



HAL
open science

Développement et assemblage de ferments autochtones d'intérêt technologique en mobilisant la diversité microbienne locale

Anna Grizon

► **To cite this version:**

Anna Grizon. Développement et assemblage de ferments autochtones d'intérêt technologique en mobilisant la diversité microbienne locale. Microbiologie et Parasitologie. Université Clermont Auvergne, 2024. Français. NNT : 2024UCFA0033 . tel-04727537

HAL Id: tel-04727537

<https://theses.hal.science/tel-04727537v1>

Submitted on 9 Oct 2024

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

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

École doctorale Science de la vie, Santé, Agronomie, Environnement

Thèse

Présentée à l'Université Clermont Auvergne

pour l'obtention du grade de **Docteur**

16 mai 2023

Développement et assemblages de ferments autochtones d'intérêt technologique en mobilisant la diversité microbienne locale

Anna Grizon

Membres du jury

Rapporteuse :	Monika Coton	Professeure, Université de Bretagne Occidentale
	Nathalie Desmasures	Professeure, Université de Caen Normandie
Examineur :	Frederic Borges	Maître de conférences, Université de Lorraine, Nancy
Présidente :	Christiane Forestier	Professeure, Université Clermont-Auvergne
Directeur de thèse :	Christophe Chassard	Directeur de recherches, UMR, Aurillac
Co-directeur de thèse :	Pascal Bonnarne	Directeur de recherches, UMR SayFood, Paris-Saclay

Laboratoires d'accueil

Unité Mixte de Recherche sur le Fromage
Unité Mixte de Recherche SayFood

Entreprise d'accueil

Pôle Fromager AOP Massif central

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et me faire profiter de leur expertise. Mes sincères remerciements à **Monika Coton** et **Nathalie Desmaures** d'avoir accepté le rôle de rapporteurs, ainsi qu'à **Frederic Borges** et **Christiane Forestier** d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé conjointement au sein de l'Unité Mixte de Recherches fromagères (UMRF, Aurillac) et de l'équipe COMIAL (UMR SayFood, Paris Saclay). Je remercie **Christophe Chassard** et **Catherine Bonnazzi** de m'avoir accueillie au sein de leurs unités. Je tiens à remercier **l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)**, le **pôle fromager AOP Massif central** et **l'Interprofession du Saint-Nectaire**, qui ont permis de financer mes travaux de thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont bien entendu à mes encadrants. Un grand merci à **Christophe Chassard**, pour ton accompagnement, ton encadrement et tes conseils qui m'ont permis d'élargir mon esprit scientifique tout au long de ces trois années. Merci pour ton expertise, pour la confiance que tu m'accordes et les incroyables opportunités que tu m'offres. Je remercie également **Pascal Bonnarme** pour ton accompagnement scientifique, ta patience et tes multiples relectures. Merci pour toutes les connaissances que tu m'as partagées, pour tes conseils très avisés, tes encouragements et ta disponibilité. Je vous suis très reconnaissante de votre implication qui a permis de mener ce beau projet.

Je tiens à remercier le Pôle Fromager AOP du Massif central pour m'avoir accueillie au sein de leur association. Mes remerciements particuliers à **Pauline Gerber**, pour tes nombreux conseils avisés, et pour m'avoir tant apporté d'un point de vue gestion de projet.

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité précieuse de collaborer étroitement avec les experts des filières fromagères, une expérience très enrichissante. Par conséquent, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers les professionnels de l'AOP Saint-Nectaire de m'avoir fait confiance au cours de ce parcours. Je tiens particulièrement à remercier **Emilie Rousset** et **Christian Rouchy**, un grand merci pour votre confiance et votre implication.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, **Eric Beuvier** et **Christophe Lacroix**, pour m'avoir fait part de leur expertise et pour m'avoir aiguillée pour faire avancer positivement le projet.

Mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont encadrée. Un immense merci à **Sebastien Theil**, à qui je dois beaucoup de m'avoir tant appris. Je remercie également sincèrement **Cécile Callon** pour ton appui scientifique et pour m'avoir transmis une part précieuse de ton expertise en microbiologie. Merci également à **Sandra Helinck** pour tes précieux conseils et ton implication. Merci à **Eric Dugat-Bony** pour ton soutien, ton accompagnement et tes conseils. Enfin, je remercie **Anne Saint-Eve** pour ton aide précieuse.

Je tiens à remercier chaleureusement toute l'équipe de l'UMRF et de l'UMR SayFood. Un merci particulier à **Mathilde Lacalmontie**, **Béatrice Desserre**, **François Alegretti**, **Frederic Boudou**, **Anne-Claire Peron**, **Anne Regourd** et **David Forest** pour votre appui technique indispensable tout au long

de ce projet de recherche. Je souhaite remercier tout le personnel technique et administratif de l'UMRF et de SayFood qui a pu m'apporter une aide précieuse.

Je tiens à remercier tous mes collègues. Merci pour la bonne ambiance, pour leur écoute et leurs encouragements. Un merci particulier à mes collègues **Reshad Fantelli** et **Mathilde Lacalmontie** pour votre aide et votre soutien inestimable. Merci pour tous ces moments partagés et ces bons souvenirs. Un immense merci à **Julia Gendre**, grâce à qui mon séjour à Grignon a considérablement changé, merci entre-autres pour ces moments de gourmandises sur les champs-élysées.

Je tiens à remercier mes amis et professeurs **Sabrina Saltaji**, **Romain Chevrot** et **Béatrice Colin** qui m'ont donnée le courage de me lancer dans cette aventure. Merci de m'avoir poussée et soutenue.

Je poursuis avec ceux qui m'ont soutenue au cours de mon parcours : **ma Famille**. Mes parents qui ont toujours été présents au cours de mes études, bien qu'ils ne comprenaient pas toujours quelle était réellement la finalité. Merci **Maman**, merci **Papa** d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir tant épaulée et soutenue. Merci à mes frères et sœurs, **Elisa**, **Lilian** et **Clara** pour avoir été là dans les bons moments, comme dans les moins bons. Merci à Lilian de m'avoir fait la joie immense de me nommer marraine de la merveilleuse petite **Lou**. Merci à **Sandrine** et **Yves** pour votre soutien et les précieux moments que l'on a partagés.

Finalement, je remercie la personne qui partage mon quotidien depuis le début de ce projet. Merci à **Mathieu** pour ton soutien exceptionnel. Merci de me donner confiance en moi comme tu le fais, merci de croire en moi et de me suivre dans mes ambitions. Merci de m'avoir suivie à Paris et à Aurillac, merci pour tous les sacrifices que tu fais pour m'aider à accomplir mes objectifs. Puisque le parcours de ce projet est aussi le notre, je te dédie cette thèse.

Valorisations

Publications

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2023)**. Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area. *Frontiers in Microbiology* 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1245510>.

Grizon, A., Theil, S., Gerber P., Helinck S., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2024)**. Genetic and technological characterization of wild *Lactobacillus delbrueckii* strains reveals low diversity but strong typicity. *Microorganisms*, 12, 512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030512>.

Grizon, A., Theil, S., Callon, C., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2024)**. Safety assessment and microbial interactions of wild lactic acid bacteria strains: Toward the development of an autochthonous starter culture for Saint-Nectaire cheese production. Soumission prévue à MDPI - Foods

Grizon, A., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2024)**. Development and impact of defined autochthonous starter cultures for cheese production: current and future. Soumission prévue à International Journal of Food Microbiology.

Communications

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2022)**. Functional characterization of thermophilic lactic acid bacteria isolated from Saint-Nectaire cheese PDO area. **Poster**. Journées de l'école doctorale JED, UCA.

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2023)**. Genetic and functional diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Saint-Nectaire PDO cheese area. **Poster**. 1ST Forum on Fermented Foods, PIMENTO, Valpré, France.

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2023)**. Genetic and functional diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Saint-Nectaire PDO cheese area. **Poster**. Société Française de Microbiologie, Rennes, France.

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2023)**. Diversité génétique et fonctionnelle de souches sauvages de *Streptococcus thermophilus* isolées sur la zone AOP Saint Nectaire. **Présentation orale**. Rencontre des microbiologistes du pôle Clermontois, Clermont-Ferrand, France.

Grizon, A., Theil, S., Callon C., Gerber P., Helinck S., Dugat- Bony, E., Bonnarme P., and Chassard, C. **(2023)**. Genetic and functional diversity of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area. **Présentation orale**. Weblactic.

Résumé

Les ferments autochtones sont des substituts intéressants des ferments commerciaux permettant le maintien des caractéristiques typiques des fromages et promouvant la souveraineté alimentaire. Cette thèse avait pour objectif de construire une démarche de caractérisation, de sélection et d'assemblage de microorganismes d'intérêt pour développer des ferments autochtones à large échelle. Le modèle d'étude pour mettre au point la démarche était le Saint-Nectaire. Dans un premier temps, la diversité génomique et technologique d'isolats de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* échantillonnés dans la zone de production AOP Saint-Nectaire a été étudiée. Les génomes entiers des isolats ont été séquencés et une analyse comparative basée sur leur pan-génome a été effectuée. Les résultats obtenus étaient très différents pour les deux espèces. Les isolats *S. thermophilus* présentaient une forte variabilité génomique et se différençaient en cinq groupes sur la base du pan-génome, avec une différence évidente de contenu en gènes accessoires. Une annotation fonctionnelle des gènes accessoires basée sur la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a indiqué que les gènes des différents groupes étaient impliqués dans diverses catégories fonctionnelles, chacune possédant un intérêt potentiel en transformation fromagère. Une forte variabilité des activités acidifiantes a également été retrouvée au sein des isolats. Pour leur part, les isolats Saint-Nectaire *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* présentaient une forte homogénéité génomique, alors qu'une importante variabilité au sein de l'espèce dans sa globalité a été observée. Toutefois, les gènes accessoires des isolats *L. delbrueckii* étaient impliqués dans d'importantes catégories fonctionnelles portant un intérêt potentiel en fromagerie. Les souches locales se différençaient des génomes de référence de la même sous-espèce inclus dans l'étude, indiquant une typicité importante liée au terroir d'isolement. La production de composés aromatiques volatils variait quelque peu entre les souches locales, qui produisaient d'importants composés connus pour impacter positivement l'arôme des fromages. Dans un second temps, la sécurité des souches a été étudiée pour assurer un développement de ferment sans risques. Une recherche des résistances acquises aux antibiotiques a été réalisée génétiquement et phénotypiquement. Les recherches ont abouti à l'identification de trois souches possédant des gènes de résistance ou des résistances phénotypiques, et n'ont donc pas été conservées lors de la sélection de souches d'intérêt. En revanche, aucun facteur de virulence directement lié à une pathogénicité n'a été identifié. L'impact d'associations de souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* sur les caractéristiques de fermentation (acidification, protéolyse) a ensuite été évalué en caillés modèles. Trois associations de *Streptococcus thermophilus* ont abouti à des défauts d'acidification. Quatre consortia constitués pour chacun de deux souches de *Streptococcus thermophilus* et une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ont été constitués et testés en fabrications expérimentales. Parmi eux, deux présentaient des cinétiques d'acidification similaires à celle du ferment commercial de référence. Finalement, d'après nos connaissances, cette étude était la première à utiliser l'étude du pan-génome pour étudier et valoriser la diversité de souches isolées d'un territoire de production et leur déploiement en ferments autochtones. L'utilisation de ces méthodes génomiques s'est avérée efficace dans l'identification et la sélection de souches d'intérêt pour le développement de ferments, et peut facilement être étendue à plus large échelle et pour d'autres technologies fromagères.

Abstract

Autochthonous starter cultures are interesting substitutes for commercial starters, enabling the typical characteristics of cheeses to be maintained and promoting food sovereignty. The aim of this thesis was to construct an approach for characterizing, selecting and assembling microorganisms of interest in order to develop indigenous starters on a large scale. The study model used to develop the approach was the Saint-Nectaire cheese. Initially, the genomic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* isolates isolated from the Saint-Nectaire PDO production area was studied. The whole genomes of the isolates were sequenced and a comparative analysis based on their pan-genome was carried out. The results obtained were very different for the two species. *S. thermophilus* isolates showed high genomic variability and were differentiated into five groups on the basis of the pan-genome, with a clear difference in accessory gene content. A functional annotation of the accessory genes based on the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database indicated that the genes from the different groups were involved in various functional categories, each with a potential interest in cheese processing. A high degree of variability in acidifying activity was also found within the isolates. In contrast, the Saint-Nectaire *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* isolates showed a high degree of genomic homogeneity, while significant variability within the species as a whole was observed. However, the accessory genes of the *L. delbrueckii* isolates were involved in important functional categories of potential interest in cheese-making. The local strains differed from the reference genomes of the same subspecies included in the study, indicating significant typicity linked to the terroir of isolation. The production of volatile aromatic compounds varied somewhat between the local strains, which produced important compounds known to have a positive impact on cheese flavor. Secondly, the safety of the strains was studied to ensure risk-free development of the starter. Genetic and phenotypic research was carried out into acquired antimicrobial resistance. The research led to the identification of three strains with resistance genes or phenotypic resistance, which were not retained when the strains of interest were selected. However, no virulence factors directly linked to pathogenicity were identified. The impact of combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* strains on fermentation characteristics (acidification, proteolysis) was then assessed in model cheese curds. Three combinations of *Streptococcus thermophilus* resulted in acidification defects. Finally, four consortia, each consisting of two strains of *Streptococcus thermophilus* and one strain of *Lactobacillus delbrueckii*, were assembled and tested in experimental productions. Two consortia showed acidification kinetics similar to the commercial reference ferment. Finally, to the best of our knowledge, this study was the first to use the pan-genome study to investigate and exploit the diversity of strains isolated from a production territory and their deployment as indigenous starters. The use of these genomic methods has proved effective in identifying and selecting strains of interest for starter development, and can easily be extended to a larger scale and for other cheese technologies.

Liste des abréviations

AB : Agriculture Biologique

AOC : Appellation d'Origine Contrôlée

AOP : Appellation d'Origine Protégée

ASC : Autochthonous Starter Culture

BL : Bactérie Lactique

CSC : Commercial Starter Culture

DSS : Defined-Strain Starters/Ferments définis

EFSA : The European Food Safety Authority/Autorité européenne de sécurité des aliments

EMP : Embden-Meyerhof-Parnas

IGP : Indication Géographique Protégée

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LAB : Lactic Acid Bacteria

MCC : Model Cheese Curd

MRS : De Man, Rogosa et Sharpe

MSS : Mixed Strain Starters/Ferments mixtes indéfinis

NSC : Natural Starter Culture

NSLAB : Non-Starter Lactic Acid Bacteria/Flore lactique secondaire

QPS : Qualified Presumption of Safety/Présomption d'innocuité reconnue

SN : Saint-Nectaire

STG : Spécialité Traditionnelle Garantie

Table des matières

I - Introduction	19
I.1. Objectifs de la thèse.....	22
I.2. Démarche expérimentale	22
II - Etat de l'art	25
II.1. De la classification à la fabrication : exploration du monde des fromages et de leur microbiote	27
II.2. Les ferments lactiques : taxonomie, diversité et métabolisme	38
II.3. Le retour des ferments autochtones : développement et impact sur les productions fromagères.....	55
III - Diversité de souches locales de <i>Streptococcus thermophilus</i>	79
III.1. Etude de la diversité de <i>Streptococcus thermophilus</i>	81
III.2. Article 1 - Genetic and technological diversity of <i>Streptococcus thermophilus</i> isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area	82
IV - Diversité de souches locales de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	103
IV.1. Etude de la diversité de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	105
IV.2. Article 2 - Genetic and technological characterization of wild <i>Lactobacillus delbrueckii</i> strains reveals low diversity but strong typicity	106
V - Sélection et assemblages de souches d'intérêt.....	133
V.1. Valorisation de la diversité des souches sauvages	135
V.2. Article 3 - Safety assessment and microbial interactions of wild lactic acid bacteria strains: toward the development of an autochthonous starter culture for Saint-Nectaire cheese production	
VI - Discussion générale	150
VI.1. Isolement et caractérisation de la diversité génétique et fonctionnelle de souches sauvages de <i>Streptococcus thermophilus</i> et de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	152
VI.2. Sélection et assemblages de consortia d'intérêt technologique.....	154
VI.3. Identification des étapes clés pour le développement des ferments autochtones ...	158
VII - Conclusion générale et perspectives	163
Références bibliographiques	167

Liste des figures

Figure 1 Démarche expérimental du projet	24
Figure 2 Classification des fromages adaptée de Almena-Aliste and Mietton (2014) par Frétin (2016).28	
Figure 3 Roue des saveurs du fromage AOP Saint-Nectaire.....	37
Figure 4 Micrographies électroniques à balayage de différentes bactéries lactiques (Fox et al. 2017).40	
Figure 5 Voie EMP et voie des pentose-phosphates pour le métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques (Fox et al., 2017)	44
Figure 6 Représentation schématique du métabolisme des glucides chez <i>S. thermophilus</i> LMD-9 (Gasser et al., 2022)	45
Figure 7 Transport et métabolisme des glucides chez <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	47
Figure 8 Arbres phylogénétique de 26 isolats <i>Streptococcus thermophilus</i> basés sur (A) le core-génome et (B) le polymorphisme nucléotidique	86
Figure 9 Groupement des isolats associés à la visualisation du pan-génome des isolats <i>Streptococcus thermophilus</i>	87
Figure 10 Classification hiérarchique des isolats basée sur le contenu génétique annoté par l'orthologie KEGG.....	87
Figure 11 Analyse PLS-DA effectuée sur le nombre de gènes accessoires catégorisés dans les classes KEGG	88
Figure 12 Contribution des variables à la composante 1 (A) et 2 (B) de l'analyse PLS-DA	89
Figure 13 Heatmap associée à l'analyse PLS-DA.....	89
Figure 14 Transport et métabolisme des glucides des 26 isolats <i>Streptococcus thermophilus</i>	90
Figure 15 Activités acidifiantes des isolats <i>Streptococcus thermophilus</i>	91
Figure 16 Activités protéolytiques des isolats <i>Streptococcus thermophilus</i>	92
Figure 17 Average nucleotide identity (ANI), démontrant la distance génomique entre les sous-espèces <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	106
Figure 18 Arbre phylogénétique basée sur le polymorphisme nucléotidique	107
Figure 19 Classification des souches associée à la visualisation du pan-génome des souches <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	107
Figure 20 Analyse PLS-DA effectuée sur le nombre de gènes accessoires catégorisés dans les classes KEGG	108
Figure 21 Contribution des variables à la composante 1 (A) et 2 (B) de l'analyse PLS-DA.....	108
Figure 22 Transport et métabolisme des glucides des souches <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	109
Figure 23 Activités protéolytiques des isolats <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	111
Figure 24 Démarche globale de développement de ferments autochtones proposée dans ce projet	149

Liste des Tableaux

Tableau 1 Les différents types de ferments	42
Tableau 2 Peptidases caractérisées chez les BL (Savijoki et al. 2006)	50
Tableau 3 Prévalence du gène <i>prt5</i> dans les génomes de souches de <i>S. thermophilus</i>	51
Tableau 4 Enzymes du système protéolytique des espèces <i>L. delbrueckii</i> et <i>S. thermophilus</i>	52
Tableau 5 Caractérisation technologique, génétique et sécuritaire de souches sauvages de BL pour le développement de ferments autochtones.....	65
Tableau 6 Impact des souches sélectionnés sur la production fromagère	69
Tableau 7 Sources d'isolement des souches <i>Streptococcus thermophilus</i> , numéro d'accension des génomes.....	85
Tableau 8 Sources d'isolement des souches <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , numéro d'accension des génomes	103
Tableau 9 Composés volatils identifiés dans les caillés modèles fermentés par les souches locales de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	113
Tableau 10 Numéros d'accension des génomes des souches analyses dans cette étude.....	129
Tableau 11 Concentrations minimales inhibitrices pour neuf antibiotiques	132
Tableau 12 Facteurs de virulences identifiés dans les génomes des souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> (St) et <i>Lactobacillus delbrueckii spp. lactis</i> (Ld)	133
Tableau 13 Interactions négatives entre les souches <i>Streptococcus thermophilus</i>	134
Tableau 14 Assemblages des isolats pour le développement du ferment autochtone	135
Tableau 15 Profils acidifiant de quatre ferments autochtones en comparaison avec un ferment commercial de référence	135
Tableau 16 Ferments autochtones sélectionnés pour les essais fermiers	144

I - Introduction

Les fromages traditionnels sont des trésors de diversité microbienne. Autrefois, leur production ne reposait pas sur l'usage de ferments lactiques commerciaux, mais plutôt sur la microflore indigène du lait et/ou du fromage. La technique du "backslopping" consistait à réensemencer chaque nouvelle production avec une culture de la veille, transmettant ainsi la microflore bénéfique de lot en lot. Cette méthode, sans précaution spécifique contre les contaminations, se fondait sur la capacité des bactéries lactiques à inhiber la flore pathogène et d'altération par leur activité acidifiante. Aujourd'hui, en raison des normes sanitaires dans l'agriculture, cette pratique est devenue rare. Pour s'adapter à la production industrielle, les ferments commerciaux ont été introduits. Ces ferments améliorent la standardisation et la sécurité sanitaire des fromages, et réduisent les risques de développement de microorganismes pathogènes et d'altération. Toutefois, avec l'utilisation à l'échelle mondiale de ces ferments commerciaux fournis par un petit nombre de fabricants, les fromages artisanaux tendent à perdre leur typicité, malgré l'utilisation d'un savoir-faire traditionnel. L'utilisation de tels ferments amène à une réduction de la variabilité du microbiote fromager, responsable des caractéristiques sensorielles distinctes que présentent les fromages traditionnels.

