mieux comprendre le dynamisme au sein des populations et les rôles des différentes espèces dans l'affinage des fromages.

Dans la présente étude, les comptes sous la limite de détection de l'appareil auraient pu être évités par des étapes de concentration et de dilution de l'ADN total pour les échantillons de pâtes (intérieur du fromage) et des croûtes respectivement. Ces étapes liées à la limite de détection de l'appareil de qPCR ont été mises de côté en raison de la quantité substantielle d'échantillons à analyser et de l'objectif général qui était d'évaluer la distribution et de chiffrer globalement *C. jadinii*, *S. servazzii* et *P. kudriavzevii*.

Une future étude ciblant la compréhension de la contribution de ces levures indigènes sur la flaveur et la texture des fromages permettrait de transposer les connaissances acquises aux transformateurs et aux fabricants de ferments. Il serait effectivement intéressant de connaître si les espèces identifiées ont un rôle bénéfique dans l'affinage des fromages. L'étude de ces

levures en culture pure, c'est-à-dire, en milieu contrôlé, permettrait de valider l'effet de ces levures précisément et non de l'écosystème microbien. Cela permettrait de répondre à certaines questions d'intérêts. Par exemple, comment sont leurs capacités à dégrader les protéines et la matière grasse des produits laitiers ? Ont-elles la capacité de modifier la texture des fromages ? Produisent-elles des composés aromatiques intéressants ? Aussi, à quelles concentrations ont-elles des effets intéressants ? L'étude de ces levures indigènes en écosystème serait aussi nécessaire pour comprendre comment elles se développent en présence des ferments lactiques et d'affinage. Ont-elles la capacité de dominer l'écosystème ? Est-ce qu'elles développent une synergie avec les ferments lactiques ou d'affinage ? Est-ce qu'une faible concentration est suffisante pour voir les effets recherchés (ex. protéolyse) ? Des tests d'inoculation à différentes concentrations permettraient de fixer un taux d'utilisation nécessaire. Dans cette optique, un fabricant de ferments pourrait commencer à commercialiser cette espèce après en avoir démontré l'innocuité pour satisfaire les besoins des fromagers et industriels laitiers. Ainsi, de nouveaux ferments pourraient amener une typicité et un élément distinctif aux fromages de spécialité provenant du Québec. À l'inverse, des études approfondies pourraient aussi révéler un impact négatif de ces souches pour la constance et la qualité des fromages produits. Dans ce cas, il serait pertinent d'analyser d'où proviennent ces souches non désirées. Des méthodes de nettoyage appropriées ainsi que des changements au niveau de la production des fromages seraient appliquées de manière à défavoriser leur développement.

Bibliographie

- Agriculture et Agroalimentaire Canada-DIA. 2016. Production moyenne basée sur les relevés sous contrôle laitier par pays. Gouvernement du Canada.
- Agropur Coopérative laitière. 2018. World championship cheese contest: Agropur rafle les honneurs dans cinq catégories avec ses fromages fins. <https://www.agropur.com/fr/nouvelles/toutes-les-nouvelles/world-championship-cheese-contest>.
- Al-Samarrai, T.H., and J. Schmid. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in applied microbiology* 30:53–56. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00664.x.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool 403–410.
- Antonsson, M., Y. Ardö, et G. Molin. 2001. A comparison between the microflora of Herrgård cheese from three different dairies. *Cheese ripening and technology* 11 (4): 285–91. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00058-9).
- Arfi, K., M-N. Leclercq-Perlat, A. Baucher, R. Tâche, J. Delettre et P. Bonnarme. 2004. Contribution of several cheese-ripening microbial associations to aroma compound production. *Lait*, n° 84 (août): 435–447. <https://doi.org/10.1051/lait:2004016>.
- Atanassova, M.R., C. Fernández-Otero, P. Rodríguez-Alonso, I.C. Fernández-No, J.I. Garabal, et J.A. Centeno. 2016. Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food microbiology* 53 (février): 172–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.012>.
- Bazinnet, L., Y. Pouliot, et F. Castaigne. 2010. Opérations unitaires. In *Science et technologie du lait, transformation du lait*, 2nd éd., 1:153–275. Montréal: Vignola, C.L.
