

Supplementary Materials

Investigation of freezing and freeze-drying for preserving and re-using a whole microbial cheese community

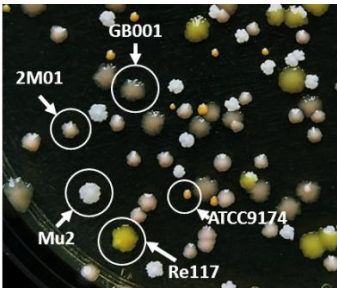
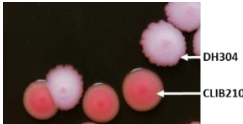

Wenfan Cao, Stéphanie Passot, Françoise Irlinger and Fernanda Fonseca

Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, F-911230 Palaiseau, France

Corresponding author: Fernanda Fonseca: Fernanda.fonseca@inrae.fr

Tables

Table S1. Aspect of the colonies of the ripening bacteria and yeasts in the cheese ecosystem.

Picture of colonies		Strain	Appearance of colony (Petri dish)
Ripening bacteria BHI agar Amphotericin B (50 mg.L ⁻¹)		<i>G. arilaitensis</i> Re117	Yellow, shiny
		<i>B. aurantiacum</i> ATCC9174	Orange, small, shiny
		<i>C. casei</i> 2M01	Off-white, domed, shiny, with a nipple in the center of the colony
		<i>H. alvei</i> GB001	Ivory white, translucent, large, flat, shiny
		<i>S. equorum</i> Mu2	Titanium white, flat
Ripening yeasts YEGC agar TTC (10 mg.L ⁻¹)		<i>D. hansenii</i> DH304	Domed, matt, pinkish-white, with a nipple in the center of the colony
		<i>K. lactis</i> CLIB210	Domed, shiny, red in the center, translucent at the edge
		<i>G. candidum</i> ATCC204307	Filamentous, pinkish

BHI: brain heat infusion; YEGC: yeast extract glucose chloramphenicol; TTC: 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride.

Table S2. Culturability losses (log CFU.g⁻¹) of fresh and ripened cheese ecosystems after freezing at -80 °C, -20 °C and freeze-drying samples protected (MD, maltodextrin) and non-protected (S, saline solution).