Afin de renforcer le caractère authentique des fromages, avec des saveurs plus typées et diversifiées en arômes, il apparaît judicieux de développer et d'utiliser des ferments autochtones. Ces ferments, issus directement de l'environnement local de production, peuvent aider à restaurer et à préserver la richesse et la typicité des profils sensoriels des fromages traditionnels. La richesse microbiologique de chaque terroir confère une signature microbienne unique aux fromages produits. Les ferments autochtones constituent des écosystèmes microbiens locaux et contribuent donc à préserver la richesse microbiologique de chaque terroir et, ainsi, à maintenir les propriétés sensorielles des fromages traditionnels. La valorisation des ressources microbiennes locales par le développement et l'utilisation de tels ferments peut également impacter significativement l'autonomie alimentaire locale. L'autonomie alimentaire est un concept essentiel qui présente une importance croissante dans le contexte mondial actuel. Il s'agit de la capacité d'une communauté, d'une région ou d'un pays à subvenir à ses besoins alimentaires de manière durable, en produisant localement une grande partie de sa nourriture. En s'affranchissant des ferments commerciaux, les producteurs fromagers maîtriseraient alors l'ensemble du processus de fabrication, de la collecte du lait à l'affinage des fromages, pour ainsi réduire leur dépendance vis-à-vis des intrants extérieurs.

Le fromage AOP Saint-Nectaire est ancré dans une histoire importante de la région Auvergne, avec une forte valeur culturelle et un grand impact dans l'économie régionale. Le savoir-faire lié à sa fabrication est un héritage transmis de génération en génération, reflétant les traditions de la région de production. Dans ce contexte, l'utilisation de ferments autochtones apparaît essentielle pour la préservation de son identité unique. Les ferments autochtones, par leur spécificité, pourraient permettre de mettre en avant la typicité et promouvoir l'autonomie des producteurs.

I.1. Objectifs de la thèse

L'objectif général de ce travail de thèse était de développer une méthode de sélection et d'assemblage de ferments autochtones pour un déploiement rapide et adapté à de nombreuses variétés fromagères. Cette méthode a été développée à partir d'un modèle fromager important de la région Auvergne, l'AOP Saint-Nectaire, dont la production repose actuellement sur l'utilisation de ferments commerciaux largement distribués. Face à ces objectifs, nous nous sommes confrontés à plusieurs questions de recherches :

- Peut-on isoler et caractériser la diversité génétique et technologique d'espèces de bactéries lactiques sur une petite aire de production fromagère ? La diversité isolée est-elle variable selon la saison d'isolement ? Permet-elle de répondre aux besoins technologiques pour développer de nouveaux ferments ?
- Comment développer une approche pour sélectionner et assembler des consortia microbiens d'intérêt technologique en fabrication fromagère ?
- Comment définir des clés susceptibles de généraliser la démarche visant au développement de ferments lactiques autochtones ?

I.2. Démarche expérimentale

Afin de répondre à ces questions, une approche en trois temps a été privilégiée. La première étape était la réalisation d'un état des lieux sur les méthodes de développement et sur l'impact des ferments autochtones sur la production de diverses variétés, qui a permis la rédaction d'une revue (Chapitre II). La démarche pour la mise au point du ferment spécifique a nécessité la caractérisation génétique et technologique de la diversité de souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* isolées sur la zone de production AOP Saint-Nectaire (Chapitre III et IV). L'évaluation de la sécurité liée à l'utilisation de ces souches et leurs capacités acidifiantes en fabrications fromagères ont également été étudiées (Chapitre V).

I.2.A. Isolement et caractérisation de la diversité génétique et fonctionnelle de souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*

La fabrication du Saint-Nectaire repose essentiellement sur l'utilisation de ferments commerciaux thermophiles constitués des espèces de bactéries lactiques (BL) *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ensemble, ces deux espèces contribuent prioritairement à l'acidification du lait et participent à la protéolyse, deux événements majeurs de la fabrication du fromage. Afin de proposer un ferment comparable aux standards actuels mieux acceptés par les producteurs, l'étape d'isolement de souches locales a ciblé les deux espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. La caractérisation des souches isolées de la zone AOP Saint-Nectaire a dans un premier temps pris en compte leurs capacités acidifiantes et protéolytiques et leurs caractéristiques de croissance dans une matrice simple, un lait écrémé reconstitué

stérile. Les isolats ont ensuite été catégorisés en fonction de leurs capacités et plusieurs isolats représentatifs de la diversité ont été sélectionnés pour étudier leur diversité génétique et technologique.

La caractérisation de la diversité des isolats permet d'évaluer la possibilité d'isoler une large palette de souches possédant les différentes caractéristiques génétiques et technologiques souhaitées pour le développement d'un ferment autochtone. Une analyse génomique comparative des isolats sélectionnés à partir des génomes séquencés a pris en compte la diversité du core-génome (l'ensemble des gènes communs à chacune des souches étudiées) par l'étude d'arbres phylogénétiques. Le pan-génome (ensemble des gènes constituant les génomes des souches étudiées) a également été étudié pour identifier le profil de chaque souche sur la base de leur contenu en gènes, et une analyse fonctionnelle de leurs gènes accessoires a été réalisée. L'étude de la diversité technologique des souches a été entreprise dans des caillés modèles produit à l'échelle laboratoire, une matrice proche d'un fromage puisqu'elle reprend les mêmes étapes de fabrication et une descente en température similaire. Ces recherches ont pris en compte les profils acidifiants et protéolytiques des souches des deux espèces, et la production de composés aromatiques volatils par les souches *Lactobacillus delbrueckii*. Les données ont conduit à la rédaction de deux articles qui constituent les chapitres III. et IV. de ce manuscrit.

I.2.B. Sélection et assemblages de ferments autochtones

Une étape de sélection des isolats a fait suite aux précédents objectifs et s'est portée sur la typicité et la diversité génétique ainsi que sur les caractéristiques technologiques des isolats. Les isolats sélectionnés ont fait l'objet d'une évaluation de leur sécurité basée sur la recherche d'antibio-résistances acquises et de facteurs de virulence afin d'assurer leur utilisation saine en fabrications fromagères. Les interactions ont été étudiées pour assurer le développement de ferments robustes sans affecter les fabrications fromagères. L'impact des interactions *Streptococcus thermophilus* – *Streptococcus thermophilus* sur l'acidification a été déterminé. Les caractéristiques de croissance et les activités acidifiantes et protéolytiques d'associations *Streptococcus thermophilus* – *Lactobacillus delbrueckii* ont été étudiées pour identifier d'éventuelles interactions. Les isolats présentant des caractéristiques non désirées liées à leur sécurité ou les isolats présentant des interactions négatives ont été écartés. Plusieurs formulations ont ensuite fait l'objet d'une première étude en fromagerie expérimentale pour valider leurs profils acidifiants. Les résultats de ces travaux ont été rédigés sous la forme d'un article (Chapitre IV) qui sera complété par des essais en fromagerie fermière. Ces dernières validations auront pour objectif d'évaluer l'impact des ferments autochtones constitués sur les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et sensorielles des fromages.

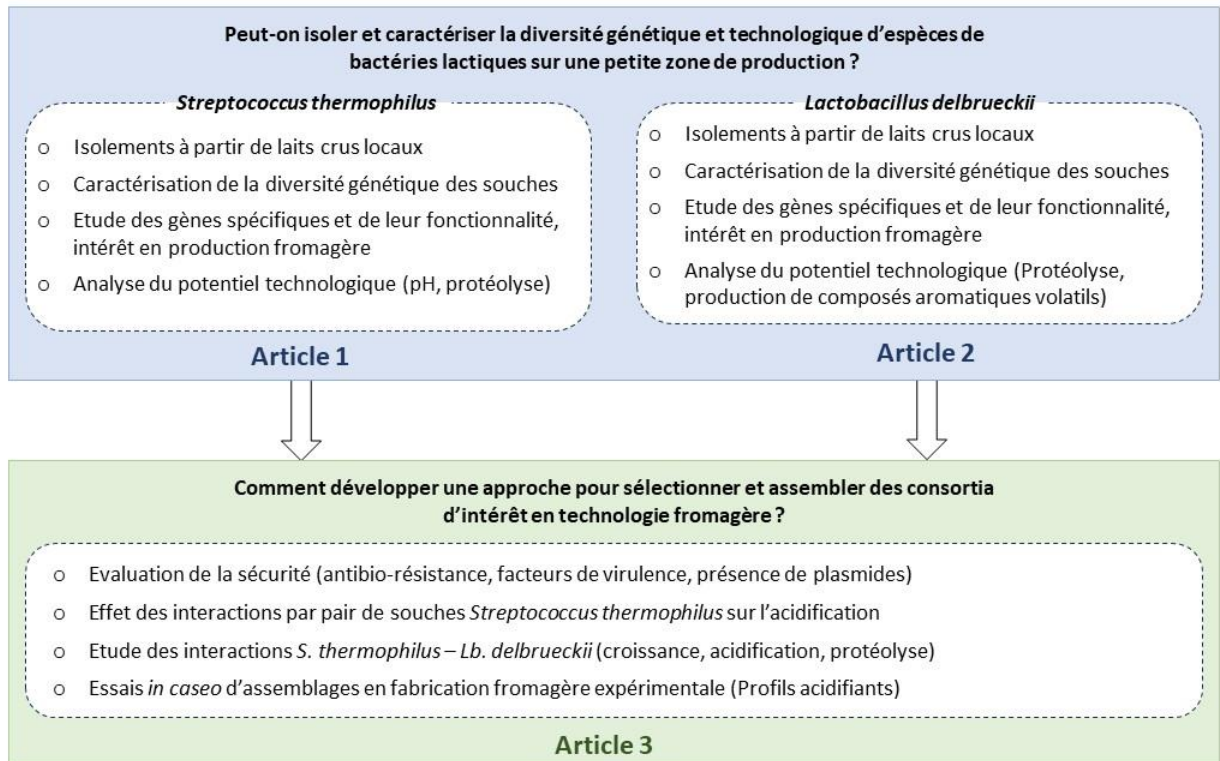


Figure 1 Démarche expérimental du projet

II - Etat de l'art

II.1. De la classification à la fabrication : exploration du monde des fromages et de leur microbiote

II.1.A. De l'origine au développement du fromage

Les fromages constituent une matrice alimentaire exceptionnellement diversifiée et complexe. Chacun se distingue par ses saveurs, textures et caractéristiques uniques (Fox et McSweeney 2017). La production fromagère mondiale, avec un volume de 21 millions de tonnes en 2021, témoigne d'un secteur dynamique et en pleine croissance. Chaque variété de fromage reflète l'identité et les traditions d'une région spécifique (Fox et McSweeney 2017).

Des preuves de la transformation et du stockage du fromage ont été découvertes dans des poteries semblant dater d'environ -6000 avant J.C (Gross. 2018; Salque et al. 2013). Les fromages étaient produits à l'origine pour permettre la conservation du lait, un aliment microbiologiquement riche, et par conséquent, instable. Aujourd'hui, le fromage joue un rôle clé dans la culture et la gastronomie française, et symbolise un héritage historique, économique et sociologique important (Dalby. 2009).

En France, la description du terme « fromage » est précisée dans le Décret n°2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères (Légifrance): le fromage est caractérisé en tant que « produit fermenté ou non, affiné ou non, obtenu à partir des matières d'origine exclusivement laitière : le lait, le lait partiellement ou totalement écrémé, la crème, la matière grasse, le babeurre, utilisées seules ou en mélange et coagulées en tout ou en partie avant égouttage ou après élimination partielle de la partie aqueuse. [...] La teneur en matière sèche du produit doit être d'au moins 23 grammes pour 100 grammes de fromage ». Le pays est classé troisième producteur de fromage dans le rang mondial, derrière les Etats-Unis et l'Allemagne. Plus de 1800K tonnes de fromage ont été produites en 2021 en France, avec une consommation moyenne s'élevant à 27.6 kg par personne (CNIEL. 2023). La richesse culturelle et le savoir-faire français en termes de production fromagère sont illustrés par une large palette estimée à plus 1000 variétés (Dugat-Bony et al. 2016), parmi lesquelles 46 fromages bénéficient de l'Appellation d'Origine Protégée (AOP). Parmi ces variétés, la part des fromages au lait cru est estimée à environ 16 % (CNIEL. 2022). Ces fromages semblent présenter une complexité aromatique supérieure à celle des fromages au lait pasteurisé, pour partie en raison de la plus grande diversité des communautés microbiennes présentes dans ces fromages (Beuvier et al. 1997; Montel et al. 2014; Feurer et al. 2004).

La production d'un fromage passe invariablement par les mêmes étapes de fabrication. En technologie classique, la première étape consiste en la coagulation du lait, réalisée par l'action de bactéries lactiques et/ou de la présure (enzyme coagulante). Elle définit les caractéristiques du gel (le caillé) en termes de fermeté, d'aspect et de cohésion (Fox et McSweeney 2017). L'étape d'égouttage poursuit la coagulation du lait, et vise à fixer le taux d'humidité via l'expulsion du sérum, mais également à stabiliser le taux de minéralisation du produit final (Almena-Aliste et Mietton. 2014; Donnelly. 2013; Prazeres et al. 2012). Le fromage est ensuite salé et éventuellement affiné.

La classification proposée par Almena-Aliste et Mietton (2014) et adaptée par Frétin (2016) différencie les fromages français selon ces trois étapes de production (Figure 2).

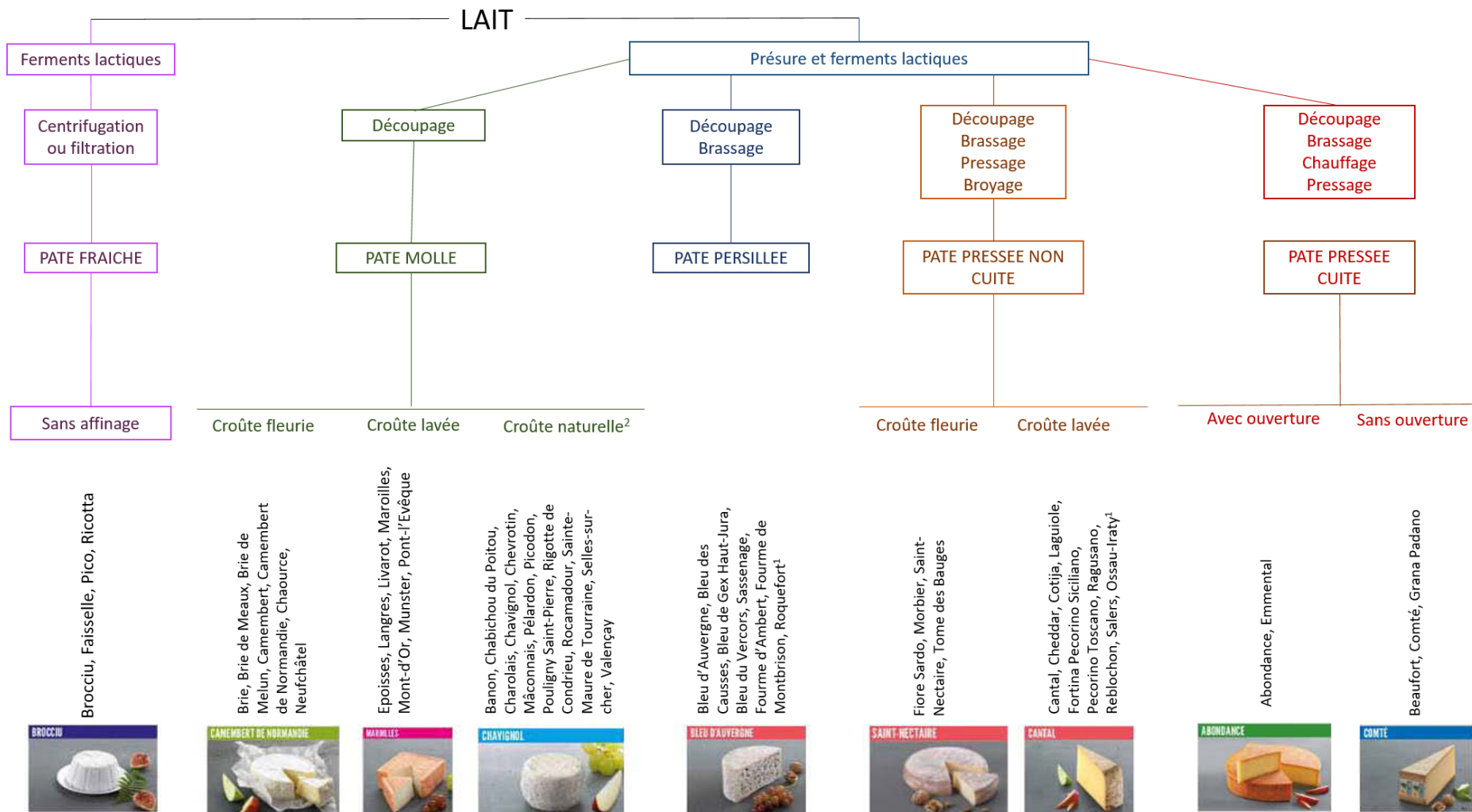


Figure 2 Classification des fromages adaptée de Almena-Aliste and Mietton (2014) par Frétin (2016).