- Beresford, T., et A. Williams. 2004. The Microbiology of Cheese Ripening. In *General Aspects*, édité par Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, Timothy M. Cogan, et Timothy P. Guinee, 1:287–317. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80071-X](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80071-X).
- Beresford, T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan, et T.M. Cogan. 2001. Recent Advances in Cheese Microbiology. *International dairy journal* 11 (4–7): 259–74. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).
- Borelli, B.M., E.G. Ferreira, I.C.A. Lacerda, G.R. Franco and C.A. Rosa. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World journal of microbiology and biotechnology* 22:1115–1119. doi:10.1007/s11274-006-9151-3.
- Bockelmann, W. 2011. Cheese | Smear-Ripened Cheeses. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), édité par John W. Fuquay, 753–66. San Diego: Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00089-3>.
- Bokulich, A. N., and D. A. Mills. 2013. Facility-specific “House” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. *Applied and environmental microbiology* 79:5214–5223. doi:10.1128/AEM.00934-13.
- Büchl, N.R., and H. Seiler. 2011. Yeasts and molds | yeasts in milk and dairy products. Second Edition. J.W. Fuquay, ed. Academic press, San Diego.
- Brennan, N. M., T. M. Cogan, M. Loessner, et S. Scherer. 2004. Bacterial surface-ripened cheeses. In *Major Cheese Groups*, édité par Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, Timothy M. Cogan, et Timothy P. Guinee, 2:199–225. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80045-9](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80045-9).
- Büchl, N. R., et H. Seiler. 2011. Yeasts and molds | Yeasts in milk and dairy products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), édité par John W. Fuquay, Second

- Edition, 744-53. San Diego: Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00498-2>.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, et al. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical chemistry* 55 (4): 611-22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Centre canadien d'information laitière. 2017. Le secteur de transformation. Gouvernement du Canada. http://www.dairyinfo.gc.ca/index_f.php?s1=dff-fcil&s2=proc-trans&s3=est-usi.
- Centre canadien d'information laitière. 2018a. Transformation de produits laitiers - fromage. Gouvernement du Canada. http://www.dairyinfo.gc.ca/index_f.php?s1=dff-fcil&s2=proc-trans&s3=psdp-pvpl&s4=cp-pf&page=prod_cprov.
- Centre canadien d'information laitière. 2018b. Répertoire des fromages canadiens. http://cheese-fromage.agr.gc.ca/op-po_fra.cfm.
- Centre canadien d'information laitière. 2018c. Fromage par variété au Canada. Gouvernement du Canada. http://www.dairyinfo.gc.ca/index_f.php?s1=dff-fcil&s2=proc-trans&s3=psdp-pvpl&s4=cp-pf&page=prod_var_can.
- Chamba, J.-F., et F. Irlinger. 2004. Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, édité par Patrick F. Fox, Paul L.H. McSweeney, Timothy M. Cogan, et Timothy P. Guinee, 1:191-206. Academic press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80068-X](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80068-X).
- Chan, G.F., H.M. Gan, H.L. Ling, and N.A.A. Rashid. 2012. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryotic cell* 11:1300-1301. doi:10.1128/EC.00229-12.
- Chen, L., J. Cui, Q. Ding, Y. Ma, L. Chen, J. Dong, T. Jiang, and J. Maubois. 2011. The effect of yeast species from raw milk in China on proteolysis and aroma compound formation in Camembert-type cheese. *Food and bioprocess technology* 5:2548-2556. doi:10.1007/s11947-011-0589-4.
- Chombo-Morales, P., M. Kirchmayr, A. Gschaedler, E. Lugo-Cervantes, and S. Villanueva-Rodríguez. 2016. Effects of controlling ripening conditions on the dynamics of the native microbial population of Mexican artisanal Cotija cheese assessed by PCR-DGGE. *LWT - Food science and technology* 65:1153-1161. doi:10.1016/j.lwt.2015.09.044.
- Cocolin, L., V. Alessandria, P. Dolci, R. Gorra, et K. Rantsiou. 2013. « Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation ». *FoodMicro 2012, 23rd International ICFMH Symposium, Global issues in food microbiology*, 3 - 7 September, 2012, Istanbul, Turkey. 167 (1): 29-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.008>.