Strain	Freezing -80 °C				Freezing -20 °C				Freeze-drying			
	Fresh cheese		Ripened cheese		Fresh cheese		Ripened cheese		Fresh cheese		Ripened cheese	
	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S
<i>G. arilaitensis</i>	-0,40 ^a	-0,42 ^{ab}	-0,59 ^a	-0,74 ^{ab}	-0,88 ^{abcd}	-1,11 ^{abcd}	-0,69 ^a	-0,85 ^{abc}	-1,51 ^{bcd}	-1,67 ^{cd}	-1,34 ^{abcd}	-2,33 ^d
IQR	0,74	1,03	0,08	0,20	0,94	1,71	0,16	0,11	0,70	1,19	0,26	0,45
<i>B. aurantiacum</i>	-0,14 ^{ab}	-0,14 ^{abc}	-0,10 ^a	-0,25 ^{ab}	-0,77 ^{abc}	-0,77 ^{bcd}	-0,22 ^{abc}	-0,47 ^{abc}	-1,21 ^d	-1,55 ^d	-0,66 ^{bcd}	-0,81 ^{cd}
IQR	0,30	0,44	0,04	0,07	0,44	0,82	0,07	0,07	0,45	0,74	0,31	0,20
<i>C. casei</i>	-0,36 ^{abcd}	-0,22 ^{abc}	0,00 ^a	-0,10 ^{ab}	-2,12 ^{ef}	-2,48 ^{ef}	-0,11 ^{ab}	-0,48 ^{bcde}	-1,51 ^{cdef}	-1,56 ^{ef}	-1,51 ^{def}	-1,95 ^f
IQR	0,65	0,71	0,02	0,10	1,20	1,38	0,08	0,11	0,24	0,60	0,24	0,12
<i>H. alvei</i>	-0,05 ^{ab}	-0,03 ^{ab}	0,00 ^a	-0,19 ^{ab}	-0,05 ^{ab}	-0,30 ^b	-0,23 ^{ab}	-0,40 ^{bc}	-1,13 ^{cd}	-1,30 ^{cd}	-1,56 ^d	-2,11 ^d
IQR	0,15	0,15	0,06	0,07	0,13	0,40	0,17	0,17	0,19	0,12	0,10	0,27
<i>S. equorum</i>	-0,10 ^{ab}	-0,06 ^{ab}	-0,10 ^{ab}	-0,05 ^a	-0,05 ^{ab}	-0,22 ^{abc}	-0,25 ^{bcd}	-0,20 ^{abc}	-0,71 ^{de}	-0,85 ^e	-0,73 ^{cde}	-0,30 ^{bcd}
IQR	0,14	0,15	0,02	0,04	0,18	0,23	0,05	0,14	0,09	0,17	0,15	0,34
<i>K. lactis</i>	0,00 ^a	-0,02 ^a	ND	ND	-0,82 ^a	-1,16 ^a	ND	ND	-0,34 ^a	-0,66 ^a	ND	ND
IQR	0,13	0,20			0,71	1,13			0,48	0,48		
<i>D. hansenii</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	ND	ND	-0,22 ^{ab}	-0,25 ^{abc}	ND	ND	-0,83 ^c	-0,59 ^{bc}	ND	ND
IQR	0,15	0,20			0,17	0,45			0,10	0,42		
<i>G. candidum</i>	-0,05 ^a	-0,12 ^a	-0,13 ^a	-0,33 ^b	-0,04 ^a	-0,13 ^a	-0,11 ^a	-0,15 ^a	-0,67 ^b	-1,92 ^b	-0,43 ^b	-0,67 ^b
IQR	0,03	0,11	0,06	0,06	0,05	0,04	0,10	0,12	0,66	0,80	0,06	0,05
<i>L. lactis</i> (S3+/S3-)	-0,01 ^a	-0,09 ^{ab}	-0,12 ^{ab}	-0,19 ^{abc}	-0,11 ^{ab}	-0,42 ^{abc}	-0,47 ^{abc}	-0,60 ^{bcd}	-0,62 ^{cde}	-0,76 ^{de}	-0,66 ^{de}	-0,86 ^e
IQR	0,07	0,15	0,09	0,09	0,17	0,18	0,25	0,31	0,11	0,15	0,32	0,30

Data presented are medians of three biological replicates and two technical replicates; IQR: interquartile ranges. Superscript letters (a, b, c, d, e, f) represent statistical differences (at the 95 % confidence level) for each micro-organism between all conditions: production step (fresh and ripened), formulation (S or MD) and stabilization conditions (freezing and freeze-drying). ND: not detected in RC samples (Day 22) due to the development of *G. candidum*.

Table S3. Culturability losses (log CFU.g⁻¹) of fresh and ripened cheese ecosystems after freezing at -80 °C, -20 °C and freeze-drying samples protected (MD, maltodextrin) and non-protected (S, saline solution).