¹ fromages au lait de brebis ; ² fromages au lait de chèvre

Les labels de qualité

Quatre labels de qualité sont reconnus en Europe : l'Appellation d'Origine Protégée (AOP), l'Indication Géographique protégée (IGP), la Spécialité Traditionnelle Garantie (STG) et l'Agriculture Biologique (AB). Parmi eux, les AOP et les IGP garantissent l'origine géographique des produits. Le label AOP a remplacé l'appellation d'origine contrôlée (AOC) en 1992. L'AOP est reconnue comme un label attestant de la qualité et de l'authenticité d'un produit. Ce label assure aux consommateurs que l'intégralité du processus, de la production de lait à l'affinage des fromages, se déroule exclusivement dans une zone géographique spécifiquement définie par l'AOP. La filière AOP s'engage à respecter six critères de qualité essentiels, incluant l'origine géographique, le développement économique local, la clarté des méthodes employées, l'innovation, le respect de l'environnement et la valorisation du terroir. Ce label souligne également l'importance d'une diversité microbienne unique, contribuant à la typicité des fromages AOP. L'IGP est, quant à elle, moins exigeante sur les conditions d'origine des produits. Elle indique que la production, la transformation ou l'élaboration du produit peuvent être réalisées dans une aire géographique délimitée. En France, 46 fromages bénéficient du label AOP et couvrent 25 % des productions (CNAOL, 2022). La majorité de ces AOP imposent l'utilisation du lait cru pour leur production. Cependant, il existe des mentions telles que « fermier », qui assure que le fromage est produit par le producteur avec le lait de sa propre exploitation, qui se distingue de la mention « laitier », qui assure que le lait provient d'une même laiterie, mais de plusieurs exploitations.

II.1.B. Le microbiote du fromage : un univers microscopique essentiel

Les dynamiques de successions microbiennes dans les fromages en font un produit microbiologiquement instable. De nombreuses interventions microbiennes se déroulent lors du processus de fabrication, permettant l'obtention de fromages avec des caractéristiques organoleptiques intéressantes aux yeux des consommateurs. Le lait et les produits laitiers sont des écosystèmes complexes, sensibles aux changements environnementaux biotiques et abiotiques qui modifient l'évolution et les mécanismes d'interactions au sein des communautés microbiennes. La composition du microbiome et les modifications qui peuvent prendre place ont un effet considérable sur les propriétés organoleptiques ainsi que sur l'aspect sanitaire des produits finaux.

Les microorganismes trouvés dans le fromage proviennent de différentes sources. Ils peuvent être naturellement présents dans le lait, qui représente un terrain idéal pour la croissance des microorganismes grâce à une teneur en nutriments élevée, un pH favorable et une activité de l'eau (a_w) élevée (Quigley et al. 2013; Ribadeau-Dumas. 1984). La biodiversité au sein d'un lait cru est extrêmement riche et variable en fonction de la ferme de collecte et de son origine géographique (Fricker et al. 2011). En sortie du pis d'une femelle en période de lactation, le lait est souvent considéré comme étant pauvre en microorganismes. La composition de son microbiote est, par conséquent, directement impactée par l'environnement de traite et les équipements de production. Des sources indirectes comme la nourriture ou les fèces animales peuvent modifier la composition du microbiote initial. Toutes les sources de contamination sont des réservoirs de microorganismes. La nature des sources microbiennes varie en

fonction des fermes ; ces dernières sont régies par des pratiques de management de la qualité qui leur sont propres (Montel et al. 2014). Ces microorganismes peuvent être également introduits en tant que ferments lactiques ou d'affinage, provenir de l'environnement de fabrication, ou encore résulter d'un contact avec l'équipement. Le microbiote du fromage, durant sa maturation, se compose de diverses catégories de microorganismes, qui varient selon la variété de fromage. Les fromages traditionnels sont d'importants réservoirs de diversité microbienne, provenant du microbiote du lait et des pratiques traditionnelles, permettant le développement d'une diversité organoleptique précieuse (Montel et al. 2014; Cocolin et Ercolini. 2015). Les bactéries retrouvées dans le fromage font majoritairement partie du phylum *Bacillota* (bactéries lactiques, entérocoques, staphylocoques), Actinomycètes et Pseudomonadota (Mayo et al. 2021). On distingue trois types de microorganismes présents dans le fromage : la flore adventice, le ferment lactique qui initie l'acidification, les bactéries lactiques qui ne contribuent pas à l'acidification (NSLAB) et les ferments d'affinage, qui jouent un rôle important durant cette étape (Beresford et al. 2001).

Le microbiote du lait cru

Le lait, un fluide corporel complexe des mammifères, joue un rôle crucial dans la nutrition et la défense des nouveau-nés. Son microbiote est d'une importance fondamentale dans la fabrication du fromage, influençant significativement la saveur et la texture uniques des différents types de fromages. Ce microbiote associé est caractérisé par une grande diversité de microorganismes, dominée principalement par les bactéries, les bacteriophages, les moisissures et les levures. La composition de ce microbiote est dynamique et varie en fonction de multiples facteurs relatifs à l'hôte et à l'environnement (Quigley et al. 2013).

Les ferments lactiques

Dans la plupart des variétés de fromages, les ferments lactiques sont intentionnellement ajoutés pour initier l'acidification du lait (Parente et al. 2017). Ces ferments sont constitués de bactéries lactiques mésophiles ou thermophiles. Ils peuvent être composés d'une ou de plusieurs souches, être de composition définie ou indéfinie. Ils sont prioritairement utilisés pour métaboliser le lactose en acide lactique durant les premières étapes de la production, mais sont également responsables d'un grand nombre d'événements biochimiques associés à la formation de texture et de saveurs dans les fromages. Une partie de cette bibliographie est entièrement dédiée aux ferments lactiques (voir chapitre II.2).

La flore lactique secondaire

La flore lactique secondaire, aussi appelée en anglais les « Non-Starter Lactic Acid Bacteria » (NSLAB) sont des bactéries peu acidifiantes qui peuvent être ensemencées volontairement, ou provenir du lait cru et de l'environnement de production. Elles se développent lors du processus d'affinage, et sont principalement représentées par les lactobacilles mésophiles hétérofermentaires (*Lactocaseibacillus casei*, *Lactocaseibacillus paracasei*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* et *Lactiplantibacillus plantarum*), mais aussi les genres *Leuconostoc*, *Enterococcus* ou *Pediococcus* (Gobbetti et al. 2015). Ce groupe est essentiel dans la composition bactérienne de certaines variétés de fromages pour leur impact sur la typicité (Montel et al.

2014). Ces bactéries sont souvent utilisées comme « accélératrices » d'affinage, puisqu'elles peuvent fermenter le lactose résiduel ou isomériser le L-lactate en D-lactate, avoir un impact sur la lipolyse et la protéolyse, et influencer également le profil de composés aromatiques de certains fromages (Blaya et al. 2018; McSweeney. 2004).

Les ferments d'affinage

Toutes les variétés de fromages affinés possèdent une flore d'affinage, qui a pour rôle de produire des changements caractéristiques pour chaque variété (Fox et al. 2017). Cette flore peut être constituée de bactéries, de levures et/ou de moisissures.

Les moisissures sont parmi les flores les plus importantes des ferments d'affinages et sont régulièrement volontairement ensemencées lors de la fabrication. Elles peuvent être ensemencées en surface des fromages à croûte fleurie, ou ensemencées à l'intérieur (par exemple dans les pâtes persillées). Les moisissures jouent un rôle important dans les fromages à croûte fleurie, puisqu'elles agissent sur la texture, les arômes et les saveurs caractéristiques des fromages, en plus de leur conférer leur apparence unique (Spinnler. 2017). L'espèce *Penicillium camemberti* est fréquemment retrouvée à la surface des fromages à pâte molle et à croûte fleurie tels que le Brie ou le Camembert. Une flore fongique complexe colonise la surface du Saint-Nectaire et de la Tomme de Savoie, caractérisée par les moisissures des genres *Penicillium*, *Mucor*, *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Epicoccum* et *Sporotrichum* (Beresford et al. 2001; Dugat-Bony et al. 2016). Dans les fromages à pâte persillée, *P. roqueforti* est responsable de la caractéristique principale de ces variétés, les pigmentations bleues. Cette espèce peut également agir sur la protéolyse et la lipolyse des fromages (Dumas et al. 2020), permettant le développement d'arômes tels que les méthyl-cétones, très spécifiques de cette espèce.

Les levures ont également un rôle majeur dans l'affinage des fromages, puisqu'elles participent à leur désacidification, causée par le métabolisme du lactate et la désamination des acides aminés. Les levures utilisent fréquemment des acides aminés comme sources d'énergie après l'épuisement du lactate et de nombreuses levures présentent une activité protéolytique et lipolytique (Bintsis. 2021; Fröhlich-Wyder et al. 2019). Les levures retrouvées dans les fromages peuvent provenir du lait cru, des surfaces d'équipement, de l'environnement de fabrication et d'affinage, ou de la saumure (Bintsis. 2021). Les espèces *Kluyveromyces* spp., *Geotrichum candidum*, *Yarrowia lipolytica* et *Debaromyces hansenii* sont parmi les levures les plus fréquemment retrouvées dans le lait cru. Les levures peuvent également être délibérément ajoutées en tant que ferment. Les espèces les plus fréquemment utilisées dans ce cas sont *G. candidum*, *K. marxianus*, *K. lactis* et *D. hansenii* (Fröhlich-Wyder et al. 2019).

La désacidification du fromage par les levures favorise la croissance des bactéries d'affinage, provenant principalement des solutions de saumures ou de ferments volontairement ajoutés dans certaines variétés de fromages à croûte lavée (Ritschard et Schuppler. 2024). Le microbiote à la surface de ce type de fromage est dominé par des bactéries d'affinage (ex: *Brevibacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter* spp., *Glutamicibacter* spp., *Microbacterium* spp.), certains staphylocoques et certaines bactéries à Gram négatif (ex : *Halomonas* spp., *Psychrobacter* spp ; Beresford et al. 2001). Les bactéries

d'affinage des fromages à croûte lavée sont principalement responsables de leur apparence, mais agissent également sur les arômes. *Brevibacterium linens* et *Brevibacterium aurantiacum* participent notamment à la production de methanethiol, impliqué dans l'odeur "chou, chou pourri" caractéristique de certains types de fromages (Ritschard et Schuppler. 2024; Beresford et al. 2001).

II.1.C. Les étapes clés d'une fabrication fromagère

Le lait

Le lait est un système complexe légèrement acide, avec un pH d'environ 6,7. Il contient une phase aqueuse où se dissolvent des molécules telles que le lactose, les protéines sériques, les sels minéraux et les vitamines. Il inclut également une émulsion de globules gras, constituée de matières grasses complexes, ainsi qu'une suspension colloïdale de protéines sous forme de micelles, associant caséines et sels minéraux (Walstra et al. 2005).

La composition du lait est influencée par une variété de facteurs zootechniques et d'élevage. L'équilibre de ce milieu complexe est délicat et est sujet à des variations dues aux méthodes de conservation employées, comme la réfrigération, et à l'évolution de la flore primaire qui le colonise. Par conséquent, le lait peut nécessiter une préparation préalable avant d'être transformé en fromage. Cette transformation peut concerner une homogénéisation des globules gras dans le lait, qui a pour effet d'améliorer la répartition de la matière grasse dans le caillé. Cette étape peut contribuer à obtenir une couleur plus blanche. Cependant, cette pratique peut aussi entraîner une accélération des processus de lipolyse, d'acidification et d'oxydation. Le lait peut également être standardisé pour contrôler sa composition chimique (matière grasse et/ou matière protéique). Enfin, il est fréquent de traiter thermiquement le lait, pour éliminer ou diminuer la microflore du lait, et, en particulier les microorganismes pathogènes, afin d'assurer sa qualité et sa sécurité microbiologique (Legg et al. 2017; Fox et al. 2017).

Suite à la collecte et au traitement éventuel du lait, son transfert est effectué dans des cuves de formes géométriques (hémisphériques, rectangulaires, cylindriques) et de volumes variables, pour être transformé en caillé fromager par un processus qui implique différentes étapes en fonction des spécificités de fabrication de chaque fromage (Fox et al. 2017).

Acidification du lait

Lors de la fabrication fromagère, l'acidification se fait généralement par la production *in situ* d'acide lactique, résultant de la fermentation du lactose, le sucre principal du lait, par les bactéries lactiques. À l'origine, la microflore naturelle du lait générait cet acide, mais en raison de sa variabilité, le taux et l'intensité de l'acidification fluctuaient, entraînant ainsi une qualité de fromage inconstante. Les cultures de bactéries lactiques spécialement destinées à la production fromagère ont été alors commercialisées pour garantir une acidification contrôlée et reproductible du lait. Ces cultures ont subi, depuis lors, des améliorations et des raffinements progressifs. Les détails sur la science et la technologie des ferments lactiques seront exposés dans le chapitre II.2 : les ferments lactiques.

La coagulation

L'étape essentielle de la fabrication de toutes les variétés de fromages implique la coagulation des caséines du lait pour former un gel qui piège les graisses. La coagulation peut être réalisée par deux mécanismes. Le premier repose sur l'action des bactéries lactiques, qui acidifient le lait en produisant de l'acide lactique à partir du lactose. C'est la méthode de coagulation privilégiée pour près de 25 % des fabrications fromagères mondiales. A l'approche du point isoélectrique des caséines (pH 4.6), les charges négatives à la surface des micelles se neutralisent, conduisant à la formation d'un gel dans lequel la matière grasse est piégée (Fox et al. 2017).

Le deuxième mécanisme repose sur l'action enzymatique de la présure, majoritairement constituée de chymosine. Cette enzyme initie la protéolyse, en hydrolysant spécifiquement les κ -caséines à leur liaison peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆, aboutissant à la formation de para- κ -caséines (restant attachées aux micelles) et de macropeptides (diffusant dans la phase aqueuse). Cette activité déclenche une phase non-enzymatique, durant laquelle les micelles sphériques perdent progressivement leur capacité à interagir avec les molécules d'eau, à cause de la réduction stérique et de la charge de répulsion entre les particules, les forçant à interagir les unes avec les autres pour former des agrégats et des chaînes. Au fur et à mesure que la coagulation progresse, les chaînes micellaires augmentent en longueur et en épaisseur, s'emboîtent pour former une matrice tridimensionnelle en forme de réseau qui retient l'eau et d'autres composants majeurs du lait. Près de 75 % des variétés de fromages dans le monde utilisent cette méthode de coagulation (Fox et al. 2017; Jaros et Rohm. 2017; Agudelo et al. 2004).

L'action simultanée des deux mécanismes est généralement privilégiée, puisque leur effet sur le caillé produit est différent et complémentaire. La présure permet une meilleure synérèse et permet d'obtenir un caillé plus ferme, tandis qu'un caillé acide présente une tenue moins ferme et est plus humide (Fox et al. 2017). Lorsque le caillé atteint la fermeté souhaitée par les producteurs, les processus post-coagulation peuvent être entrepris.

L'égouttage

Suite à la coagulation du lait, le caillé est traité par une série de procédures visant à accélérer la synérèse. Diverses méthodes sont applicables pour faciliter l'égouttage (ex : découpage, brassage, cuisson, moulage, pressage). Toutes ces techniques ne seront pas présentées dans cette bibliographie, car seules les étapes spécifiques à la fabrication d'un fromage Saint-Nectaire seront développées (découpage, moulage et pressage).

Le caillé peut être coupé à l'aide d'outils traditionnels (tranche caillé), spécifiquement conçus pour les différentes variétés de fromages et souvent adaptés aux cuves utilisées (Fox et al. 2015; Legg et al. 2017). La taille des particules de caillé est ajustée, pouvant aller jusqu'à la grosseur d'un grain de riz, en fonction des méthodes de fabrication propres à chaque type de fromage. Le but de cette découpe est de séparer le lactosérum et de concentrer les matières grasses et les caséines dans le caillé. Cette étape vise à augmenter le rapport surface/volume du caillé pour faciliter la libération du lactosérum et réduire l'humidité du fromage (Lucey et al. 2003).

Lorsque les fromagers jugent que l'égouttage est suffisant, le caillé est alors séparé du lactosérum et peut être placé dans des moules pour poursuivre cette synérèse. Le moulage constitue une étape supplémentaire qui facilite l'égouttage du lactosérum et mène à un caillé plus compact, les particules de caillé commençant à s'agglomérer. Chaque type de fromage est mis dans un moule spécifique, qui définit la taille caractéristique du fromage et a une influence notable sur l'affinage. Les fromages à affinage en surface doivent être de petite taille, car leur maturation est principalement influencée par la microflore de surface et leurs enzymes, dont les effets se propagent sur de courtes distances dans le fromage. En revanche, les fromages à fermentation propionique nécessitent une texture compacte et doivent être suffisamment grands pour retenir assez de CO₂, essentiel au développement des yeux (Fox et al. 2017).

La masse de caillé résultant est parfois pressée afin de poursuivre l'élimination du lactosérum et favoriser la fusion des particules de caillé, pour former un fromage plus ferme (Bintsis et Papademas. 2022). La fabrication de chaque variété fromagère passe invariablement par l'ajout de chlorure de sodium. Les méthodes de salage sont diverses et dépendent de la variété fabriquée. Le fromage peut être immergé dans une solution de saumure saturée. Il peut également être frotté ou saupoudré au sel sec ou être broyé avec du sel avant le moulage. Cette étape impacte, entre autres, la croissance des microorganismes d'affinage et agit sur l'activité de leurs enzymes. Le salage favorise également l'expulsion du lactosérum et a un impact sensoriel sur le produit.

L'affinage

Le procédé de fabrication se poursuit par l'affinage, qui s'effectue à une température basse et une forte humidité relative. La qualité organoleptique des fromages est déterminée par les changements complexes qui prennent place au cours de cette étape. L'affinage est un processus technologique clé lors de la fabrication fromagère, au cours duquel les flux métaboliques de la flore microbienne du fromage dirigent de nombreuses réactions biochimiques et enzymatiques. Chaque variété de fromages possède des conditions bien spécifiques, notamment pour la période d'affinage qui peut durer de quelques semaines à plusieurs mois (Fox et McSweeney. 2017).

Les producteurs fromagers sont amenés à opérer plusieurs types de soins lors de cette période. Les fromages à croûte fleurie peuvent être frottés, afin de casser les mycéliums qui se développent à leur surface. Les fromages à croûte lavée sont frottés avec une lavette humide imprégnée de saumure et de ferments d'affinage, ou brossés. Les fromages à pâte persillée nécessitent une technique de piquage, qui consiste à créer des zones oxygénées à l'intérieur des fromages pour favoriser la croissance du champignon filamenteux *Penicillium roqueforti*. Les fromages sont également régulièrement retournés pour homogénéiser la forme et le développement de microorganismes en surface (Fox et McSweeney. 2017).