- Codex Alimentarius. 2016. Norme générale codex pour le fromage. Codex Alimentarius.
- Cogan, T. M., M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of dairy research* 64 (3): 409-21. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002185>.
- Cogan, T.M., M. Hohenegger, M. Guéguen, R. Beduhn, E. Jamet, S. Goerges, M. Goodfellow, J. Mounier, S. Larpin, H. Sebastiani, J. Swings, N. Bora, M. Vancanneyt, J.-F. Chamba, M.C. Rea, S. Scherer, N. Desmasure, A.C. Ward, R. Gelsomino, and F. Irlinger. 2014. Biodiversity of the surface microbial consortia from Limburger, Reblochon, Livarot, Tilsit, and Gubbeen cheeses. *Microbiology spectrum* 2. doi:10.1128/microbiolspec.CM-0010-2012.
- Corsetti, A., J. Rossi, et M. Gobbetti. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *Yeast in dairy products* 69 (1): 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00567-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00567-0).
- Côté, J. 2016. Étude de l'impact de différents laits du terroir québécois et de leurs composantes sur la croissance de bactéries lactiques et de *Geotrichum candidum*. Université Laval.

- De Freitas, I., N. Pinon, J-L. Maubois, S. Lortal et A. Thierry. 2009. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *International journal of food microbiology* 129 (1): 37-42.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.026>.
- De Kruif, C.G., T. Huppertz, V.S. Urban et A.V. Petukhov. 2012. Casein Micelles and Their Internal Structure. *Advances in colloid and interface science* 171-172 (mars): 36-52.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002>.
- Deák, T. 1991. Foodborne Yeasts. In *advances in applied microbiology*, 36:179-278. Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70454-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70454-4).
- Dejmek, P., et P. Walstra. 2004. The syneresis of rennet-coagulated curd. In *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:71-103. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Delahunty, C.M., et M.A. Drake. 2004. Sensory character of cheese and its evaluation. In *cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:455-87. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Delcenserie, V., B. Taminiau, L. Delhalle, C. Nezer, P. Doyen, S. Crevecoeur, D. Roussey, N. Korsak, and G. Daube. 2014. Microbiota characterization of a Belgian protected designation of origin cheese, Herve cheese, using metagenomic analysis. *Journal of dairy science* 97:6046-6056.
[doi:10.3168/jds.2014-8225](https://doi.org/10.3168/jds.2014-8225).
- Donnelly, C.W. 2004. Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:541-59. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Dugat-Bony, E., L. Garnier, J. Denonfoux, S. Ferreira, A.-S. Sarthou, P. Bonnarme, and F. Irlinger. 2016. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of food microbiology* 238:265-273. [doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026).
- Ferreira, A. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured cheddar cheese. *International journal of food microbiology* 86 (1-2): 131-40. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00252-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00252-6).
- Feurer, C., F. Irlinger, H.E. Spinnler, P. Glaser, et T. Vallaëys. 2004. Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and RDNA-based methods. *Journal of applied microbiology* 97 (3): 546-56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x>.
- Feurer, C., T. Vallaëys, G. Corrieu, et F. Irlinger. 2004. Does smearing inoculum reflect the bacterial composition of the smear at the end of the ripening of a french soft, red-smear cheese? *Journal of dairy science* 87 (10): 3189-97. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73454-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73454-2).
- Fleet, G.H. 1990. Yeasts in Dairy Products. *Journal of applied bacteriology* 68 (3): 199-211.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x>.
- Fleet, G.H. 2011. Chapter 5 - Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In *The Yeasts* (Fifth Edition), édité par Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell, et Teun Boekhout, Fifth Edition, 53-63. London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00005-7>.
- Fleet, G.H. et M.A. Mian. 1987. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. *International journal of food microbiology* 4 (2): 145-55. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(87\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(87)90021-3).
- Fox, P.F. et A. Brodtkorb. 2008. The casein micelle: historical aspects, current concepts and significance ». *International dairy journal* 18 (7): 677-84.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.002>.
- Fox, P.F. et T.M. Cogan. 2004. Factors that affect the quality of cheese. In *cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:583-608. Amsterdam; London: Fox Patrick F.