Strain	Freezing -80 °C				Freezing -20 °C				Freeze-drying			
	Fresh cheese		Ripened cheese		Fresh cheese		Ripened cheese		Fresh cheese		Ripened cheese	
	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S
<i>G. arilaitensis</i>	-0,40 ^a	-0,42 ^a	-0,59 ^c	-0,74 ^d	-0,88 ^{ab}	-1,11 ^a	-0,69 ^b	-0,85 ^c	-1,51 ^d	-1,67 ^c	-1,34 ^b	-2,33 ^c
IQR	0,74	1,03	0,08	0,20	0,94	1,71	0,16	0,11	0,70	1,19	0,26	0,45
<i>B. aurantiacum</i>	-0,14 ^a	-0,14 ^a	-0,10 ^{ab}	-0,25 ^c	-0,77 ^{ab}	-0,77 ^a	-0,22 ^a	-0,47 ^{bc}	-1,21 ^{cd}	-1,55 ^{bc}	-0,66 ^a	-0,81 ^{ab}
IQR	0,30	0,44	0,04	0,07	0,44	0,82	0,07	0,07	0,45	0,74	0,31	0,20
<i>C. casei</i>	-0,36 ^a	-0,22 ^a	0,00 ^a	-0,10 ^{ab}	-2,12 ^b	-2,48 ^a	-0,11 ^a	-0,48 ^{bc}	-1,51 ^{cd}	-1,56 ^{bc}	-1,51 ^b	-1,95 ^c
IQR	0,65	0,71	0,02	0,10	1,20	1,38	0,08	0,11	0,24	0,60	0,24	0,12
<i>H. alvei</i>	-0,05 ^a	-0,03 ^a	0,00 ^{ab}	-0,19 ^{bc}	-0,05 ^{ab}	-0,30 ^a	-0,23 ^a	-0,40 ^{ab}	-1,13 ^{bcd}	-1,30 ^{abc}	-1,56 ^b	-2,11 ^c
IQR	0,15	0,15	0,06	0,07	0,13	0,40	0,17	0,17	0,19	0,12	0,10	0,27
<i>S. equorum</i>	-0,10 ^a	-0,06 ^a	-0,10 ^b	-0,05 ^a	-0,05 ^a	-0,22 ^a	-0,25 ^{ab}	-0,20 ^{ab}	-0,71 ^{ab}	-0,85 ^{ab}	-0,73 ^a	-0,30 ^a
IQR	0,14	0,15	0,02	0,04	0,18	0,23	0,05	0,14	0,09	0,17	0,15	0,34
<i>K. lactis</i>	0,00 ^a	-0,02 ^a	ND	ND	-0,82 ^{ab}	-1,16 ^a	ND	ND	-0,34 ^a	-0,66 ^a	ND	ND
IQR	0,13	0,20			0,71	1,13			0,48	0,48		
<i>D. hansenii</i>	0,00 ^a	0,00 ^a	ND	ND	-0,22 ^{ab}	-0,25 ^a	ND	ND	-0,83 ^{abc}	-0,59 ^{ab}	ND	ND
IQR	0,15	0,20			0,17	0,45			0,10	0,42		
<i>G. candidum</i>	-0,05 ^a	-0,12 ^a	-0,13 ^b	-0,33 ^d	-0,04 ^a	-0,13 ^a	-0,11 ^a	-0,15 ^a	-0,67 ^{abc}	-1,92 ^{abc}	-0,43 ^a	-0,67 ^a
IQR	0,03	0,11	0,06	0,06	0,05	0,04	0,10	0,12	0,66	0,80	0,06	0,05
<i>L. lactis</i> (S3+/S3-)	-0,01 ^a	-0,09 ^a	-0,12 ^{bc}	-0,19 ^{bc}	-0,11 ^{ab}	-0,42 ^a	-0,47 ^{ab}	-0,60 ^{ab}	-0,62 ^a	-0,76 ^a	-0,66 ^a	-0,86 ^b
IQR	0,07	0,15	0,09	0,09	0,17	0,18	0,25	0,31	0,11	0,15	0,32	0,30

Data presented are medians of three biological replicates and two technical replicates; IQR: interquartile ranges. Superscript letters (a, b, c, d, e, f) represent statistical differences (at the 95 % confidence level) among micro-organisms, for each production/stabilization condition (column): production step (fresh and ripened), formulation (S or MD) and stabilization conditions (freezing and freeze-drying). ND: not detected in RC samples (Day 22) due to the development of *G. candidum*.

Table S4. Cell concentration (in CFU.g⁻¹) of the micro-organisms in the fresh and ripened cheese samples before stabilization.

	Cell concentration (CFU.g ⁻¹)	
	Fresh cheese	Ripened cheese
<i>G. arilaitensis</i>	7.9×10 ⁵	2.97×10 ⁷
IQR	2.19×10 ⁵	2.07×10 ⁷
<i>B. aurantiacum</i>	3.40×10 ⁵	5.66×10 ⁷
IQR	1.85×10 ⁵	8.57×10 ⁶
<i>C.casei</i>	2.09×10 ⁶	1.58×10 ⁹
IQR	9.48×10 ⁵	7.83×10 ⁷
<i>H. alvei</i>	1.31×10 ⁶	1.71×10 ⁸
IQR	3.05×10 ⁵	6.96×10 ⁷
<i>S. equorum</i>	1.36×10 ⁶	9.07×10 ⁷
IQR	1.96×10 ⁵	5.90×10 ⁷
<i>K. lactis</i>	8.60×10 ⁶	2.50.10 ⁵ *
IQR	9.75×10 ⁵	1.50×10 ⁵
<i>D. hansenii</i>	1.44×10 ⁷	1.77×10 ⁶
IQR	5.40.10 ⁶	1.83×10 ⁶
<i>G. candidum</i>	8.80×10 ⁴	1.01.10 ⁸
IQR	6.75×10 ⁵	2.16×10 ⁷
<i>L. lactis</i> (S3+/S3-)	4.49×10 ⁹	4.20×10 ⁸
IQR	2.37×10 ⁹	1.56×10 ⁸