Lors d'une production de fromage, il est courant d'ensemencer le lait ou les saumures de soin avec des microorganismes d'affinage. Ces populations microbiennes constituent le socle des activités métaboliques responsables de nombreuses caractéristiques organoleptiques des fromages (Khattab et al. 2019). Trois réactions principales se déroulent lors de l'affinage et impactent significativement les

propriétés physiques et chimiques du fromage : le métabolisme du lactose résiduel et du lactate, la protéolyse et la lipolyse (McSweeney. 2004).

Lors de l'étape d'acidification, les bactéries lactiques métabolisent le lactose en lactate. Cependant, dans le cas d'une glycolyse incomplète, le lactose résiduel peut être métabolisé par les NSLAB, la flore fongique, ou certaines bactéries d'affinage, par le processus de glycolyse, et aboutir à la production de D-lactate (Fox et al. 2017). La formation d'acide lactique lors du processus d'affinage a un impact direct sur la saveur des fromages, en particulier les fromages peu ou pas affinés (Parente et al. 2017; McSweeney et al. 2017). Le lactate peut, à son tour, être métabolisé dans certaines variétés de fromages. Il peut par exemple servir de précurseur pour la production de propionate, d'acétate, d'H₂O et de CO₂ par des bactéries propioniques (*Propionibacterium freudenreichii*). La réaction biochimique impliquée engendre des « yeux » dans les fromages de type Emmental, par la libération de CO₂, mais également celle de saveurs, par la production de propionate. Par ailleurs, le lactate peut être également converti en butyrate, CO₂ et H₂ par certains microorganismes (*Clostridium tyrobutyricum*), aboutissant à des défauts majeurs dans certains fromages (McSweeney et al. 2017). Le métabolisme du lactate se déroule principalement dans les fromages suisses et les fromages à croûte fleurie (Farkye et Fox. 1990).

La protéolyse est une voie métabolique d'importance majeure dans la fabrication de toutes les variétés de fromages. Elle se déroule principalement lors de l'affinage et a un impact significatif sur la texture et les saveurs des fromages. Elle consiste en l'hydrolyse des caséines en peptides et acides aminés libres par l'action de protéases et de peptidases de sources diverses, principalement d'origine microbienne avec les ferments lactiques, les NSLAB et les ferments d'affinage (Thierry et Maillard. 2002). Le mécanisme de la protéolyse par les BL est détaillé dans le chapitre II.2. De nombreuses études ont démontré l'importance de celle-ci dans le processus de production fromagère (McSweeney. 2004; Fox. 1989). Ce mécanisme contribue aux saveurs des fromages, par la libération de petits peptides et d'acides aminés influençant les propriétés aromatiques. Les acides aminés relargués peuvent servir de substrats pour un certain nombre d'événements cataboliques aboutissant à la production de composés aromatiques volatils (Ganesan et Weimer. 2017). La protéolyse a également un impact important sur le développement de la texture des fromages, notamment par l'hydrolyse des para- κ -caséines qui influence la structure des fromages, mais également en produisant de l'ammoniac à partir d'acides aminés libres, puisque ce mécanisme augmente le pH, et impacte ainsi directement la texture des produits finis (Fox. 1989; Lemieux et Simard. 1992). En revanche, un excès de protéolyse peut conduire à des défauts d'amertume ou bien contribuer aux saveurs caractéristiques de vieux fromages (Singh et al. 2005).

La lipolyse aboutit à la production de composés aromatiques volatils majeurs dans les fromages. Elle est réalisée par l'action de lipases qui forment des acides gras libres à partir de triglycérides, constituants majeurs des lipides du lait (McSweeney et al. 2017). Dans les fromages finaux, la majorité des acides gras retrouvés sont des acides gras à petite chaînes, qui peuvent être des composés ayant un impact aromatique propre, ou constituer d'importants précurseurs de composés aromatiques volatils. Un excès de lipolyse peut ainsi conduire à des saveurs rances dans les fromages (Collins et al. 2003). Les lipases

responsables de l'hydrolyse des lipides peuvent provenir du lait, des bactéries lactiques (ferments et NSLAB) ou des ferments d'affinage (Fox, 1989).

Finalement, la transformation du lait en fromage est un processus fascinant qui allie la culture et la science, impliquant des étapes clés qui influencent considérablement les caractéristiques finales du fromage. La symphonie complexe des transformations physiques et chimiques du lait, influencée par les processus biochimiques et microbiologiques permet finalement de produire une vaste gamme de fromages, chacun avec ses caractéristiques uniques et sa propre identité gustative.

II.1.D. Le cas particulier du fromage AOP Saint-Nectaire

Le fromage Saint-Nectaire, fabriqué à partir de lait de vache, est un fromage à pâte pressée non cuite qui bénéficie du label AOP depuis 1955. La fabrication de ce fromage est soumise à un cahier des charges strict (*Arrêté du 15 février 2017 relatif à l'appellation d'origine protégée « Saint-Nectaire »*). La zone de production se limite à seulement 1800 km², centrée sur le Massif du Sancy et les plateaux du Cézallier entre le Puy de Dôme et le Cantal, ce qui en fait l'une des plus petites zones AOP d'Europe. Malgré cette petite aire d'appellation, le Saint-Nectaire est la troisième AOP fromagère française au lait de vache et la première AOP fermière en Europe. L'appellation produit en moyenne 14500 tonnes de Saint-Nectaire annuellement, dont 8500 tonnes de fromages fermiers.

Le Saint-Nectaire se présente sous la forme d'un cylindre légèrement détalonné de 24 cm de diamètre maximum et de 5,5 cm de hauteur maximum. Ce format provient de l'histoire de ce fromage, puisqu'il permettait aux petites fermes possédant seulement quelques vaches, mais également aux plus grandes exploitations de valoriser leur production laitière parfois limitée.

Suite à la traite des vaches, le lait destiné à la production du fromage Saint-Nectaire doit être conservé dans un réservoir réfrigéré. A la ferme, le stockage du lait ne doit pas dépasser 48 h pour les fabrications à partir de lait thermisé et 24 h pour les fabrications à partir de lait cru. En fabrication fermière, le lait cru et entier doit être transformé en fromage dès la fin de la traite, et les mélanges de traite sont interdits, ainsi que les standardisations en matière grasse et en matière protéique. En fabrication laitière, le lait peut être utilisé cru ou thermisé et peut être standardisé en matière grasse.

Les seuls ingrédients autorisés en fabrication de Saint-Nectaire sont le lait, la présure, les cultures de microorganismes (bactéries, levures et moisissures), le chlorure de calcium et le sel. Selon le cahier des charges du fromage, l'emprésurage doit s'effectuer à une température comprise entre 30 °C et 34 °C avec une durée de coagulation pouvant aller jusqu'à 35 minutes en transformation laitière et 45 minutes en production fermière. Le décaillage et le pré-pressage peuvent s'effectuer de façon manuelle ou mécanique. Les fromages sont ensuite moulés selon des caractéristiques bien précises et définies dans le cahier des charges. Le fromage est ensuite salé à sec sur les deux faces du fromage. Les fromages doivent ensuite être pressés au moins 8 heures dans une salle tempérée entre 20 °C et 25 °C, avant de subir une période de ressuyage d'au moins 24 heures à 10 °C maximum. Une durée minimale de 48 heures doit s'écouler entre l'emprésurage et l'entrée en cave d'affinage.

Lors de leur période d'affinage, les fromages doivent être lavés au moins deux fois avec de l'eau (salée ou non). Ils doivent être frottés et retournés au moins une fois par semaine, pour obtenir un croûtage régulier. Les Saint-Nectaire doivent être affinés au moins 28 jours entre 6 °C et 14 °C, dans une cave présentant une hygrométrie relative d'au moins 90 %. La roue des saveurs, développée par l'Interprofession du Saint-Nectaire permet d'évaluer la richesse et de la diversité sensorielle du Saint-Nectaire (Figure 2).



Figure 3 Roue des saveurs du fromage AOP Saint-Nectaire (<https://www.aop-saintnectaire.com/>)

II.2. Les ferments lactiques : taxonomie, diversité et métabolisme

L'étape la plus importante dans le processus de fabrication fromagère est sans nul doute la production d'acide lactique à partir du lactose par les bactéries lactiques utilisées en tant que ferments. En plus de ce rôle essentiel, les ferments lactiques ont un rôle important dans le développement des saveurs et de la texture dans les fromages. Certaines souches de bactéries lactiques sont également utilisées pour leur capacité à produire d'importants composés, tels que l'acétaldéhyde, l'acide acétique ou le diacétyl (Fox et al. 2017). La production d'acide lactique lors de la fabrication fromagère conduit à un abaissement du pH du caillé et a plusieurs fonctions, dont la réduction du taux d'humidité dans les fromages par l'accélération de la synérèse et la prévention de la croissance de bactéries pathogènes et d'altération.

Les ferments lactiques sont la seconde source de microorganismes dans les fromages, après la flore adventice du lait cru. Les ferments lactiques ont fait leur apparition au cours du 19^{ème} siècle pour garantir une acidification contrôlée et reproductible du lait. A l'origine, la technique de « Back-slopping » était utilisée pour garantir l'abaissement de pH. Elle consistait à ensemercer le lot de fabrication du jour avec le lactosérum de la production de la veille. Bien que certains fromages traditionnels reposent toujours sur la flore adventice du lait cru pour initier l'acidification, la majorité des procédés de fabrication des fromages produits de nos jours utilisent des ferments lactiques, commerciaux ou autochtones (Parente et al. 2017).

II.2.A. Taxonomie des bactéries lactiques (BL) constituant les ferments

Les BL utilisées en tant que ferments sont à Gram-positif, catalase-négative, non-motiles et ne forment pas de spores (Parente et al. 2017). L'identification de ces bactéries peut être réalisée par des méthodes cultures-dépendantes (capacité à croître à différentes températures, métabolisme homo- ou hétéro-fermentaire, isomères du lactate produit, etc.) ou bien par analyses moléculaires, avec principalement le séquençage de l'ADNr 16S. Les bactéries lactiques constituant les ferments appartiennent principalement aux genres *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*. La Figure 3 présente des micrographies électroniques à balayage de plusieurs bactéries lactiques.

Les espèces du genre *Lactococcus*

L'espèce bactérienne *Lactococcus lactis* a été classifiée dans le genre *Lactococcus* en 1985 (Schleifer et al. 1985). Le genre *Lactococcus* contient deux espèces classiquement retrouvées dans la composition des ferments lactiques (*Lactococcus lactis* et *Lactococcus cremoris* ; Li et al. 2021). La différenciation entre les deux espèces est principalement basée sur leurs différences phénotypiques. *Lc. lactis* métabolise l'arginine, possède une activité Glutamate décarboxylase (GAD) et tolère des températures atteignant 40 °C et de fortes concentrations en sel (4 % NaCl), alors que *Lc. cremoris* a une moindre tolérance aux fortes températures et aux concentrations en sel élevées (2 % NaCl), mais est reconnue pour apporter de meilleures saveurs dans les fromages (Mills et al. 2011).

Les lactocoques sont des cellules sphériques ou ovoïdes seules, en paires ou en petites chaînes. La taille des chaînes dépend principalement du milieu de culture dans lequel les cellules sont mises en croissance. Ces bactéries possèdent un génome relativement petit (1.7 – 2.9 Mpb), souvent accompagné de nombreux plasmides. Leur température optimale de croissance est d'environ 30°C et elles fermentent le glucose par la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), produisant du L (+) – acide lactique comme produit de fermentation (Mills et al. 2011).

Le genre *Streptococcus*

Actuellement, 119 espèces composent le genre *Streptococcus*, mais une seule est retrouvée dans la composition des ferments lactiques. Il s'agit de l'espèce *Streptococcus thermophilus* qui est la seule parmi toutes celles de ce genre qui soit reconnue de qualité alimentaire. *Streptococcus thermophilus* est génétiquement proche de *Streptococcus salivarius* et appartenait à cette espèce, mais a été reclassifiée récemment. Ces deux espèces partagent probablement un ancêtre commun, mais *S. thermophilus* s'est adaptée à l'environnement laitier, lui permettant de métaboliser le lactose. Lors de son adaptation génomique, *S. thermophilus* semble avoir perdu ou désactivé les gènes de virulence présents dans d'autres espèces du même genre (Bolotin et al. 2004). Le génome actuel de *S. thermophilus* semble présenter de nombreux îlots génomiques associés à d'importantes caractéristiques fonctionnelles (ex : biosynthèse d'expolysaccharides, production de bactériocines) probablement acquis par des transferts horizontaux (Hols et al. 2005).

Ce sont des cellules sphériques ou ovoïdes, parfois en paires mais souvent en chaînes. Leur température optimale de croissance avoisine les 45 °C, et elles sont résistantes à de faibles concentrations en sel (2,5 % NaCl).

Le genre *Leuconostoc*

Le genre *Leuconostoc* rassemble 17 espèces. Parmi elles, les deux espèces *Leuconostoc lactis* et *Leuconostoc mesenteroides* sont régulièrement des constituants des ferments lactiques. Les leuconostocques sont des cellules sphériques souvent par paires ou en chaînes. Le métabolisme des sucres par cette espèce procède par voie hétérofermentaire, produisant des concentrations équimolaires de lactate, éthanol et CO₂. Ils se développent de manière optimale à des températures proches de 30 °C. La plupart des leuconostocs métabolisent le citrate et produisent de l'acétoïne et du diacétyle, des molécules aromatiques recherchées dans certains fromages (Björkroth et al. 2014).

La famille *Lactobacillaceae*

En 2020, une réorganisation taxonomique des bactéries lactiques a reclassifié plus de 300 espèces dans 7 genres et 2 familles en une seule famille, les *Lactobacillaceae*, avec 31 genres dont *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*, et 23 nouveaux genres qui comprennent des organismes précédemment classés comme espèces de *Lactobacillus* (Zheng et al., 2020). Les lactobacilles, comme leur nom l'indique, sont des cellules en forme de bacilles de longueur variable en fonction des espèces. Trois groupes distincts peuvent être formés : les

homofermentaires obligatoires, les hétérofermentaires obligatoires, et les hétérofermentaires facultatifs (Pot et al. 2014).

Les lactobacilles homofermentaires ne fermentent que les hexoses par la voie EMP en DL-, L- ou D-lactate. Ce groupe rassemble les lactobacilles thermophiles (*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*; Pot et al. 2014). Ces espèces ont une température optimale de croissance d'environ 42 °C. Les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs peuvent fermenter les hexoses par la voie EMP, ainsi que les pentoses en concentrations équimolaires de lactate et d'acétate par une phosphoketolase inductible (Pot et al. 2014). Les espèces *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* et *Lactiplantibacillus plantarum* composent ce groupe. Les hétérofermentaires obligatoires fermentent les sucres par voie hétérofermentaire en concentration équimolaire de lactate, éthanol et CO₂. Ce groupe rassemble les espèces *Levilactobacillus brevis* et *Limosilactobacillus fermentum* (Pot et al. 2014).

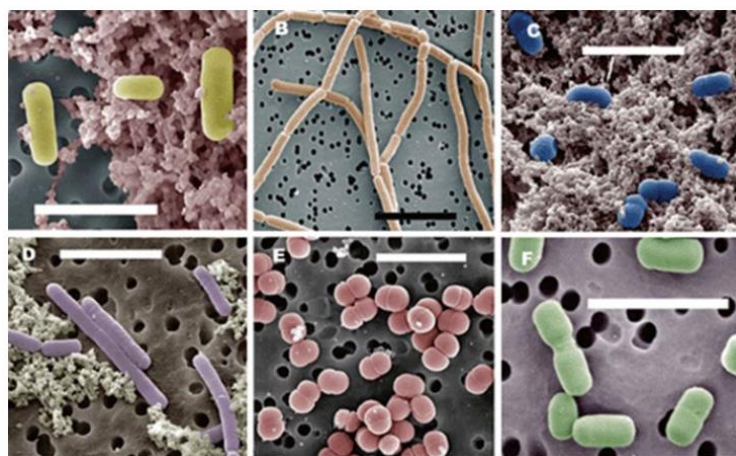


Figure 4 Micrographies électroniques à balayage. A, *Lactobacillus helveticus*; B, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; C, *Lactococcus lactis*; D, *Lb. casei*; E, *Pediococcus pentosaceus* et F, *Lb. brevis*. (Fox et al. 2017).

II.2.B. Les différents types de ferments lactiques

Les ferments lactiques sont classifiés selon la température optimale à laquelle ils produisent de l'acide lactique. D'une part, les ferments mésophiles, qui opèrent idéalement autour de 30 °C, incluent des espèces telles que *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Leuconostoc* sp.. D'autre part, les ferments thermophiles, préférant une température avoisinant les 42 °C, comprennent des espèces comme *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*. Les ferments mésophiles sont principalement utilisés dans les fromages dont les conditions de production ne nécessitent pas une température supérieure à 40 °C, alors que les ferments thermophiles sont plutôt utilisés pour les fabrications de fromages à pâtes cuites (Fox et al. 2017). Actuellement, la production de fromages sans cuisson repose parfois sur l'utilisation de ferments thermophiles. En effet, la plupart des producteurs de fromages AOP

Saint-Nectaire ensemencent leur lait avec des bactéries lactiques thermophiles pour assurer l'acidification.

Une autre classification, la plus communément utilisée, repose sur la complexité des cultures et la façon dont elles sont reproduites (Parente et al. 2017). Ainsi, on distingue trois formes principales de ferments lactiques : les ferments naturels (*Natural Starter Cultures*, NSC), les ferments mixtes indéfinis (*Mixed-Strain Starters*, MSS) et les ferments définis (*Defined-Strain Starters*, DSS). Ces différents types de ferments sont présentés dans le [Tableau 1](#).

Les ferments naturels

Les NSC sont généralement régénérés quotidiennement par la méthode de *back-slopping* et par l'application d'une pression sélective (ex: traitement thermique, pH, température d'incubation). Aucune précaution spéciale n'est appliquée pour prévenir les contaminations provenant du lait cru ou de l'environnement de fabrication. Le contrôle des conditions de cultures au cours de la reproduction des ferments est limité. De ce fait, les ferments naturels évoluent constamment, et la composition en espèces et en souches de bactéries lactiques n'est pas strictement maîtrisée. Deux sous-types de ferments naturels se distinguent, les ferments produits à partir du lait, et les ferments produits à partir du lactosérum (Parente et al. 2017).

La température d'incubation et le pH exercent une pression sélective sur le type de bactéries qui croissent sous ces conditions. La composition de ces ferments est complexe et très variable, et est dominée par les bactéries. Au vu des températures d'incubation, les bactéries dominantes de ces ferments sont principalement thermophiles (Fox et al. 2017). L'utilisation de ferments naturels présente à la fois des avantages et des inconvénients. Ils sont une source intéressante de souches possédant les propriétés technologiques désirées de certaines variétés fromagères et sont considérés comme fortement résistants aux infections phagiques (Carminati et al. 2015). En revanche, leur manque de régularité en termes de structure et de composition des communautés microbiennes provenant de leurs techniques de propagation, conduit à la fabrication de fromages de qualité irrégulière (Gatti et al. 2014).