- Frétin, M., B. Martin, E. Rifa, I. Verdier-Metz, D. Pomiès, A. Ferlay, M-C. Montel et C. Delbès. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific reports* 8 (200): 1- 11. DOI:10.1038/s41598-017-18447-y

- Garofalo, C., A. Osimani, V. Milanović, L. Aquilanti, F. De Filippis, G. Stellato, S. Di Mauro, B. Turchetti, P. Buzzini, D. Ercolini et F. Clementi. 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food microbiology* 49 (août): 123-33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.017>.
- Gkatzionis, K., R.S.T. Linforth, et C.E.R. Dodd. 2009. Volatile profile of Stilton cheeses: Differences between zones within a cheese and dairies. *Food chemistry* 113:506–512. doi:10.1016/j.foodchem.2008.07.092.
- Gkatzionis, K., D. Yunita, R.S.T. Linforth, M. Dickinson, et C.E.R. Dodd. 2014. Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International journal of food microbiology* 177:109–116. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.016.
- Gobbetti, M. 2004. Extra-hard varieties. In *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 2:51-70. Amsterdam; London: Fox Patrick F.
- Gobbetti, M., S. Lowney, E. Smacchi, B. Battistotti, P. Damiani, et P.F. Fox. 1997. Microbiology and biochemistry of taleggio cheese during ripening. *International dairy journal* 7 (8): 509-17. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00044-7](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00044-7).
- Goerges, S., J. Mounier, M. C. Rea, R. Gelsomino, V. Heise, R. Beduhn, T. M. Cogan, M. Vancanneyt, et S. Scherer. 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a south German red smear cheese. *Applied and environmental microbiology* 74 (7): 2210-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01663-07>.
- Gonçalves Dos Santos, M.T.P., M.J. Benito, M. de G. Córdoba, N. Alvarenga, and S. Ruiz-Moyano Seco de Herrera. 2017. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and -independent DNA approaches. *International journal of food microbiology* 262:63–70. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.013.
- Gori, K., M. Rysse, N. Arneborg et L. Jespersen. 2013. Isolation and identification of the microbiota of Danish farmhouse and industrially produced surface-ripened cheeses. *Microbial Ecology* 65 (3): 602-15. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0138-3>.
- Grappin, R. et E. Beuviel. 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International dairy journal* 7 (12): 751-61. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00006-5).
- Greppi, A., F. Saubade, C. Botta, C. Humblot, J.-P. Guyot, and L. Cocolin. 2017. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. *Food microbiology* 62:169–177. doi:10.1016/j.fm.2016.09.016.
- Groupe AGECO. 2006. Étude de la demande québécoise en fromages fins.
- Guinee, T. P., et P.F. Fox. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:207-59. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Guinee, T. P., et B. O'Brien. 2010. The quality of milk for cheese manufacture. In *Technology of cheesemaking*, édité par Barry A. Law et A. Y. Tamime, 1-67. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch1>.
- Head, I.M., J.R. Saunders, et R.W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology* 35 (1): 1-21. <https://doi.org/10.1007/s002489900056>.
- Heminthavong, K. 2015. Le mécanisme de la gestion de l'offre au Canada. Bibliothèque du Parlement.
- Hermet, A., J. Mounier, M. Keravec, V. Vasseur, G. Barbier, et J.L. Jany. 2014. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. *Food microbiology* 41 (août): 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.013>.

- Hickey, C.D., M.A.E. Auty, M.G. Wilkinson, et J.J. Sheehan. 2015. The influence of cheese manufacture parameters on cheese microstructure, microbial localisation and their interactions during ripening: A review. *Trends in food science & technology* 41 (2): 135-48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.10.006>.
- Horne, D.S. 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Current opinion in colloid & interface science* 11 (2-3): 148-53. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>.
- Horne, D.S., et J.M. Banks. 2004. Rennet-induced coagulation of milk. In *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3rd ed, 1:47-70. Amsterdam; London: Fox Patrick F.
- Irlinger, F., S. Layec, S. Hélinck, and E. Dugat-Bony. 2015. Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS microbiology letters* 362:1-11. doi:10.1093/femsle/fnu015.
- Jacques, N. et S.Casaregola. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products 126 (3): 321-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020>.
- Janhøj, T., et K. B. Qvist. 2010. The formation of cheese curd. In *technology of cheesemaking*, édité par Barry A. Law et A. Y. Tamime, 130-65. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444323740.ch4>.