Data presented are medians of three biological replicates and two technical replicates; IQR: interquartile ranges. * *K. lactis* was detected in only two biological replicates.

Table S5. Culturability losses (log CFU.g⁻¹) after 1-month storage of the fresh cheese ecosystem samples protected (MD, maltodextrin) and non-protected (S, saline solution), stabilized and stored frozen (-80 °C and -20 °C) and freeze-dried (4 °C and 25 °C).

Strain	Frozen -80 °C		Frozen -20 °C		Freeze-dried 4 °C		Freeze-dried 25 °C	
	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S
<i>G. arilaitensis</i>	-0,18 ^a	-0,09 ^a	-0,28 ^a	-1,00 ^{ab}	-1,79 ^{bc}	-0,77 ^{ab}	-2,09 ^c	-1,93 ^{bc}
IQR	0,12	0,37	0,14	0,83	0,57	0,52	0,31	0,80
<i>B. aurantiacum</i>	-0,10 ^a	0,00 ^a	-0,18 ^a	-0,09 ^{ab}	-2,33 ^{bc}	-0,97 ^{ab}	-3,06 ^b	-2,26 ^{bc}
IQR	0,11	0,06	0,06	0,18	0,79	0,61	0,58	0,76
<i>C.casei</i>	-0,12 ^a	-0,26 ^a	-1,00 ^{bc}	-0,78 ^b	-1,26 ^{bc}	-0,49 ^a	-2,21 ^d	-1,63 ^{cd}
IQR	0,07	0,24	0,19	0,15	0,40	0,31	0,38	0,33
<i>H. alvei</i>	-0,02 ^a	-0,24 ^{bc}	-0,07 ^{bc}	-0,80 ^c	-1,41 ^d	-0,71 ^c	-3,69 ^e	-3,39 ^{de}
IQR	0,01	0,12	0,10	0,43	0,36	0,29	0,09	0,31
<i>S. equorum</i>	-0,01 ^a	-0,25 ^{ab}	-0,08 ^a	-0,08 ^a	-1,57 ^{cd}	-0,69 ^{bc}	-2,19 ^e	-1,25
IQR	0,12	0,03	0,20	0,34	0,13	0,34	0,19	0,23
<i>K. lactis</i>	0,00 ^{ab}	0,00 ^a	-2,51 ^{cd}	-2,36 ^d	-0,57 ^{bc}	-0,01 ^{ab}	-0,84 ^{cd}	-0,65 ^{cd}
IQR	0,16	0,29	1,54	1,19	0,37	0,07	0,19	0,20
<i>D. hansenii</i>	-0,42 ^a	-0,09 ^a	-0,36 ^a	-0,04 ^a	-0,60 ^a	-0,08 ^a	-1,04 ^a	-0,84 ^a
IQR	0,16	0,26	0,39	0,49	0,32	0,55	0,46	0,66
<i>G. candidum</i>	-0,02 ^a	-0,20 ^{ab}	-0,35 ^{abc}	-1,07 ^c	-0,36 ^{abc}	-0,23 ^{ab}	-0,75 ^{abc}	-0,87 ^{bc}
IQR	0,12	0,15	0,28	0,31	0,22	0,07	0,29	0,44
<i>L. lactis</i>	-0,13 ^{ab}	-0,05 ^a	0,00 ^a	-0,25 ^{ab}	-0,35 ^{bc}	-0,07 ^a	-0,68 ^c	-0,70 ^c
IQR	0,12	0,05	0,12	0,18	0,05	0,05	0,12	0,21

Data presented are medians three biological replicates and two technical replicates; IQR: interquartile ranges. Superscript letters (a, b, c, d) represent statistical differences (at the 95 % confidence level) for each micro-organism between all conditions: formulation (S or MD) and storage conditions (-80 °C and -20 °C, frozen samples; 4 °C and 25 °C, freeze-dried samples)

Table S6. Culturability losses (log CFU.g⁻¹) after 1-month storage of the ripened cheese ecosystem samples protected (MD, maltodextrin) and non-protected (S, saline solution), stabilized and stored frozen (-80 °C and -20 °C) and freeze-dried (4 °C and 25 °C).