Les ferments indéfinis

Dans le cas des ferments indéfinis, la composition du mélange microbien est inconnue. Leur mise au point passe par la purification directe des flores d'intérêt technologique directement issues du lait cru. Ils sont composés d'une flore bactérienne mélangée, incluant différents genres, espèces ou souches, qui ne sont pas connus (Johnson. 2014). Aujourd'hui, les levains indéfinis sont utilisés pour différentes applications de par leur historique d'utilisation réussie. Lorsque des ferments indéfinis contenant de nombreuses souches sont propagés sous certaines conditions contrôlées, la stabilité de leur composition et leur performance sont grandement améliorées, sans perdre l'avantage de la tolérance aux infections phagiques (Fox et al. 2017).

Les ferments définis

Les ferments définis sont des cultures d'une ou plusieurs souches possédant des caractéristiques technologiques et fonctionnelles connues et stables. A l'origine, les souches constituant ces ferments

étaient généralement caractérisées selon les besoins spécifiques des producteurs fromagers. Dans les années 1930, en Nouvelle-Zélande, un ferment défini a été développé pour la production de cheddar qui présentait des ouvertures. Des souches ont été criblées sur leur capacité à métaboliser le citrate, et seules les souches Cit⁻ ont été intégrées au ferment, pour combattre ces ouvertures qui n'étaient pas désirées (Fox et al. 2017). Aujourd'hui, la plupart des producteurs utilisent des ferments définis largement distribués pour différentes variétés de fromages, mais ne sont pas spécifiques d'une variété.

La limite de ce type de ferment est le manque de diversité bactérienne, les rendant ainsi plus susceptibles aux attaques phagiques. L'utilisation de mélanges de souches et de rotation doit alors être mise en place pour assurer la qualité du processus de fermentation (Kelleher et al. 2015).

Table 1 Les différents types de ferments

Type de ferment	Description	Avantages	Inconvénients
Ferment naturel	Application d'une pression sélective de lait ou de lactosérum d'un lot précédent pour favoriser la croissance de flores d'intérêt	Diversité importante Peu coûteux Flore indigène	Composition variable Contaminations fréquentes Production irrégulière
Ferment indéfini	Ferment naturel à l'origine, ayant subi une stabilisation pour une plus grande reproductibilité.	Diversité intermédiaire Flore indigène	Composition variable
Ferment défini	Souches purifiées, caractérisées et assemblées	Composition définie Production régulière	Faible diversité Susceptibles aux phages

II.2.C. Le métabolisme des ferments lactiques

Les ferments lactiques ont un rôle primaire de production d'acide lactique pour assurer l'acidification dans le processus de production fromagère. Ils sont également utilisés pour leur contribution à la formation de saveurs et de texture dans les fromages. Ces différents rôles s'expliquent principalement par quatre voies métaboliques importantes, le métabolisme des glucides (glycolyse), la protéolyse, la lipolyse, et dans certains cas, le métabolisme du citrate.

Voies de transport et d'utilisation du lactose

Le métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques

La principale source d'énergie retrouvée dans le lait pour la croissance des bactéries lactiques est le lactose. Le lactose est un disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose liées par une liaison β 1,4. Son métabolisme implique l'import dans la cellule par différents types de systèmes de transport. Il existe des systèmes phosphoenolpyruvate-phosphotransférases (PEP-PTS), dans lequel l'énergie dans le PEP est transférée au lactose par des réactions en séries effectuées par différentes enzymes (EI, IIA, IIB, IIC) et une protéine thermostable HPr. Le lactose peut également être transporté dans la cellule par le biais de systèmes perméases (Fox et al. 2017; Xiong et al. 2019).

Lorsqu'il a été internalisé dans la cellule, le lactose est clivé en deux molécules distinctes de glucose et galactose par la β -galactosidase ou la phospho- β -galactosidase. Le glucose résultant peut être fermenté par la voie glycolytique (par les bactéries homofermentaires ; Figure 4) ou la voie des pentose-phosphates (par les bactéries hétérofermentaires ; Figure 4). Les produits obtenus sont différents dans ces deux voies fermentaires. Le métabolisme d'une mole de glucose *via* la glycolyse conduit à la production de 2 moles d'acide lactique, tandis que la voie des pentose-phosphates aboutit à la production équimolaire d'acide lactique, éthanol (ou acide acétique) et CO₂.

Le galactose résultant peut, quant à lui, être métabolisé par deux voies, la voie Tagatose-6-Phosphate (Tagatose-6P) ou la voie de Leloir. Toutes les espèces ne fermentent pas le galactose, et cette capacité peut également être souche-dépendante au sein d'une même espèce (de Vin et al. 2005). Le système de transport utilisé (PEP-PTS ou perméases) pour l'internalisation du lactose peut orienter le flux pour une voie spécifique. L'utilisation du système PEP-PTS est liée à la voie des Tagatose-6P tandis que l'utilisation de perméases est liée à la voie de Leloir (Iskandar et al. 2019). L'utilisation du galactose par la voie de Leloir chez les bactéries lactiques peut aboutir à la formation d'acide lactique ou d'autres composés, tels que des exo-polysaccharides.

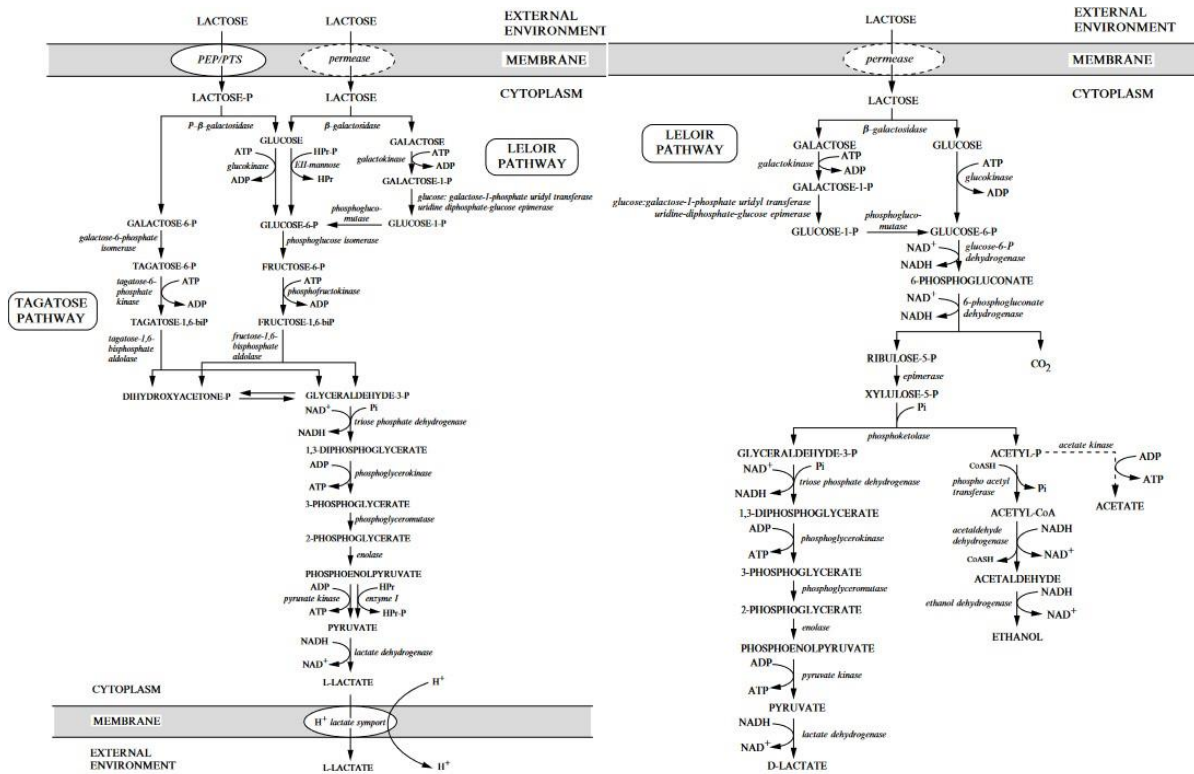


Figure 5 Voie EMP et voie des pentose-phosphates pour le métabolisme du lactose chez les bactéries lactiques. Selon Fox et al., 2017

Le métabolisme du lactose chez *Streptococcus thermophilus*

Le métabolisme carboné chez *Streptococcus thermophilus* a été décrit par de nombreux auteurs (Foucaud et Poolman. 1992; Hutkins et Morris. 1987; Poolman et al. 1989; Vaillancourt et al. 2008; Gasser et al. 2022). Chez cette espèce, le lactose est transporté dans la cellule par une lactose perméase, encodé par le gène *lacS*. Cette perméase fonctionne simultanément comme i) un symporteur, par lequel le lactose rentre et ii) un antiporteur, où l'export d'un galactose permet l'import d'un lactose. A l'intérieur de la cellule, le lactose est hydrolysé par une β -galactosidase (encodée par le gène *lacZ*), produisant du glucose et du galactose. Le glucose est alors phosphorylé en glucose-6P par une glucokinase (encodée par le gène *gk*) et entre alors dans la voie EMP pour former de l'acide lactique (Figure 5, 6).

La capacité à métaboliser le galactose est souche-dépendante chez *S. thermophilus*. Chez cette espèce, le galactose est métabolisé par la voie de Leloir pour être converti en UDP-glucose (puis, éventuellement, en exo-polysaccharides). Le galactose est converti en glucose-1-phosphate par le cluster *galRKTEM*, qui consiste en un régulateur GalR, une galactokinase GalK, une galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GalT), une UDP-glucose-4-epimérase (GalE), et une galactose mutarotase (GalM; Xiong et al. 2019; Figure 5, 6). Il a été démontré qu'un set complet de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la voie de Leloir ne garantit pas nécessairement un phénotype Gal⁺. Le phénotype positif dépendrait plutôt d'une mutation dans le promoteur du gène galactokinase (*galk*), aboutissant à une transcription insuffisante. En

effet, une simple substitution G-to-A dans la position -9 du promoteur peut améliorer l'activité du promoteur et être responsable de la capacité des souches à fermenter le galactose (van den Bogaard et al. 2000; de Vin et al. 2005; Giaretta et al. 2018; Xiong et al. 2019).

En outre, l'espèce *S. thermophilus* peut utiliser le lactose, le glucose, le galactose, le fructose et le saccharose comme unique source carbonée, bien que le métabolisme du fructose et du galactose n'ait été rapporté que pour quelques souches (Gasser et al. 2022). Le transport de ces différents glucides peut se faire par l'intermédiaire de perméases, de systèmes de transports PEP-PTS et d'ABC transporteurs (Figure 5, 6).

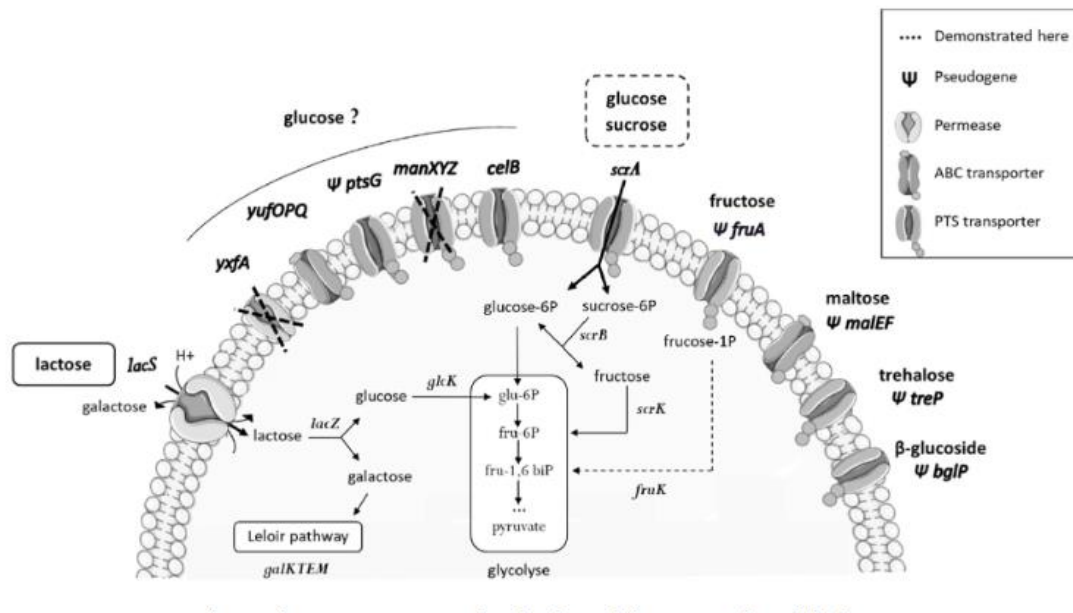


Figure 6 Représentation schématique du métabolisme des glucides chez *S. thermophilus* LMD-9, selon Gasser et al., 2022

Le métabolisme du lactose chez *Lactobacillus delbrueckii*

Le transport et l'utilisation du lactose chez l'espèce *L. delbrueckii* dépend de la sous-espèce. La sous-espèce *bulgaricus* utilise un système de perméase (encodée par le gène *lacS* ou *galP*) pour l'import du lactose, qui a été acquis dans le génome par transferts horizontaux. Le lactose est clivé par une β -galactosidase, et la moitié galactose est excrétée par le système antiporteur de la perméase. La sous-espèce *bulgaricus* ne métabolise donc pas la moitié galactose provenant du lactose. La moitié glucose entre dans la voie EMP pour être transformé en acide lactique (El Kafsi et al. 2014; Figure 6).

La sous-espèce *lactis* utilise ce même système antiporteur (perméase *lacS* ou *galP*), mais possède également un système PEP-PTS spécifique du lactose (encodé par les gènes *lacE* et *lacF*). Ce système semble provenir de l'ancêtre de l'espèce, qui aurait été conservé chez la sous-espèce *lactis* et perdue chez la sous-espèce *bulgaricus* (Grossiord et al. 1998; Kandler 1983; El Kafsi et al. 2014; Figure 6).

Dès lors que le lactose a été internalisé, il peut être clivé soit par une β -galactosidase cytoplasmique (*lacZ* ; dans le cas d'un import *via* une perméase), soit par une phospho- β -galactosidase (*lacG* ; dans le cas d'un import *via* un système PEP-PTS), aboutissant à la phosphorylation du lactose. Les enzymes LacE, LacF et Le glucose résultant entre ensuite dans la voie EMP. Le système de transport utilisé pour l'internalisation du lactose oriente le flux de carbone vers une voie de métabolisation du galactose spécifique. Un transport par un système PEP-PTS est lié à la voie Tagatose-6P alors que l'utilisation de perméases est liée à la voie de Leloir (Iskandar et al. 2019). Puisque la sous-espèce *bulgaricus* n'est pas capable de métaboliser le galactose, elle n'est pas concernée par ces deux voies (El Kafsi et al. 2014; Figure 6).

Dans la voie de Leloir, le galactose est converti en glucose-1-phosphate par le cluster de gènes *galRKTEM*. Dans la voie du Tagatose-6P, le galactose-6P est transformé en glyceraldehyde-3P par une série de réactions effectuées par les enzymes galactose-6-phosphate isomérase (*lacAB*), tagatose-6-phosphate kinase (*lacC*) et tagatose-1,6-diphosphate aldolase (*lacD*) (El Kafsi et al. 2014).

El Kafsi et al. (2014) ont déterminé le potentiel métabolique de l'utilisation des glucides chez les deux sous-espèces (4 souches de spp. *lactis* et 4 souches de spp. *bulgaricus*) et ont rapporté que la sous-espèce *lactis* est capable de métaboliser un éventail de glucides plus large, notamment d'origine végétale, que la sous-espèce *bulgaricus*. Ils ont également rapporté un haut degré de variabilité au sein de la sous-espèce *lactis*, à la fois au niveau du nombre (6 à 12) et de la nature des glucides qu'ils sont capables de métaboliser. La capacité des souches de *L. delbrueckii* à métaboliser différents glucides semble être plus importante chez la sous-espèce *lactis*, bien que la variabilité des profils observés indique qu'une analyse *in silico* et/ou phénotypique est indispensable pour leur caractérisation.

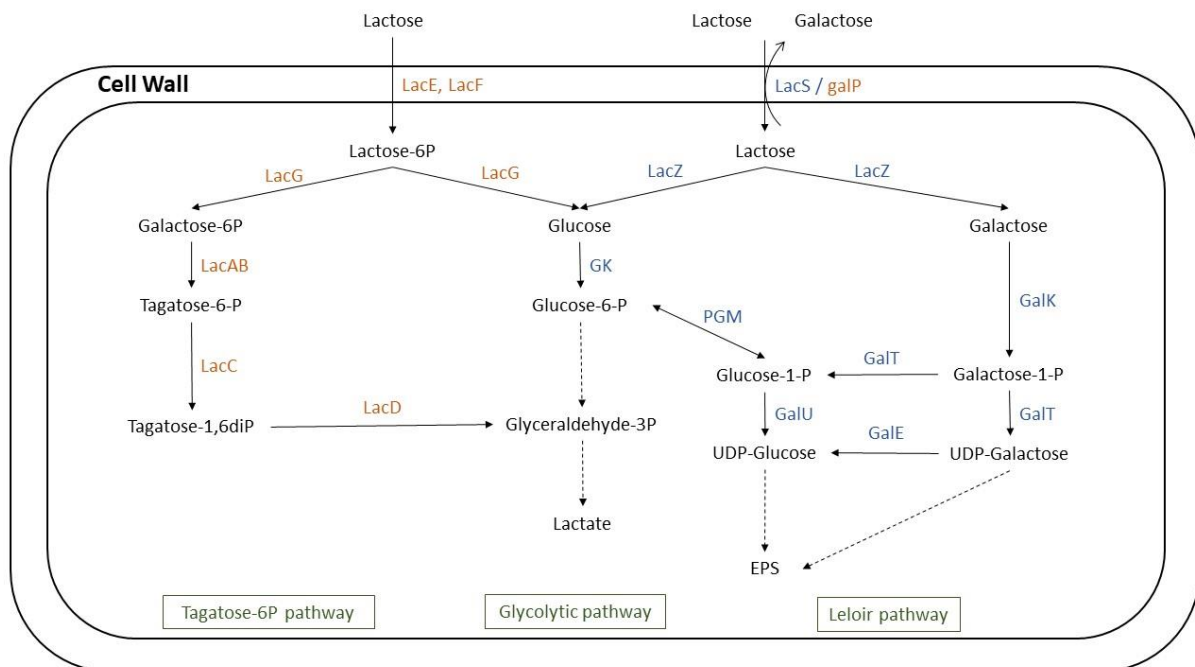


Figure 7 Transport et métabolisme des glucides chez *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. Les enzymes annotées en orange sont retrouvées uniquement chez *L. delbrueckii*, tandis que celles en bleu sont retrouvées dans les deux espèces. GalE, phosphoglucomutase; GalK, galactokinase; galP, galactose and lactose permease; GalT, galactose 1-P uridylyltransferase; GalU, UDP-glucose pyrophosphorylase; GK, glucokinase; GlcU, glucose permease; LacAB, galactose-6-phosphate isomerase; LacC, tagatose-6-phosphate kinase; LacD, tagatose 1,6-diphosphate aldolase; LacE, PTS family lactose porter, EIICB components; LacF, PTS family lactose porter, EIIA components; LacG, 6-phospho- β -galactosidase; LacS, lactose permease; LacZ, β -galactosidase; PGM, phosphoglucomutase.