- Jany, J-L., et Georges B. 2008. Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food microbiology* 25 (7): 839-48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.003>.
- Josefsen, M. H., C. Lofstrom, T. B. Hansen, L. S. Christensen, J. E. Olsen, et J. Hoorfar. 2010. Rapid quantification of viable campylobacter bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Applied and environmental microbiology* 76 (15): 5097-5104. <https://doi.org/10.1128/AEM.00411-10>.
- Juste, A, B Thomma, et B Lievens. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food microbiology* 25 (6): 745-61. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.009>.
- Koné, M.K., S.T. Guéhi, N. Durand, L. Ban-Koffi, L. Berthiot, A.F. Tachon, K. Brou, R. Boulanger, and D. Montet. 2016. Contribution of predominant yeasts to the occurrence of aroma compounds during cocoa bean fermentation. *Food research international* 89:910-917. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.010>.
- Kurtzman, C.P. 2011a. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and yeast-like Taxa. *The yeasts*. 13: 293-307 Elsevier.
- Kurtzman, C.P. 2011b. Lindnera Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). *The yeasts*, 521-43. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00042-2>.
- Kurtzman, C.P. 2011c. Pichia E.C. Hansen (1904). *The yeasts* 57: 685-707 Elsevier.
- Lamontagne, M., C. P. Champagne, J. Reitz-Ausseur, S. Moineau, N. Gardner, M. Lamoureux, Julie Jean, et I. Fliss. 2010. Microbiologie du lait. In *Science et technologie du lait, transformation du lait*, 2nd éd., 1:153-275. Montréal: Vignola, C.L.
- Larpin, S., C. Mondoloni, S. Goerges, J.-P. Vernoux, M. Guéguen, and N. Desmasures. 2006. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS yeast research* 6:1243-1253. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00127.x.
- Larpin-Laborde, S., M. Imran, C. Bonaïti, N. Bora, R. Gelsomino, S. Goerges, F. Irlinger, M. Goodfellow, A.C. Ward, M. Vancanneyt, J. Swings, S. Scherer, M. Guéguen, and N. Desmasures. 2011. Surface microbial consortia from Livarot, a French smear-ripened cheese. *Canadian journal of microbiology* 57:651-660. doi:10.1139/w11-050.
- Lavoie, K., M. Touchette, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy science & technology* 92:455-468. doi:10.1007/s13594-011-0051-4.

- Law, Barry A., et A. Y. Tamime, éd. 2010. Food science and technology. In Technology of cheesemaking, 483-84. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
<https://doi.org/10.1002/9781444323740.oth1>.
- Lawrence, R.C., J. Gilles, L.K. Creamer, V.L. Crow, H.A. Heap, C.G. Honoré, K.A. Johnston, et P.K. Samal. 2004. Cheddar cheese and related dry-salted cheese varieties. In Cheese chemistry, physics and microbiology, 3rd ed, 2:71 - 102. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Leclercq-Perlat, M., A. Oumer, J-L. Bergere, H-E. Spinnler et G. Corrieu. 1999. Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. Journal of dairy Research 66 (2): 271 - 81. <https://doi.org/10.1017/S0022029999003362>.
- Leclercq-Perlat, M.N., F. Buono, D. Lambert, E. Latrille, H.E. Spinnler, et G. Corrieu. 2004. Controlled production of Camembert-type cheeses. Part I: Microbiological and physicochemical evolutions 71 (3): 346 - 54.
- Leclercq-Perlat, M.N., G. Corrieu, et H-E. Spinnler. 2007. Controlled production of camembert-type cheeses: Part III role of the ripening microflora on free fatty acid concentrations. Journal of dairy research 74 (2): 218 - 25.
- Lessard, M-H., G. Bélanger, D. St-Gelais, et S. Labrie. 2012. The Composition of Camembert cheese-ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. Applied and environmental microbiology 78 (6): 1813 - 19. <https://doi.org/10.1128/AEM.06645-11>.
- Lessard, M.-H., C. Viel, B. Boyle, D. St-Gelais, and S. Labrie. 2014. Metatranscriptome analysis of fungal strains *Penicillium camemberti* and *Geotrichum candidum* reveal cheese matrix breakdown and potential development of sensory properties of ripened Camembert-type cheese. BMC Genomics 15:235. doi:10.1186/1471-2164-15-235.