Strain	Frozen -80 °C		Frozen -20 °C		Freeze-dried 4 °C		Freeze-dried 25 °C	
	MD	S	MD	S	MD	S	MD	S
<i>G. arilaitensis</i>	0,00 ^a	-0,01 ^a	-0,75 ^b	-0,54 ^b	-0,86 ^b	-0,98 ^b	-2,84 ^c	-1,70 ^c
IQR	0,06	0,05	0,33	0,31	0,11	0,14	0,32	0,11
<i>B. aurantiacum</i>	-0,10 ^{ab}	-0,06 ^a	-0,12 ^b	-0,17 ^{ab}	-0,98 ^c	-1,37 ^c	-2,25 ^d	-2,11 ^d
IQR	0,12	0,04	0,06	0,09	0,20	0,35	0,21	0,61
<i>C. casei</i>	-0,04 ^a	-0,03 ^a	-0,09 ^a	-0,37 ^b	-1,82 ^c	-1,47 ^c	-2,90 ^d	-3,81 ^d
IQR	0,02	0,08	0,11	0,11	0,18	0,39	0,15	0,38
<i>H. alvei</i>	-0,01 ^{ab}	0,00 ^a	-0,09 ^b	-0,57 ^c	-0,74 ^c	-0,68 ^c	-2,48 ^d	-2,31 ^d
IQR	0,12	0,00	0,01	0,10	0,18	0,51	0,37	0,31
<i>S. equorum</i>	-0,04 ^a	-0,15 ^{ab}	0,00 ^a	-0,01 ^a	-0,62 ^{bcd}	-0,50 ^{bc}	-1,51 ^{cd}	-1,60 ^d
IQR	0,04	0,07	0,03	0,06	0,21	0,40	0,32	0,59
<i>G. candidum</i>	-0,10 ^a	-0,14 ^a	-0,04 ^a	-0,08 ^a	-0,11 ^a	-0,11 ^a	-0,33 ^a	-0,19 ^a
IQR	0,08	0,05	0,11	0,09	0,07	0,11	0,14	0,07
<i>L. lactis</i>	-0,02 ^{ab}	-0,01 ^{ab}	0,00 ^a	0,00 ^a	-0,38 ^{bc}	-0,31 ^{abc}	-0,82 ^c	-1,06 ^c
IQR	0,09	0,10	0,00	0,08	0,14	0,36	0,22	0,40

Data presented are medians three biological replicates and two technical replicates; IQR: interquartile ranges.

Superscript letters (a, b, c, d) represent statistical differences (at the 95 % confidence level) for each micro-organism between all conditions: formulation (S or MD) and storage conditions (-80 °C and -20 °C, frozen samples; 4 °C and 25 °C, freeze-dried samples)