Import et hydrolyse des caséines : La protéolyse

Impact de la protéolyse sur les fromages

La protéolyse est reconnue comme l'un des processus biochimiques les plus cruciaux dans la production fromagère (Fox, 1989). Elle joue un rôle central dans la transformation des caséines, les acides aminés issus de cette protéolyse étant des précurseurs clés pour la génération de composés aromatiques spécifiques comme les alcools, aldéhydes, acides, esters et composés soufrés (Smit et al. 2005). Une préoccupation majeure dans la fabrication de certains fromages est l'amertume, causée notamment par l'accumulation de peptides hydrophobes, riches en proline (Savijoki et al. 2006). Les spécificités des protéases de paroi sont cruciales pour la production de ces peptides (Visser et al. 1986; Rodriguez et al. 1996; Broadbent et al. 2002). Par ailleurs, certaines peptidases comme PepN, PepX, PepO2 et PepO3 jouent un rôle dans la dégradation des peptides, influençant ainsi le développement des caractéristiques organoleptiques des produits laitiers (Chen et al. 2003; Chen et Steele. 1998; Christensen et Steele. 2003).

Cependant, bien qu'un niveau équilibré de protéolyse soit essentiel pour la formation d'arômes et pour prévenir l'amertume dans le fromage, c'est la conversion en acides aminés libres, plus que la protéolyse elle-même, qui régule la production d'arômes à partir des protéines (Smit et al. 2005).

Le processus par lequel les bactéries lactiques (BL) fermentent le lait implique un système protéolytique complexe. Pour se développer, ces microorganismes ont besoin d'acides aminés et/ou de peptides provenant de sources externes, principalement obtenus par la décomposition des caséines. Cette décomposition est initiée par une protéinase liée à la paroi cellulaire (CEP = Cell Envelope Proteinase), qui scinde les protéines en oligopeptides. Ces derniers sont ensuite transportés dans la cellule grâce à des systèmes de transport spécifiques, où ils sont davantage décomposés en peptides plus petits et en acides aminés par de nombreuses peptidases intracellulaires. En plus de son importance pour la croissance cellulaire, ce processus protéolytique joue un rôle crucial dans la formation des arômes et affecte la texture des fromages finaux.

Le système protéolytique des bactéries lactiques

La première étape de l'utilisation des caséines par les bactéries lactiques est effectuée grâce aux enzymes connues sous le nom de protéases associées à l'enveloppe cellulaire (CEPs). Il existe six types principaux de CEPs, identifiés à travers diverses études (Holck et Næs. 1992; Gilbert et al. 1996; Pederson et al. 1999; Fernandez-Espla et al. 2000; Pastar et al. 2003; Genay et al. 2009; Chapot-Chartier et Kulakauskas 2014).

- PrtP, identifié chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.
- PrtH identifiée chez *Lactobacillus helveticus* (PrtH, PrtH2, PrtH3 et PrtH4).
- PrtR identifiée chez *Lactobacillus rhamnosus*.
- PrtS identifiée chez *Streptococcus thermophilus*.
- PrtB identifiée chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.
- PrtL identifiée chez *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*.

Les CEPs des bactéries lactiques se composent de plusieurs domaines fonctionnels distincts (Savijoki et al. 2006; Siezen. 1999) :

- Un prépro-domaine (PP), qui comprend une séquence signal (d'environ 40 résidus) et une proséquence (150 résidus), permettant aux CEPs de se plier correctement.
- Un domaine de protéase à sérine (PR) d'environ 500 résidus, contenant la section catalytique.
- Un domaine insert (I) d'environ 150 résidus, probablement impliqué dans la modulation de la spécificité des substrats des CEPs.
- Un domaine "A" (d'environ 400 résidus), dont la fonction reste inconnue.
- Un domaine "B" (d'environ 500 résidus), vraisemblablement lié à la stabilisation de l'activité et de la spécificité des CEPs.

- Un domaine hélice H (d'environ 200 résidus), impliqué dans le positionnement des domaines A et B à l'extérieur de la cellule bactérienne.
- Un domaine hydrophile W (d'environ 100 résidus), agissant comme un espaceur dans la paroi cellulaire.
- Un domaine d'ancrage à la paroi cellulaire AN (environ 35 résidus) qui renferme le motif LPXTG reconnu par la sortase A.

Lorsque les caséines ont été hydrolysées en peptides, les systèmes de transport de peptides prennent le relais dans le système protéolytique, et assurent l'import des peptides à l'intérieur de la cellule bactérienne. Plusieurs types de systèmes de transports de peptides ont été caractérisés chez les bactéries lactiques.

- Le système Opp, qui catalyse l'import d'oligopeptides dans la cellule. Ce système appartient à la famille des transporteurs ABC et est composé de cinq protéines : une protéine liant les oligopeptides (OppA), deux protéines membranaires (OppB et OppC) et deux protéines liant les nucléotides (OppD et OppF). *Streptococcus thermophilus* possède en général 3 paralogues de la protéine OppA, chacun impliqué dans l'internalisation des peptides (Savijoki et al. 2006).
- Le système Dpp (parfois appelé Opt), un transporteur ABC au même titre que le système Opp. Ce système est composé de six protéines : deux protéines liant les oligopeptides (DppA et DppP), deux protéines membranaires (DppB et DppC) et deux protéines liant les nucléotides (DppD et DppF) (Doeven et al. 2005). Ce système semble présenter une préférence pour les peptides hydrophiles et chargés (Savijoki et al. 2006).
- Le système Ami, un transporteur de type ABC, caractérisé chez *S. thermophilus*. Il permet le transport d'oligopeptides et est constitué de deux protéines transmembranaires (AmiC et AmiD), deux protéines cytoplasmiques liant l'ATP (AmiE et AmiF) et de protéines liant les oligopeptides (AmiA1, AmiA2 et AmiA3 ; Tynkkynen et al. 1993; Garault et al. 2002).
- Le système DtpT, un transporteur secondaire qui appartient à la famille des transporteurs de peptides PTR. Il s'agit d'un système de transport de di- et tri-peptides (Fang et al. 2000). Il est constitué d'une seule protéine codée par un gène chromosomique monocistronique et a une affinité particulière pour le transport des peptides contenant des acides aminés à chaînes ramifiées (Guédon et al. 2001; Savijoki et al. 2006).
- Le transporteur de type ABC nommé OTS, caractérisé chez *S. thermophilus*. Il est composé d'une protéine OtsA, deux perméases OtsB et OtsC et d'une double ATPase OtsD et serait spécifique de peptides de petite taille (Jameh et al. 2016).

L'étape de la protéolyse qui suit l'internalisation des peptides est leur dégradation par l'action simultanée d'une multitude de peptidases avec différentes spécificités (Kunji et al. 1996). Savijoki et al. (2006) ont référencé toutes les peptidases caractérisées chez les bactéries lactiques (Table 2). Les endopeptidases intracellulaires, les aminopeptidases générales et la peptidase PepX sont les premières enzymes à agir sur

les oligopeptides. Aucune des endopeptidases n'est capable d'hydrolyser les caséines intactes, elles hydrolysent les liaisons des peptides dérivant des caséines (préalablement hydrolysées par les protéases de paroi). Les di- et tripeptides générés par l'ensemble de ces peptidases vont être clivés de nouveaux par la tri-peptidase PepT et les di-peptidases PepV et PepD (Table 2).

Table 2 Peptidases caractérisées chez les BL. Selon Savijoki et al. 2006

Peptidase	Espèce de BL	Spécificité du substrat
PepO	<i>Lc. lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. rhamnosus</i> ; <i>S. thermophilus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepO2	<i>Lc. Lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepF1	<i>Lc. lactis</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepF2	<i>Lc. lactis</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepO3	<i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepE	<i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepE2	<i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepF	<i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
pepG	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	NH 2-Xn↓Xn-COOH
PepN	<i>Lc. lactis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>S. thermophilus</i>	NH 2-X↓Xn-COOH
PepC	<i>Lc. lactis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>S.thermophilus</i>	NH 2-X↓Xn-COOH
PepS	<i>S. thermophilus</i>	NH 2-X↓Xn-COOH
PepA	<i>Lc. lactis</i>	NH2-Glu/Asp↓Xn-COOH
PepL	<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	NH 2-X↓X-X-COOH
PepT	<i>Lc. lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i>	NH 2-X↓X-X-COOH
PepD	<i>Lb. helveticus</i>	NH 2-X↓X-COOH
PepV	<i>Lc. Lactis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	NH 2-X↓X-COOH
PepQ	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	NH 2-X↓Pro-COOH
PepI	<i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> ; <i>Lb. helveticus</i>	NH 2-Pro↓Xn-COOH
PepR	<i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. rhamnosus</i>	NH 2-Pro↓X-COOH
PepX	<i>Lc. lactis</i> ; <i>Lb. delbrueckii</i> ; <i>Lb. helveticus</i> ; <i>Lb. rhamnosus</i> ; <i>S. thermophilus</i>	NH2-X-Pro↓Xn-COOH
PepP	<i>Lc. Lactis</i>	NH2-X↓Pro-Xn-COOH

Le système protéolytique de l'espèce *Streptococcus thermophilus*

La protéinase PrtS a été caractérisée chez *S. thermophilus* (Fernandez-Espla et al. 2000). Le gène codant pour la protéine PrtS est variablement présent dans les collections de souches de *S. thermophilus*, avec un maximum identifié aux alentours de 50 % de souches possédant le gène *prtS* (Table 3). La protéase est essentielle pour la croissance optimale de l'espèce lorsqu'elle est présente seule dans le lait. Les souches possédant le gène *prtS* présentent souvent un phénotype de croissance rapide, associée à une acidification plus intense du lait. En revanche, la seule présence du gène *prtS* ne garantit pas une activité protéolytique efficace, puisqu'un phénotype faiblement protéolytique peut être lié à une altération de la régulation de ce gène (Galia et al. 2009).

Table 3 Prévalence du gène *prtS* dans les génomes de souches de *S. thermophilus*

Prévalence	Source
21/135 (15%)	Delorme et al. (2010)
3/97 (3%)	Fernandez-Espla et al. (2000)
35/47 (53%)	Rasmussen et al. (2008)
19/79 (24%)	Roux et al. (2022)
72/191 (38%)	Brasca et al. (2016)
15/30 (50%)	Galia et al. (2009)
59/172 (34%)	Yamamoto et al. (2020)

Deux systèmes de transport spécifiques à l'espèce *S. thermophilus* ont été identifiés et caractérisés : le système Ami et le système Ots. Les systèmes DtpT et Opp ont également été identifiés dans le génome de souches de *S. thermophilus* (Rodríguez-Serrano et al. 2018; Alexandraki et al. 2019). Un total de 12 peptidases a été identifié par Liu et al. (2010) et Alexandraki et al. (2019) dans le génome de plusieurs souches de *S. thermophilus*, dans des études de génomique comparative (Table 4).

Le système protéolytique de l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*

Chez l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*, Gilbert et al. (1996) ont identifié la protéase PrtB chez la sous-espèce *bulgaricus*, tandis que Hebert et al. (2013) ont découvert la protéase PrtL chez la sous-espèce *lactis*. Cependant, il manque des informations dans la littérature concernant la prévalence des gènes *prtB* et *prtL*. Une étude menée par Elean et al. (2023) sur 27 souches de *L. delbrueckii* a révélé la présence d'une protéase dans chaque génome étudié. Ils ont constaté une forte conservation génomique du gène *prtB* chez *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, et une variabilité plus importante du gène *prtL* chez la sous-espèce *lactis*, en raison de l'existence de séquences d'insertion, de suppression et de réarrangement.

Brown *et al.* (2017) ont identifié deux systèmes de transport de peptides dans le génome de la souche CRL 581 de *L. delbrueckii* *spp. lactis* : le système Opp et le système Opt (préalablement décrit comme Dpp). Liu *et al.* (2010), en étudiant la souche *L. delbrueckii* *spp. bulgaricus* ATCC 11842, ont également détecté ces systèmes dans son génome. Néanmoins, le système DtpT n'a été identifié dans aucune de ces études. Il y a peu de recherches centrées spécifiquement sur le système protéolytique de cette espèce. Trois articles ont cependant signalé la présence de 16 peptidases dans les génomes de *L. delbrueckii*. Les gènes codant pour les peptidases pepA, pepG/E, pepP et pepL n'ont pas été trouvés dans tous les génomes, alors que les 12 autres peptidases ont été identifiées dans l'ensemble des génomes examinés (Table 4).

Table 4 Enzymes du système protéolytique des espèces *L. delbrueckii* et *S. thermophilus*

	<i>Lb. delbrueckii</i> <i>spp. lactis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> <i>spp. bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>
Protéases			
PrtS	-	-	1, 2, 3
PrtB	-	4, 5	-
PrtL	4, 6	-	-
Systèmes de transport			
Opp	7	8	2
Dpp	7	8	-
DtpT	-	-	2
Ami	-	-	9
Ots	-	-	10
Peptidases			
PepC	7, 4	8, 4	8,2
PepN	7, 4	8, 4	8,2
PepA	7, 4	8, 4	8,2
PepM	7, 4	8, 4	8,2
PepF	7, 4	8, 4	8,2
PepO	7, 4	8, 4	8,2
PepG/E	7, 4	8, 4	-
PepD	7, 4	8, 4	-
PepV	7, 4	8, 4	8,2
PepT	7, 4	8, 4	8,2
PepP	7, 4	8, 4	8,2
PepQ	7, 4	8, 4	8,2
PepR	7, 4	8, 4	-
PepL	7, 4	8, 4	-
PepI	7, 4	8, 4	-
PepX	7, 4	-	8,2
PepS	-	-	8,2

¹Fernandez-Espla *et al.* (2000b); ²Alexandraki *et al.* (2019); ³Hols *et al.* (2005); ⁴Gilbert *et al.* (1996); ⁵Elean *et al.* (2023); ⁶Hebert *et al.* (2013); ⁷Brown *et al.* (2017); ⁸Liu *et al.* (2010); ⁹Garault *et al.* (2002); ¹⁰Jameh *et al.* (2016)

Lipolyse et catabolisme d'acides gras libres

La lipolyse, un processus biochimique crucial qui se manifeste pendant l'affinage des fromages, a particulièrement été étudiée dans les fromages à pâte persillée où elle atteint des niveaux élevés et constitue le mécanisme principal de création des arômes. Le lait, quant à lui, est une émulsion de type huile dans l'eau, avec des globules de matière grasse répartis dans sa phase continue. Ces globules sont entourés d'une membrane fine, la membrane des globules gras du lait (MFGM = Milk Fat Globule Membrane), qui assure leur stabilité. Les triglycérides, composants majoritaires des lipides du lait, en représentent jusqu'à 98 %, tandis que les phospholipides, bien qu'ils ne représentent que moins de 1 % des lipides totaux, jouent un rôle crucial dans la MFGM. La MFGM elle-même est une combinaison complexe de protéines, phospholipides, glycoprotéines, triglycérides, cholestérol, enzymes et autres composants mineurs. Elle agit comme un agent émulsifiant naturel, permettant aux matières grasses de rester dispersées dans la phase aqueuse du lait (Collins et al. 2003).

Dans les fromages, la lipolyse est induite par des enzymes lipolytiques, des hydrolases qui coupent les liaisons ester entre les acides gras et le glycérol dans les triglycérides, générant ainsi des acides gras libres ainsi que des mono- et di-glycérides. Ces enzymes lipolytiques sont constituées d'estérases et/ou de lipases. Les estérases agissent sur les acyl-esters ayant entre 2 et 8 atomes de carbone, tandis que les lipases agissent sur les chaînes de 10 atomes de carbone ou plus. Les estérases s'attaquent aux substrats solubles dans l'eau, alors que les lipases ciblent les substrats en émulsion (McSweeney et Sousa. 2000).

Bien que le lait renferme des lipases et des estérases, dont la lipoprotéine lipase indigène (LPL), ce sont les enzymes provenant des microorganismes qui jouent un rôle clé dans la lipolyse des fromages. Les microorganismes sont dotés d'enzymes esterolytiques capables de décomposer une variété d'esters présents dans la matière grasse du lait et du fromage. Les levures et les moisissures sont les principaux microorganismes responsables de l'activité lipolytique dans les fromages. Malgré leur équipement enzymatique, les BL sont généralement perçues comme ayant une activité lipolytique limitée. Toutefois, leur abondance durant les longues périodes d'affinage les rend responsables de la libération significative d'acides gras libres (Collins, et al. 2003; McSweeney et Sousa. 2000).

Au sein des fromages, les acides gras libres, particulièrement ceux à chaînes courtes et moyennes, libérés pendant la lipolyse, jouent un rôle essentiel dans le développement des saveurs. Ces acides gras servent de précurseurs pour diverses réactions cataboliques qui conduisent à la création de composés aromatiques. Parmi ces composés, on trouve des méthyl-cétones, des lactones, des esters, des alcanes et des alcools secondaires, tous contribuant activement au profil aromatique distinctif des fromages (Collins et al. 2003).

II.3. Le retour des ferments autochtones : développement et impact sur les productions fromagères

Afin de renforcer le caractère authentique des fromages, avec des saveurs plus typées et diversifiées en arômes, les filières fromagères s'intéressent de plus en plus à la recherche et au développement de nouvelles souches d'intérêt technologique. Ces souches pourraient être issues de leur matrice originelle, le lait cru ou les fromages, et permettraient ainsi de renouer un lien au terroir et de préserver la diversité microbienne locale (Wouters et al. 2002 ; Carafa et al. 2019). Un *ferment autochtone* peut se définir comme un isolat ou un consortium microbien issu de matrices locales (souvent isolés à partir de laits ou de fromages traditionnels) et possédant un potentiel technologique pour la fabrication fromagère, par opposition aux ferments commerciaux dont les souches sont cultivées en laboratoire, approuvées comme sûres et qui sont distribuées à large échelle dans l'industrie alimentaire (Pavunc et al. 2012).

Cette section est présentée sous la forme d'une revue qui sera soumise au journal « International Journal of Food Microbiology ».