- Li, L., J.A. Renye, L. Feng, Q. Zeng, Y. Tang, L. Huang, D. Ren et P. Yang. 2016. Characterization of the indigenous microflora in raw and pasteurized buffalo milk during storage at refrigeration temperature by high-throughput sequencing. Journal of dairy science 99 (9): 7016 - 24. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11041>.
- Lopandic, K., S. Zelger, L.K. Bánszky, F. Eliskases-Lechner, et H. Prillinger. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. Food microbiology 23 (4): 341 - 50. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.05.001>.
- Lucey, J.A. 2004. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In Cheese chemistry, physics and microbiology, 3rd ed, 1:105 - 22. Amsterdam ; London: Fox Patrick F.
- Lyumugabe, F., J.P. Uyisenga, E.B. Songa, and P. Thonart. 2014. Production of traditional sorghum beer “Ikigage” using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and *Issatckenkia orientalis* as starter cultures. Food and nutrition sciences 05:507 - 515. doi:10.4236/fns.2014.56060.
- Marilley, L., et M. G. Casey. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. International journal of food microbiology 90 (2): 139 - 59. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00304-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00304-0).
- Martin, N., C. Berger, C. Le Du, et H. E. Spinnler. 2001. Aroma compound production in cheese curd by coculturing with selected yeast and bacteria. Journal of dairy science 84 (10): 2125 - 35. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74657-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74657-7).
- McSweeney, P. L. H. 2011. Cheese | biochemistry of cheese ripening. In Encyclopedia of dairy sciences (Second Edition), édité par John W. Fuquay, Second Edition, 667 - 74. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00080-7>.
- McSweeney, P.L.H., et M.J. Sousa. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. Le Lait 80 (3): 293 - 324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>.

- Mei, J., Q. Guo, Y. Wu, and Y. Li. 2014. Microbial diversity of a Camembert-type cheese using freeze-dried Tibetan kefir coculture as starter culture by culture-dependent and culture-independent methods. *PLoS ONE* 9:e111648. doi:10.1371/journal.pone.0111648.
- Meunier-Goddik, L., et S. Sandra, éd. 2011. Liquid milk products, pasteurized milk. In *Encyclopedia of dairy sciences (Second Edition), Second Edition, 1627-32*. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00215-6>.
- Mónaco, S.M., M.E. Rodríguez, et C.A. Lopes. 2016. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. *International journal of food microbiology* 230: 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.017>.
- Monnet, C., S. Landaud, P. Bonnarme, et D. Swennen. 2015. Growth and adaptation of microorganisms on the cheese surface. *FEMS microbiology letters* 362 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu025>.
- Montel, M-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D.A. Vuitton, N. Desmases, et F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International journal of food microbiology* 177: 136-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.
- Montserrat, A-A., et B. Mietton. 2014. Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective. *Microbiology spectrum* 2 (1): 1-29. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012>.
- Mounier, J., R. Gelsomino, S. Goerges, M. Vancanneyt, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, S. Scherer, J. Swings, G. F. Fitzgerald, et T. M. Cogan. 2005. Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Applied and environmental microbiology* 71 (11): 6489-6500. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6489-6500.2005>.
- Mounier, J., C. Monnet, T. Vallaeys, R. Arditi, A.-S. Sarthou, A. Helias, et F. Irlinger. 2008. Microbial interactions within a cheese microbial community. *Applied and environmental microbiology* 74 (1): 172-81. <https://doi.org/10.1128/AEM.01338-07>.
- O'Sullivan, D.J., P.D. Cotter, O. O'Sullivan, L. Giblin, P.L.H. McSweeney, et J.J. Sheehan. 2015. Temporal and spatial differences in microbial composition during the manufacture of a continental-type cheese. Édité par M. W. Griffiths. *Applied and environmental microbiology* 81 (7): 2525-33. <https://doi.org/10.1128/AEM.04054-14>.
- Padilla, B., P. Manzanares, and C. Belloch. 2014. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food microbiology* 38:160-166. doi:10.1016/j.fm.2013.09.002.