Figures

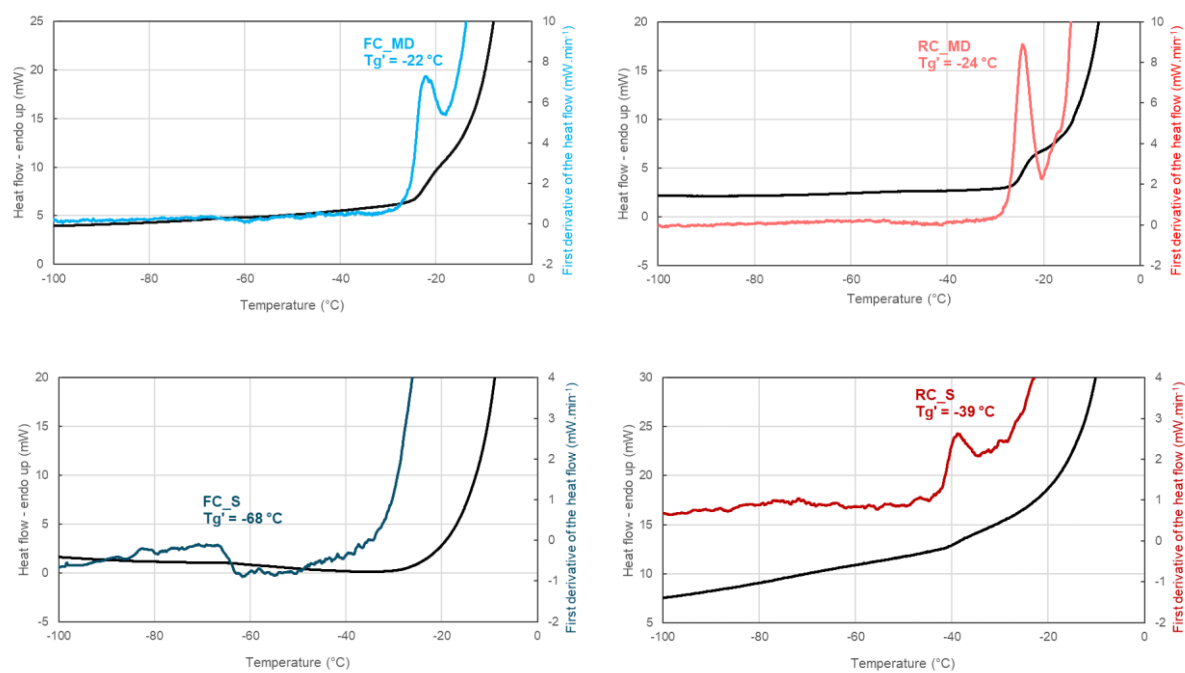


Figure S1. Glass transition temperatures of freeze-concentrated samples of fresh (FC, blue) and ripened (RC, red) cheese obtained from the first derivatives of DSC the heat flow curves. MD: maltodextrin (light color); S: saline solution (dark color).