Review**Development and impact of defined autochthonous starter cultures for cheese production: current and future**

Anna Grizon ^{a, b}, Pascal Bonnarme ^b, Christophe Chassard ^a

^a UMR545 Fromage, INRAE, VetAgro Sup, Université Clermont Auvergne, Aurillac, France

^b Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, Palaiseau, France

Abstract

Autochthonous starter cultures are an interesting solution to replace commercial and natural starters, making it possible to produce reliable and reproducible cheeses and reforming the link with the terroir. The development of such starters is based on a complex process. Once the choice of species composition of the starter to develop has been determined, lactic acid bacteria from cheeses, milks or natural starters must be isolated. The next step involves the technological characterization of these bacteria. This includes assessing their resistance to various stresses and evaluating their functional characteristics, such as acidification and proteolytic activities, which directly influence cheese quality. A complementary step of genetic characterization involves the analyze of the bacterial diversity and the identification of potential metabolic pathways. This characterization insight helps in understanding how these bacteria will behave in the cheese-making process. Safety assessment is also critical to ensure that the selected bacteria are safe for consumption and do not produce harmful substances. Then, the selection and assembly of these bacteria into a starter culture that meets the specific requirements of the cheese being produced, can proceed. This assembly is based on the results from the previous steps. Finally, the assessment of the impact of the developed starter culture on cheese production includes evaluating how the culture influences the microbiological, physico-chemical, and sensorial properties of the cheese. The ultimate goal is to enhance these qualities, ensuring a consistent, high-quality product that meets both safety standards and consumer preferences. This comprehensive process is vital for the development of autochthonous starter cultures tailored to specific cheese varieties

Keywords

Autochthonous starter, Lactic acid bacteria, Cheese

Abbreviations

LAB, lactic acid bacteria; ASC, Autochthonous starter culture; CSC, Commercial starter culture; NSC, Natural starter culture

1. Introduction

The majority of global cheese production relies on widely distributed commercial starter

cultures (CSCs), which are part of the manufacturing of various fermented dairy products and are not specific to any one cheese

variety. Additionally, some cheese utilizes natural starters cultures (NSC) that derives from the inherent microflora found in raw milk and are subject to selective cultivation processes. Notably, there are no stringent measures in place to prevent contamination from the raw milk or the surrounding manufacturing environment. The regulation of culture conditions during the starters' propagation is somewhat limited. Consequently, these NSCs are subject to continuous evolution. This results in a dynamic and not strictly controlled composition of lactic acid bacteria (LAB) species and strains (Parente et al. 2017).

The development of autochthonous starter cultures (ASCs) represents an innovative solution, addressing the limitations associated with both CSCs and NSCs. Utilizing local indigenous starter fosters the production of cheeses characterized by their consistent quality, while simultaneously enhancing the regional identity of these products. This approach involves the adoption of microbial strains that are exceptionally well-suited to the specific manufacturing conditions of particular cheese varieties (Johnson 2017; Lucey et al. 2003; Munekata et al. 2023). Furthermore, the use of indigenous starters can play a crucial role in reinforcing food sovereignty and invigorating the local economy. It achieves this by recognizing and leveraging the unique knowledge and resources endemic to the region. In the last two decades, there has been a significant emergence of autochthonous starters, a burgeoning field that has garnered extensive research attention due to its promising potential. This review aims to comprehensively examine the methodologies involved in the development of indigenous starters with a defined composition. Additionally, it seeks to explore their consequential impact on the

microbiological, physico-chemical, and sensory attributes of cheeses, providing a deeper insight into this innovative area of cheese production.

2. Bacterial species composition of ASCs

As previously mentioned, the different varieties of cheeses rely on the use of different methods to ensure the fermentation process. Some varieties use NSCs, and some use CSCs. The development of autochthonous starters of defined composition may be used to replace or complement these different methods. The choice of the composition of these consortia therefore depends on the method commonly used in cheese making.

When substituting CSCs, the composition of the indigenous starter to develop is mainly determined by the species present in the widely used commercial variant. Microbiologists typically relies on the bacterial species composition that is commonly recognized in CSCs. This method was used for a wide range of cheeses, including Comlek Peyniri, a traditional cheese from Central Anatolia. The development of an autochthonous starter for this cheese involved the isolation of LAB from cheeses samples for the replacement of a mesophilic CSC mainly composed of homofermentative LAB (Bulut et al. 2005). A large part of the production of Rocamadour, a French PDO goat's milk cheese relies on CSCs consisting of *Lactococcus* strains. The authors consequently isolated and characterized strains belonging to this species from milks collected on the Rocamadour PDO area to develop an autochthonous starter culture (Tormo et al. 2015; Couderc et al. 2022). In another study, *Lactococcus lactis* were specifically isolated from Manchego cheeses to replace CSCs mainly composed of this species (Nieto-Arribas et al. 2009). Additionally, Grizon et al. (2023) isolated *Streptococcus thermophilus*

strains and characterized them to identify potential candidates to replace CSCs mainly composed of this species for the production of Saint-Nectaire PDO French cheese

Conversely, the manufacture of certain varieties of cheese still relies on the spontaneous acidification of milk or the use of NSCs, resulting in the production of cheeses with defects, and leading to variable and heterogeneous products that promote safety risks. The use of indigenous starters appears as a powerful solution to overcome these drawbacks while maintaining the typicity of the products. In these cases, the composition of the autochthonous starter to be developed is often determined according to the key species constituting the ecosystems of traditional cheeses. The Serpa cheese is a PDO Portuguese product manufactured from ovine raw milk without the addition of starter culture (Araújo-Rodrigues et al. 2021; 2020). Gonçalves et al. (2018) investigated the bacterial community of this cheese and the genera *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* were the main groups identified using high-throughput sequencing analysis. From these results, Ruiz-Moyano et al. (2019) selected 116 LAB belonging to these genera to screen their probiotic properties and their prebiotic metabolism, and Araújo-Rodrigues et al. (2021) selected 11 interesting strains of *Lactobacillus spp.* and characterized their technological performance for their potential use as ASCs adapted to the Serpa PDO cheeses. Traditional Mountain (TM) cheese is a spontaneously fermented cheese made in Italy. Carafa et al. (2016) studied the microbial population of this cheese and identified *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* as the three dominant species both in curd and in 24 hours cheeses. They characterized the technological potential of

the isolated lactococci and streptococci strains. They subsequently identified a strain of *Lactococcus lactis subsp. lactis* and a strain of *Streptococcus thermophilus* with interesting technological capacities that were tested in association with some *Lactobacillus* strains for their potential use as starter for the production of Traditional Mountain cheese variety by Carafa et al. (2019). Similarly, Riquelme et al. (2015) analyzed the bacterial community of Pico cheese, a traditional food of the Azores Island (Portugal) made without the addition of starter, using high throughput sequencing. Pico cheese microbiota seemed to be composed mainly of LAB, including *Lactococci*, *Enterococci*, *Lactobacilli* and *Leuconostocs*. Then, Câmara et al. (2019) isolated LAB from Pico cheeses and characterized their technological capacities. de Aguiar et al. (2022) selected strains of *Lc. lactis spp. lactis*, *Lb. paracasei* and *Ln. pseudomesenteroides* and evaluated them for their potential use as starter culture for Pico cheese production. The same procedure was also realized for Pecorino Sardo cheese (Madrau et al. 2006), Valle d'Aosta Fromadzo (Dolci et al. 2020) and for Tenerife cheese (Pérez et al. 2003; Zárata et al. 1997; Gonzalez and Zarate 2012).

The development of indigenous starters for use in the production of cheeses that usually use NSC, may also involve the isolation of LAB from samples of these NSC. Speranza et al. (2015) isolated LAB strains from samples of natural whey starters and cheeses for the development of starter cultures adapted to Fiore di Latte, an Italian cow's milk cheese. De Angelis et al. (2008) selected autochthonous strains isolated by de Candia et al. (2007) from natural whey starter cultures for the production of Mozzarella cheese.

In some case, non-starter LAB are added to the composition of the starter to enhance the

sensorial and physico-chemical characteristics of cheeses (Carafa et al. 2019; Gaglio et al. 2020; Poveda et al. 2015; Awad et al. 2007; Taboada et al. 2015).

3. Isolation source of LAB

Raw milk and cheese samples are important reservoirs of microbial diversity, and are a particularly interesting source of LAB. Both culture-dependent and culture-independent methods highlighted a strong diversity of microbial communities in these samples in a wide range of dairy products from different origins (Guo et al. 2023; Erhardt et al. 2023; Papadakis et al. 2021; Ryu et al. 2021). Therefore, while the species composition of the starter to be developed has been determined, autochthonous LAB are mainly isolated from these samples to obtain strains that represent local microbiota.

Isolations campaigns could be carried out from cheeses at different steps of the manufacturing process and different ripening time, as population dynamics change over these periods. Madrau et al. (2006) isolated and identified LAB from raw ewes' milk and traditional Pecorino Sardo cheese to define the autochthonous lactic microflora present in milk and the evolution of LAB during cheese ripening. They highlighted changes of microbial population throughout the manufacturing: coccal-shaped LAB predominated during the fermentation phase of the cheese, and lactobacilli were more prevalent in the later stages of ripening. This strategy was also used among other things, for the development of starters adapted to the production of Caciotta della Garfagnana cheese (Turchi et al. 2011), Pecorino Crotonese cheese (De Pasquale et al. 2019), Syrian Akawi cheese (Al-kotami et al. 2015), fresh goat cheeses from Northern Morocco (El Galiou et al. 2015) and Manchego cheese (Nieto-Arribas et al. 2009).

The bacterial populations in cheeses produced using CSCs predominantly consist of these commercially introduced strains. Consequently, sourcing LAB from such cheeses might not effectively capture the diversity of local strains. As a result, the process of isolating these bacteria is generally conducted using raw milk samples obtained from the production area (Couderc et al. 2022; Grizon et al. 2023).

In addition, whether the isolation was made from raw milk or from cheeses, the original matrices may be collected from different farms and at different period (seasons) to maximize the chances to obtain strains representative of the reservoir diversity. In fact, seasonal changes and dairy factories impacts the microbial population of cheeses (Ercole et al. 2020; Cardoso et al. 2013; Sánchez-Gamboa et al. 2018; Renes et al. 2021; Pino et al. 2021; Tavaría et al. 2006; Pintado et al. 2008) and most probably their sensorial properties.

In recent years, the field of microbiology has experienced a revival of cultural methods, giving rise to the concept of « culturomics ». This innovative strategy leverages high-throughput culture methods to analyze microbial compositions. Culturomics involves the development of specific liquid and/or solid culture media that are adjusted to support the growth of particular microorganisms, alongside selective and/or enrichment conditions based on variable temperatures, and times of incubation. This is further enhanced by the integration of MALDI-TOF MS and 16S rDNA identification techniques, allowing for a comprehensive analysis that includes the detection of minority populations and the discovery of new species. Moreover, culturomics has successfully isolated microorganisms that were previously uncultivable, demonstrating its effectiveness.

This approach has revolutionized the understanding of microbial communities in various applications across various biological domains (Martellacci et al. 2019; Lagier et al. 2015; 2018; Greub 2012; Sarhan et al. 2019). To minimize manual work when creating microbial collections from biological samples, Huang et al. (2023) have recently developed a high-throughput cultivation approach, 'culturomics' using machine learning and robotics. The approach they developed is based on robotic automation system and exploits colony morphology and genomic data to maximize the diversity of isolated microbes and enable targeted selection of specific genera (Selma-Royo et al. 2023; Huang et al. 2023). These methods would make it possible to study the biodiversity of milks and cheeses, while building up more complete collections of strains. Culturomic techniques could therefore become a first step in the development of autochthonous starter cultures by studying and cultivating milks or cheeses microbiota representative of the diversity.

4. Isolates characterization

A step-by-step procedure is generally used to evaluate autochthonous isolates. It can be divided into different phases: (1) selection of the most promising strains through a characterization at laboratory-scale; (2) Genetic characterization, (3) Safety assessment. A specific characterization of each strain must be carried out to select strains with the expected technological characteristics (Table 1).

Technological characterization

The first step of the strains technological characterization is mostly based on their resistance ability to the stress conditions that cheese-manufacturing process imposes.

Consequently, strains could be screened for their ability to grow at different temperatures, different pH, and with respect to their salt tolerance (A. Pavunc et al. 2012; Araújo-Rodrigues et al. 2021; Speranza et al. 2015; Terzić-Vidojević et al. 2015).

The second step is the functional characterization of the strains. The choice of technological criteria to be studied depends on the needs for specific cheese varieties. The primary function of a starter being the acidification of milk, pH monitoring and/or lactic acid measurement are then systematically carried out (Frau et al. 2016; Terzić-Vidojević et al. 2015; Turchi et al. 2011; Rasovic et al. 2017; Aquilanti et al. 2007; Alonso-Calleja et al. 2002). The proteolytic activity of strains was also investigated by many authors, as these activities are of major importance in cheese production for its impact on the texture and flavors of cheeses (Câmara et al. 2019; Psoni et al. 2007; Frau et al. 2016; Araújo-Rodrigues et al. 2021; Veljovic et al. 2007). The criteria could also include lipolytic activity, an important feature of LAB for the development of flavors in cheeses (Araújo-Rodrigues et al. 2021; Nicosia et al. 2023; Hulak et al. 2016). Diacetyl-acetoin production from milk citrate is also an important feature for a potential starter culture, since this compound contributes to the aroma of many dairy products. This characteristic has been sought for the development of autochthonous strains adapted to several cheeses (Câmara et al. 2019; Frau et al. 2016; Terzić-Vidojević et al. 2015; Couderc et al. 2022). Exopolysaccharide production is considered as an important feature upon selection of LAB as starter cultures for certain dairy products (Frau et al. 2016; Câmara et al. 2019; Rasovic et al. 2017). Enzyme activities, especially peptidases activities, could be responsible for secondary proteolysis and catabolism of free amino acids, which mainly

affect the acceleration of cheese ripening and may improve cheese flavors. Consequently, these enzyme activities of strains are screened for certain type of cheeses (De Pasquale et al. 2019; Câmara et al. 2019; Nicosia et al. 2023; Abarquero et al. 2022; Leticia Psoni et al. 2015). Volatile compounds production by strains could be examined (Picon et al. 2019), and olfactory and sensory evaluation of fermented milks are sometimes investigated (Câmara et al. 2019). Some studies also focused on antimicrobial activities against pathogens (Assari et al. 2023). Moreover, phage infection of starters is the most common cause of incomplete fermentation in the dairy industry. Therefore, phage sensitivity could be determined in autochthonous strains (Tidona et al. 2020), and the induction of potential intact prophages could be examined to avoid cross-inhibition in assembled consortia (Couderc et al. 2022). The list of technological criteria established in this review is not exhaustive. The criteria to be studied mainly depend on the cheese requirements.

Genetic characterization

Genetic characterization of strains offers a valuable complement to technological characterization, enhancing the understanding of the unique features and capabilities of each strain, and giving a global view of the metabolic potential – to be confirmed or not by *in vivo* experiments. By integrating genetic data with technological profiles, a more comprehensive view of the strains potential applications can be achieved. Furthermore, this approach opens up possibilities for evaluating the typicity of strains, allowing the selection of local strain related to the production area. Couderc et al. (2022) performed pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis on wild strains and identified one lineage that consisted exclusively of Rocamadour

strains. They also performed comparative genomic analysis and identified genes involved in the transport and metabolism of lactose and caseins (*lacE* and *prtP*, respectively), and a genes cluster involved in exopolysaccharides biosynthesis. Domingos-Lopes et al. (2017) also performed a PFGE analysis to identify species from Pico cheese at strain level and reported a high degree of variability within the *Lactobacillus* genus and the presence of different biotypes within the same species. Grizon et al. (2023) studied the genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains for their potential use as starter cultures using whole-genome analysis and identified five groups based on the pan-genome analysis that could be differentiated from their accessory genes implicated in different functional pathways of interest for cheese manufacturing. In another study, Grizon et al. (2024) identified wild *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* strains from the Saint-Nectaire PDO cheese with strong typicity.

Safety assessment

The important use of LAB in cheese production has led to concerns about their safety. The safe integration of LAB in cheese production has to be evaluated to avoid potential risks associated with their use. The safety criteria are generally the presence of transferable antibiotic resistance genes, virulence factors, and plasmids (Peng et al. 2023).

Primarily, antibiotic resistance is a growing global issue, as the food chain is one of the main routes of transmission of such genes, with a direct link between ingested LAB and the human gastrointestinal tract (Levy, 1997). The search for antibiotic resistance genes in the genomes of potential starter strains has to be investigated, and phenotypic resistance tests must be carried out to select safe strains. Another aspect of

concern is the presence of virulence factors in LAB, which can initiate infections and lead to diseases. In the context of LAB used in food, it is important to ensure that these bacteria do not carry harmful virulence factors that could pose a health risk. The presence of mobile genetic elements in genomes of bacteria play a crucial role in facilitating horizontal gene transfer (HGT) between strains genomes (Landete, 2017). Consequently, the presence of such elements, along with the nearby virulence or resistance genes have emerged as significant indicators in assessing safety (EFSA, 2021).

These safety issues have been reported in some studies of characterized strains for potential use as starter cultures (Flórez et al. 2023; Čanžek et al. 2005; Hu et al. 2020; A. L. Pavunc et al. 2013; Altin et al. 2023; Alvarado Rivas et al. 2007; Ruppitsch et al. 2021).

5. Strains selection and assembly

The process of choosing strains for their assembly primarily focuses on desired technological traits that were previously investigated. It is essential to create consortia comprising multiple strains that collectively possess all necessary attributes for cheese production. Additionally, assessing the compatibility of these strains before implementation in a cheese-making facility is crucial, as adverse interactions can arise and lead to growth issues (Harboe et al. 2010). Another criteria of assembly is the strains genetic and phenotypic diversity within a consortium, and a rotation strategy to mitigate the risk of phage attacks, thereby maintaining the stability and efficacy of these cultures all along the fermentation processes (Moineau 1999).

In the production of Rocamadour cheese, out of 24 *Lactococcus lactis* isolated strains, 20 were chosen based on their technological properties.

These were further evaluated for pairwise compatibility, resulting in 22 three-strain combinations, 10 four-strain combinations, and 2 five-strain combinations. Among these, two combinations (A: EIP07A-EIP13J-EIP20B and B: EIP07A-EIP13D-EIP20B) satisfied three key selection criteria. The first criterion was the mutual compatibility of the strains. The second one involved the presence of the lactose transport gene *lacE* in all strains, along with the protease encoding *prtP* gene in at least one strain, or the capability to produce diacetyl/acetoin. The third criterion focused on selecting strains from diverse origins to maximize genetic diversity. From these two associations, they selected the consortium B for its evaluation in cheesemaking process (Couderc et al. 2022). In a study conducted by De Pasquale et al. (2019), 77 strains of LAB were isolated from Pecorino Crotonese cheese. These strains were characterized based on their enzymatic activities responsible for secondary proteolysis and catabolism of free amino acids. Among the seven strains that showed the highest aminopeptidase N, glutamate dehydrogenase and/or cystathionine lyase activities, five (3 *Lb. casei*, 1 *Lb. plantarum* and 1 *Ln. mesenteroides*) were selected to design two starters that were evaluated in cheese production. An ASC development was undertaken for Crescenza cheese production by evaluating *Streptococcus thermophilus* strains on their phage sensitivity, acidification properties, temperature resistance, salt tolerance, proteolytic and urease activities, thickening properties and the cross-inhibition between strains (Tidona et al. 2020). Authors developed a system of ranking of strains based on a score attributed for each parameter studied. The strains with the highest total score (addition of all scores attributed) were chosen as candidates to be included in two-strain (binary)

starter cultures for Crescenza cheese. Accordingly, four binary cultures including six (PL3574, PL9138, PL4176, PL7936, PL1290, PL9427) out of the eight top-scored strains were designed and used in rotation for cheese production (Tidona et al. 2020). A similar procedure was used in a study conducted by Abarquero et al. (2022).