- Panelli, S., E. Brambati, C. Bonacina, et M. Feligini. 2014. Updating on the fungal composition in Sardinian sheep's milk by culture-independent methods. *Journal of dairy research* 81 (02): 233-37. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000090>.
- Pangallo, D., N. Šaková, J. Koreňová, A. Puškárová, L. Kraková, L. Valík, and T. Kuchta. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of *May* bryndza cheese. *International journal of food microbiology* 170:38-43. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.015.
- Parente, E., et T. M. Cogan. 2004. Starter cultures: general aspects. In *general aspects*, édité par Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, T.M. Cogan, et Timothy P. Guinee, 1:123-47. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80065-4).
- Park, Y.W., M. Juárez, M. Ramos, et G.F.W. Haenlein. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep Milk. *Small ruminant research* 68 (1-2): 88-113. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.09.013>.

- Petersen, K. M., S. Westall, et L. Jespersen. 2002. Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *Journal of dairy science* 85 (3): 478-86. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74098-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74098-8).
- Poitras, E. et A. Houde. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications 2 (2): 2-11.
- Prillinger, H., O. Molnar, F. Eliskases-Lechner, and K. Lopandic. 1999. Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 267-283.
- Purko, M., W. O. Nelson, et W. A. Wood. 1951. The associative action between certain yeasts and *Bacterium Linens*. *Journal of dairy science* 34 (7): 699-705. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(51\)91768-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(51)91768-7).
- Quigley, L., R. McCarthy, O. O'Sullivan, T.P. Beresford, G.F. Fitzgerald, R.P. Ross, C. Stanton et P.D. Cotter. 2013. The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches. *Journal of dairy science* 96 (8): 4928-37. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6688>.
- Quigley, L., O. O'Sullivan, T.P. Beresford, R.P. Ross, G.F. Fitzgerald, et P.D. Cotter. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International journal of food microbiology* 150 (2): 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>.
- Reps, A. 1993. Bacterial surface-ripened cheeses. In *cheese: chemistry, physics and microbiology*, 2:137-72. Fox Patrick F.
- Rohm, H., F. Eliskases-Lechner, et M. Brauer. 1992. Diversity of yeasts in selected dairy products 72 (5): 370-76.
- Romero-Gil, V., L. Rejano-Zapata, A. Garrido-Fernández, et F. N. Arroyo-López. 2016. Effect of zinc formulations, sodium chloride, and hydroxytyrosol on the growth/no-growth boundaries of table olive related yeasts. *Food microbiology* 57: 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.01.007>.
- Roostita, R., et G. H. Fleet. 1996a. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International journal of food microbiology* 31 (1): 205-19. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00999-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00999-3).
- Roostita, R., et G. H. Fleet. 1996b. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *International journal of food microbiology* 28 (3): 393-404. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00018-6).
- Rudi, K., B. Moen, S. M. Dromtorp, et A. L. Holck. 2005. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and environmental microbiology* 71 (2): 1018-24. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005>.
- Rukke, E. O., T. Sørhaug, et L. Stepaniak. 2011. Heat treatment of milk| thermization of milk. *Encyclopedia of dairy sciences (Second Edition)*, édité par John W. Fuquay, Second Edition, 693-98. San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00215-6>.
- Ryssel, M., P. Johansen, W. Abu Al-Soud, S. Sørensen, N. Arneborg, et L. Jespersen. 2015. Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent techniques. *International journal of food microbiology* 215: 124-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.012>.
- SAS/STAT software. 2015. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmidt, J. L., J. Lenoir, et Michèle Schmidt. 1980. Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert (II). *Le Lait* 60 (595-596): 272-82. <https://doi.org/10.1051/lait:1980595-59616>.

- Schoch, C. L., K. A. Seifert, S. Huhndorf, V. Robert, J. L. Spouge, C. A. Levesque, W. Chen, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of sciences* 109 (16): 6241-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Silva, C.F., R.F. Schwan, E. Sousa Dias, and A.E. Wheals. 2000. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International journal of food microbiology* 60:251-260. doi:10.1016/S0168-1605(00)00315-9.
- Sørensen, L.M., K. Gori, M.A. Petersen, L. Jespersen et N. Arneborg. 2011. Flavour compound production by *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Debaryomyces hansenii* in a cheese-surface model. *International dairy journal* 21 (12): 970-78. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.06.005>.