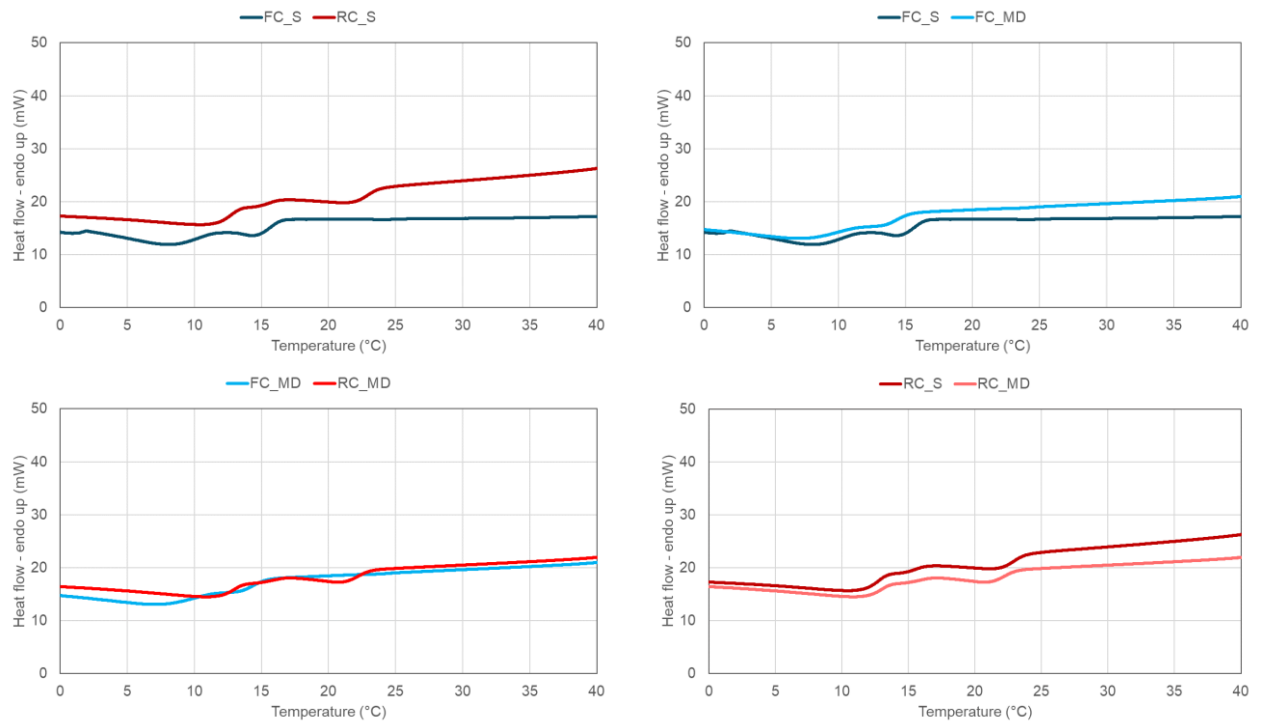
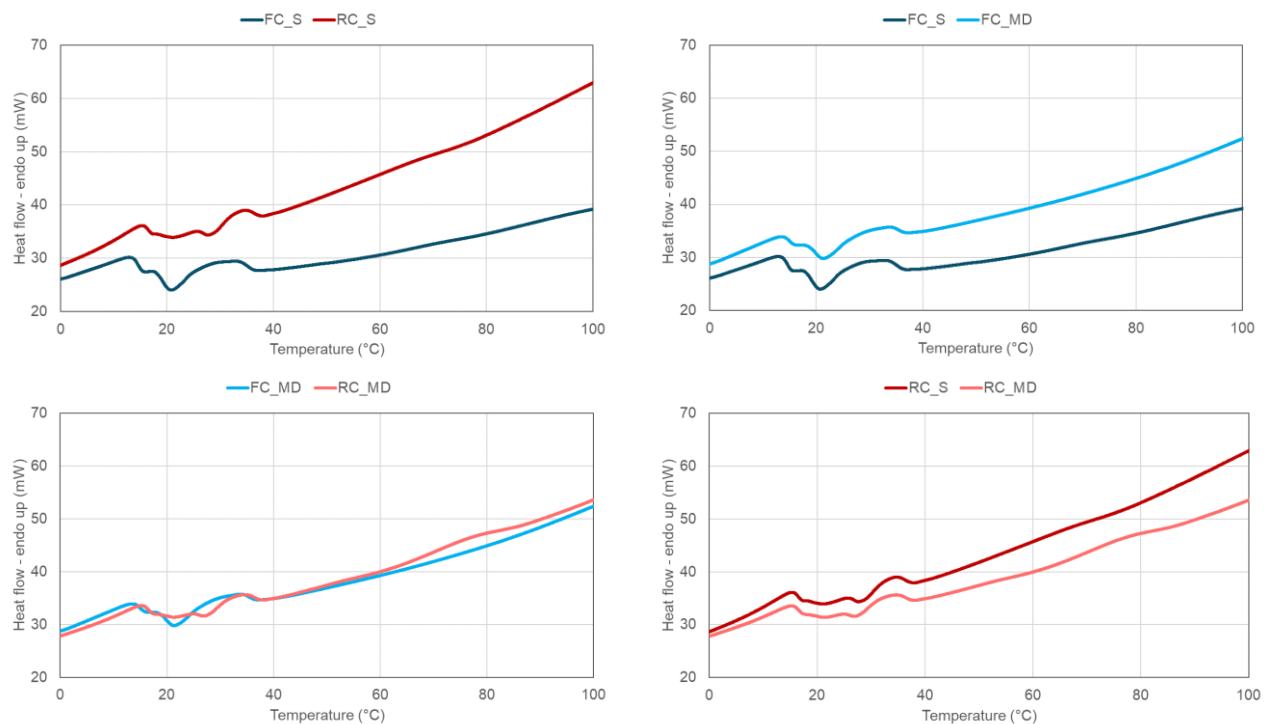
a**b**

Figure S2. Thermal events observed by DSC in freeze-dried samples of fresh (FC, blue) and ripened (RC, red) cheese during (a) cooling from 40 to 0 °C and (b) heating (0 to 100 °C). Each subpanel enables the visual evaluation of the behavior of freeze-dried fresh and ripened samples with maltodextrin (MD, light color) or saline solution (S, dark color).