- Sousa, M.J. 2003. Cheeses | surface mold-ripened cheese varieties. *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, 1122-29. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00807-5>.
- Spinnler, H.-E., et J.-C. Gripon. 2004. Surface mould-ripened cheeses. In *major cheese groups*, édité par Patrick F. Fox, Paul L. H. McSweeney, Timothy M. Cogan, et Timothy P. Guinee, 2:157-74. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Academic press. [https://doi.org/10.1016/S1874-558X\(04\)80043-5](https://doi.org/10.1016/S1874-558X(04)80043-5).
- Statistique Canada, et CANSIM. 2016. Le goût des fromages de spécialité. *Statistique Canada*. <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/11-402-x/2012000/chap/ag/ag02-fra.htm>.
- Statistique Canada. 2017. Consommation de produits laitiers par habitant.
- Šuranská, H., P. Raspor, K. Uroić, N. Golić, B. Kos, S. Mihajlović, J. Begović, J. Šušković, L. Topisirović, et N. Čadež. 2016. Characterisation of the yeast and mould biota in traditional white pickled cheeses by culture-dependent and independent molecular techniques. *Folia microbiologica* 61 (6): 455-63. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0455-x>.
- Sharpton, T.J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data, *Frontiers in plant science*. 5 (2014) 1-14. doi:10.3389/fpls.2014.00209
- Tofalo, R., G. Fasoli, M. Schirone, G. Perpetuini, A. Pepe, A. Corsetti, and G. Suzzi. 2014. The predominance, biodiversity and biotechnological properties of *Kluyveromyces marxianus* in the production of Pecorino di Farindola cheese. *International journal of food microbiology* 187:41-49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.029.
- Tominaga, T. 2004. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS microbiology letters* 238 (1): 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.015>.
- Tomita, Y., K. Ikeo, H. Tamakawa, T. Gojobori, and S. Ikushima. 2012. Genome and transcriptome analysis of the food-yeast *Candida utilis*. *PLoS ONE* 7:e37226. doi:10.1371/journal.pone.0037226.
- Tornai-Lehoczki, J. 2003. CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads ». *International journal of food Microbiology* 86 (1-2): 189-200. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00256-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00256-3).
- Urbach, G. 1997. The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: contribution of volatile compounds 50 (3): 79-89.
- Vacheyrou, M., A.-C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux, and Y. Bouton. 2011. Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms. *International Journal of food microbiology* 146:253-262. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033>.
- Valdés-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International journal of food microbiology* 34:115-129. doi:[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01171-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01171-3).

- Van Hoorde, K., M. Heyndrickx, P. Vandamme, et G. Huys. 2010. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food microbiology* 27 (3): 425-33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.001>.
- Vaughan-Martini, A., M.-A. Lachance, and C.P. Kurtzman. 2011. The Yeasts. *Kazachstania* Zubkova (1971). 34: 439-470. Elsevier.
- Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbès, et M-C Montel. 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food microbiology* 26 (3): 305-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.005>.
- Viljoen, B. C., A. R. Khoury, et A. Hattingh. 2003. Seasonal diversity of yeasts associated with white-surface mould-ripened cheeses. *Food research international* 36 (3): 275-83. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00169-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00169-2).
- Walstra, P. 1990. On the stability of casein micelles. *Journal of dairy science* 73 (8): 1965-79. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78875-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78875-3).
- Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International dairy journal* 9 (3-6): 189-92. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00059-X).
- Whitehead, H.R., et W.L. Harkness. 1954. The influence of variations in cheese-making procedure on the expulsion of moisture from Cheddar cheese curd, *Australian journal of dairy technology*, 9 (3): 103-7.
- Wolfe, B.E., J.E. Button, M. Santarelli, and R.J. Dutton. 2014. Cheese rind communities provide tractable systems for *In situ* and *In vitro* studies of microbial diversity. *Cell* 158:422-433. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.041>.
- Wyder, M.-T.M.-T., and Z. Puhán. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *International dairy journal* 9:117-124. doi:[https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00032-1).
- Yurkov, A.M., M. Kemler, et D. Begerow. 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungi and global change* 5 (1): 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2011.07.004>.