Overall, the actual methods for the selection and assembly of strains remained empirical, and consisted of simple communities of only some strains. Strains were selected according to their technological characteristics, without considering interactions between strains. Use of a bottom-up approach of ecological engineering principles might be a valuable solution to assemble more complex synthetic microbiomes with better resilience and stability (de Vos 2011; Rodríguez et al. 2019). This method leverages the latest developments in multi-omics technologies, which facilitate predictions about managing metabolic networks to cultivate microbiomes with specific and desired functions. For initiating bottom-up design, core metabolic models that capture central carbon and energy metabolism can be reconstructed from genome annotations and known physiological information. Several tools were developed to reconstruct metabolic networks from genomes in order to get the added value of potential metabolic cooperation in complex microbiota over individual strain or simple ecosystems (Lawson et al. 2019; Rodríguez Amor et al. 2019; Zorrilla et al. 2021). Such tools allow the identification of critical species for metabolic cooperation that significantly contribute to the microbiome community for relevant functions (Belcour et al. 2020; 2019). Thus, an approach in this direction could be used to identify the key microorganisms of a milk or cheese sample to constitute complex ASCs consisting of multiple species and multiple

strains.

6. Impacts of ASCs on cheeses

The final and perhaps most critical step in the characterization of ASCs involves their practical application and evaluation in actual cheese-making processes. This crucial phase assesses the impacts of these specially selected and cultured microorganisms on various aspects of the cheese, including its chemical-physical composition, microbiological quality, and sensory attributes. It is at this stage that the theoretical and laboratory-based findings about ASCs are translated into tangible results, providing a comprehensive understanding of how these cultures influence the overall quality and characteristics of the cheese. These ASCs, being specifically characterized and tailored for particular cheese varieties, often exhibit superior attributes compared to cheeses produced with CSCs or through natural fermentation processes. This distinction stems from the compatibility of ASCs with the specific cheese environment for which they are selected, leading to a range of beneficial effects. Incorporating these ASCs into cheese production can lead to several significant improvements. Firstly, they could contribute to a reduction in the presence of spoilage microflora, thereby enhancing the microbiological safety and shelf life of the cheese. ASCs could also offer better control over the acidification process during cheese making. Moreover, ASCs could develop more desirable typical flavors and aromas in the cheese. Given that flavor and aroma profiles are defining characteristics of any cheese variety, the role of ASCs in augmenting these sensory attributes cannot be overstated.

Table 1 Technological, safety and genetic characterization of wild LAB strains for the development of ASCs; ¹Number in brackets refers to the number of strains for each species

Cheese variety	Isolation source	Species identified ¹	Characterization criteria	Main results	References
Unspecified	Collection from University of Leon (TAUL: Tecnología de los Alimentos Universidad de Leon)	<i>Lc. lactis</i> (9), <i>Ln. citreum</i> (3), <i>Ln. mesenteroides</i> (2), <i>Ln. pseudomesenteroides</i> (1), <i>Lb. brevis</i> (7), <i>Lb. plantarum spp. plantarum</i> (32), <i>Lb. paraplantarum</i> (7), <i>Lb. paracasei</i> (5)	Acidifying activity, Proteolytic activity, aminopeptidase, dipeptidase, carboxypeptidase activities, esterolytic activity	<i>Lc. lactis</i> showed high acidifying and proteolytic activities; <i>Lb. paracasei</i> showed high aminopeptidases activities; <i>Lb. plantarum</i> showed high dipeptidase activities	(Abarquero et al. 2022)
Pico	Cheeses samples from 3 dairies at 2 manufacturing stages	<i>E. casseliflavus</i> (1), <i>E. faecalis</i> (27), <i>Lb. casei</i> (5), <i>Lb. otakiensis</i> (1), <i>Lb. paracasei</i> (1), <i>Lc. lactis spp. lactis</i> (1), <i>Ln. pseudomesenteroides</i> (1)	Acidifying activity, Growth characteristics, caseinolytic and lipolytic activities, diacetyl production, enzymatic profile, exopolysaccharides production, autolytic activity, antimicrobial activity, sensory evaluation	7 strains showed high acidifying activities; 8 showed high caseinolytic activities; None showed lipolytic activities or EPS production; 17 produced medium or high amounts of diacetyl; 11 showed high esterase, aminopeptidase and phosphatase activities; 8 showed high autolytic activities; 9 presented good curd consistency and low formation of whey; 14 displayed high antimicrobial activities	(Câmara et al. 2019)
Canestrato Pugliese	Cheeses from different dairies	<i>Lb. plantarum</i> (11), <i>Lb. brevis</i> (15), <i>Lc. cremoris</i> (5), <i>Lb. casei</i> (2)	Acidifying, peptidase, autolytic and protease activities	3 strains showed high acidifying activities; 2 showed high proteolytic activities; 1 showed high autolytic activities; 3 showed high peptidases activities.	(Aquilanti et al. 2007)
Serpa	Cheeses from 5 dairies	<i>Lb. paracasei</i> (1), <i>Lb. casei</i> (1), <i>Lb. plantarum</i> (5), <i>Lb. crustorum</i> (1), <i>Lb. pentosus</i> (1), <i>Lb. brevis</i> (2)	Lipolytic, proteolytic, antimicrobial and acidifying activities, resistance to temperature and salt, production of D- and L- lactate	6 strains showed high acidification potential, low D-lactic acid production, high salt and temperature resistance; 4 showed proteolytic and lipolytic activities; 1 showed antimicrobial activity against 3 pathogens; 1 showed antimicrobial inhibition against <i>S. aureus</i> .	(Araújo-Rodrigues et al. 2021)
Batzos	Cheeses from 3 differents periods	40 <i>Lc. lactis spp. lactis</i>	RAPD-PCR, plasmid profiling and PFGE; Acidification and proteolytic activities	High genetic heterogeneity: 4 clusters formed (28, 9, 2 and 1 isolates) - 24 genotypes discriminated; 8 isolates without plasmids, 9 isolates with unique profile patterns, 23 isolates distributed in 6 groups for their plasmids profiles; Grouping of strains according to the season of cheese production. High phenotypic activities: 42.5% showed high acidifying activities; 75% showed peptidases activities; 90% showed high proteolytic activities.	(Psoni et al. 2007)
Unspecified	Collection	<i>Lc. lactis spp. lactis</i> (6), <i>Ln. mesenteroides spp. dextranicum</i> (1), <i>Lb. paraplantarum</i> (3), <i>Lb. plantarum spp. plantarum</i> (11), <i>Lb. brevis</i> (1), <i>Lb. paracasei</i> (1)	Enzymatic activities (API-ZYM, Glutamate dehydrogenase assay), antimicrobial activity, antibiotic susceptibility; tyramine, histamine, putrescine and GABA production	<i>Lb. plantarum</i> showed high values of proteolytic activities; <i>Lc. lactis</i> showed high lipolytic activities; 2 strains showed high GDH activity values; 1 strain showed high antimicrobial activity against <i>E. faecalis</i> ; 4 produced high GABA concentrations; 3 produced biogenic amines	(Abarquero et al. 2023)
Rocamadour	Milks from 25 farms	24 <i>Lc. lactis</i>	MLST typing, acidifying and proteolytic activities, acetoin production, prophage induction	4 MLST lineages were identified including 1 with only Rocamadour strains, 12 strains showed high acidifying and proteolytic activities; 21 produced diacetyl/acetoin; 4 released prophages;	(Couderc et al. 2022)

Table 2 provides an overview of the impacts of ASCs in different cheese productions. The use of ASCs in cheese production could alter the microbial population profile, enhancing the diversity and activity of beneficial bacteria. Silveti et al. (2017) studied the influence of a ASC on the microbial population dynamics throughout the ripening of PDO Silter cheese. They reported a reduced amount of undesirable bacteria in curd and unclassified bacteria during cheese ripening, without interfering with the typical indigenous NSLAB. ASC developed for a Columbian double-cream cheese presented a significant lower value in total coliforms than the control cheese after 24 days of storage (Diaz-Morales et al. 2023). Authors suggested that starter culture could inhibit total coliforms.

The incorporation of ASCs in cheese-making not only influences the microbial population but also markedly impacts the chemical-physical characteristics of the cheeses, such as pH, proteolysis, amino acids and fatty acids composition. The research conducted by Mangia et al. (2013) evaluated the effects of a specific ASC on the production of Pecorino Sardo Dolce, a traditional Italian PDO cheese. This starter

comprised strains of *S. thermophilus*, *Lc. lactis spp. lactis*, *Lb. plantarum*, and *Lb. casei*, and its performance was compared against a CSC. Findings revealed that cheeses produced with the experimental ASC exhibited notable enhancements. ASC elevated levels of free amino acids and free fatty acids. In a study on Pecorino Siciliano cheese production, an ASC consisting of *Lc. lactis spp. lactis*, *Lc. gaervieae*, *E. faecalis*, and *St. macedonicus* was tested against a control cheese made without added bacteria. The cheeses produced with the experimental starter demonstrated a faster pH drop (Guarcello et al. 2016).

Cheeses made from indigenous starters tend to have better ratings than control cheeses. Mostly, these ASCs incorporate NSLAB in their composition, a key element in the development of texture and aromas of cheeses (Gobbetti et al. 2015). In addition, the strains used in these ASCs are often rigorously selected and tested, based on specific technological criteria, to optimize the sensory qualities of the cheese variety considered. In a study conducted by González et al. (2012), higher sensorial scores for different attributes were reported for cheese manufactured with ASCs composed of one SLAB strain *Lc. lactis spp. lactis*, and two NSLAB strains *Lb. plantarum*, *Ln. mesenteroides*, in comparison with cheese produced with CSC composed of *Lc. lactis spp. lactis*, *Lc. cremoris* and *Streptococcus thermophilus*. In a study on Pecorino Siciliano cheese production, an ASC consisting of *Lc. lactis spp. lactis*, *Lc. gaervieae*, *E. faecalis*, and *St. macedonicus* strains was tested against a control cheese made without added bacteria. These cheeses exhibited enhanced sensory characteristics compared to the control cheese. Notable improvements were observed in color intensity, reduced eye formation (holes in the cheese), greater uniformity in texture, and a decrease in unpleasant flavors in the final product (Guarcello et al. 2016). The strains constituting this ASC were previously characterized and selected for their technological performance (Settanni et al. 2013). Improved sensory attributes typical of Pecorino Sardo Dolce cheese made with ASC (*S. thermophilus*, *Lc. lactis spp. lactis*, *Lb. plantarum*, and *Lb. casei*) were reached compared to a CSC (*S. thermophilus*, *L. lactis spp. lactis*, *L. cremoris*; Mangia et al. 2013). Particularly, cheeses made with the ASC scored higher for taste, and after-taste. The two NSLAB *Lb. plantarum*, and *Lb. casei* were previously selected for their high proteolytic activities (Mangia et al. 2008). Additionally, Castellano cheeses exhibited improved sensory

attributes when manufactured with SLAB and NSLAB ASC selected for their enzymatic activities (*Lc. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* and *Ln. mesenteroides*) compared to a CSC (*Lc. lactis* spp. *lactis* and *Lc. cremoris*; Abarquero et al., 2003 Abarquero et al. 2022).

Interactions between the strains constituting the ASCs and their impacts in cheese production could be studied using an integrative approach based on methods combining Omics techniques. Such approaches were developed and often used to study the role of microbial interactions in cheese flavor (Jiang et al. 2022; Anastasiou et al. 2022; Afshari et al. 2020). Recently, Melkonian et al. (2023) studied the microbial interaction within a starter culture and their role in cheddar cheese-making process through a strain dropout strategy combined with genomics, genome-scale metabolic modeling, metatranscriptomics and metabolomics techniques. Using this method, they highlighted a beneficial effect of *Streptococcus thermophilus* on the growth of *Lactococcus* by relieving nitrogen limitation for *Lactococcus* and boosting de novo nucleotide biosynthesis. They also reported that bacterial interactions strongly influenced the cheese flavor compounds using targeted metabolomics. These results underline the importance of omics methods to study complex interactions within microbial consortia. Metatranscriptomics allows the identification of active metabolic pathways and the evaluation of microbial community responses to different conditions, providing information on how microbial interactions shape the cheese maturation process. Similarly, metabolomics offers a complete profile of metabolites, thus directly linking microbial activity to the aromatic compounds of cheeses. By integrating these methods, researchers can better understand the microbial ecology of lactic starters and their impact in cheese production, in order to optimize the development of complexes ASCs in

line with the requirements for the fermentation processes adapted to each cheese variety.

7. Conclusion

This review took an in-depth look at the key stages in the development of indigenous starters for cheese production, highlighting the importance of each phase in the creation of unique, high-quality cheeses. It is crucial to recognize that these processes, while beneficial, are time-consuming, costly and require a high level of scientific knowledge and know-how, making them difficult to implement for all cheese producers. Current methods for developing ASCs, though effective, rely on empirical microbiological techniques that are time-consuming and could benefit from modern advancements in microbiology. By harnessing recent progress in both microbiology and technology, there is a considerable opportunity to enhance the development of ASCs in the “omics” era. Culturomics can be employed to investigate the microbial communities present in raw milks and cheeses and constitute a rich collection, offering a comprehensive representation of their diversity. Genomics could allow the prediction of metabolic functions of interest and the identification of crucial species within a microbiome for assembly. Moreover, metatranscriptomics and metabolomics could be used for the examination of interactions between ASCs components and their influence during cheese production.

However, the use of autochthonous starter offers a significant additional advantage in terms of promoting food sovereignty. By favoring indigenous strains and developing local production techniques, this approach helps reduce dependence on external inputs and technologies controlled by large corporations. It enables cheese producers to develop distinctive products that reflect their

terroir and culture, thereby strengthening regional food identity and autonomy.

A major issue for cheese production today is the urgent need to isolate and build up collections of the microorganisms present in raw milk and cheese in the context of climate change. Climate change is a critical issue currently facing our planet. It is attributed to human activity, which is altering the composition of the global atmosphere, leading to an increase in the average seasonal temperature and a rise in precipitation during the winter or the wet season (Feliciano et al. 2020). Numerous studies have demonstrated the impact of seasons and climate on the microbial ecology and diversity found in raw milk (Marchand et al. 2009). The microbial communities of raw milks are likely to be impacted by climatic variables caused by changes in temperature, relative humidity, rainfall, etc. associated with climate change (Feliciano et al. 2020; Miraglia et al. 2009; van der Spiegel et al. 2012). The seasonal microbial composition of raw milk is linked to the weather conditions that influence microbial ecology, but the microbial groups that will be favorably influenced by climate change are not yet known (Feliciano et al. 2020). Isolating current microbial strains would make it

possible to preserve a snapshot of this biodiversity before an irretrievably transformation or lost. Moreover, identifying the most resilient strains facing the climatic changes conditions, it would be possible to develop starter cultures adapted to future challenges, guaranteeing the continuity of quality cheese production. The urgency of climate change underlines the importance of this approach, not only for the conservation of microbial biodiversity, but also for sustainability in the agri-food sector. The ability to anticipate and adapt to these changes through the development of resilient microorganisms will be decisive for the future of cheese production.

In conclusion, the development of local starter cultures for cheese production is a promising area that not only offers improved cheese quality and diversity, but also contributes to food sovereignty. The challenges associated with these methods, notably their cost and complexity, call for greater support in terms of research, development, funding and training. This would enable a greater number of producers to benefit from these techniques, thus promoting sustainable, diversified cheese production rooted in local communities and cultures.

Table 2 Impact of selected strains on cheese production

Cheese variety	Strains tested	Impact in cheese production	Reference
Tenerife goats milk cheese	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> TF53, <i>Lb. plantarum</i> TF191, <i>Ln. mesenteroides</i> TF756	Enhances the sensory features (especially aroma)	(Gonzalez and Zárate 2012)
Fresh cheese	<i>Lc. lactis</i> ZGBP5-9, <i>Lb. plantarum</i> ZGPR2-25, <i>Ec. faecium</i> ZGPR1-54	Improves odor and taste	(Terzić-Vidojević et al. 2015)
White pickled cheese	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGAL1-4, <i>Lb. plantarum</i> BGG07-29, <i>Lb. brevis</i> BGG07-28	Preserves the traditional taste and aroma	(Terzić-Vidojević et al. 2015)
Caciotta della Garfagnana cheese	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Lc45, <i>Lb. rhamnosus</i> Lb91, <i>Lb. paracasei</i> Lb101	Preserves typical texture, flavour and taste of cheeses	(Turchi et al. 2011)
Ibores	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCBA 201, <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCBA 208, <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCBA 311, <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCBA 334	Improves the microbiological quality; Preserves the typical properties	(Gonzalez et al. 2003)
Silter Cheese	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ST87, <i>Ln. pseudomesenteroides</i> ST23, <i>Ln. mesenteroides</i> ST32, <i>S. thermophilus</i> ST56, <i>S. thermophilus</i> ST182	Reduces the level of undesirable bacteria in curd ; Conserves the level of indigenous NSLAB.	(Silveti et al. 2017)
Castellano cheese	<i>Lc. lactis</i> GE44, <i>Lb. plantarum</i> TAUL67, <i>Lb. paracasei</i> TAUL1752, <i>Ln. mesenteroides</i> TAUL1342	Improves the sensory characteristics; Produces lower pH	(Abarquero et al., 2003)
Caciotta della Garfagnana cheese	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Lc45, <i>Lb. rhamnosus</i> Lb91, <i>Lb. paracasei</i> Lb101	Improves the quality and traditional characteristics; Enhances texture, flavour and taste (agreeable and typical).	(Turchi et al. 2011)
Ibores	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> CCBA 201, CCBA 208, CCBA 311, CCBA 334	improves microbiological quality; Conserves the typical properties	(Gonzalez et al. 2003)
Silter Cheese	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ST87, <i>Ln. pseudomesenteroides</i> ST23, <i>Ln. mesenteroides</i> ST32, <i>S. thermophilus</i> ST56 and ST182	Conserves cheese typicality; Reduces undesirable bacteria in curd and unclassified bacteria during cheese ripening; Maintains the LAB cheese microbiota.	(Silveti et al. 2017)

PGI cheese	Castellano	<i>Lc. lactis</i> GE44, <i>Lb. plantarum</i> TAUL67, <i>Lb. paracasei</i> TAUL1752, <i>Ln. mesenteroides</i> TAUL1342	Improves the sensory characteristics	(Abarquero et al., 2003)
white-brined cheese		<i>Lc. lactis</i> spp. <i>lactis</i> NCCB100539	Leads to a more extensive proteolysis. Highest sensory scores; Improves the microbial cheese quality	(Altin et al. 2023)
high-moisture traditional Mozzarella cheese		<i>Lb. plantarum</i> 18A, <i>Lb. helveticus</i> 2B, <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> 20F, <i>S. thermophilus</i> 22C,	Improves the texture and sensory properties; Highest reproducible quality of cheeses	(De Angelis et al. 2008)
traditional Mountain cheese		<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 68, <i>S. thermophilus</i> 93, <i>Lb. rhamnosus</i> BT68	Accelerates the fermentation process, reduces the Enterobacteriaceae level, Improves the overall acceptability of the product; Maintains the microbial diversity stable at the end of ripening.	(Carafa et al. 2019)
Argentinean cheeses	goat	<i>Lb. rhamnosus</i> UNSE308, <i>Lb. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> UNSE309 <i>S. thermophilus</i> UNSE314 and UNSE321 <i>Lb. plantarum</i> UNSE316, UNSE317 and UNSE317, <i>P. pentosaceus</i> UNSE253	Improves the conjugated fatty acid content and sensory characteristics	(Taboada et al. 2015)

References

- Abarquero**, D.; Bodelón, R.; Flórez, A.B.; Fresno, J.M.; Renes, E.; Mayo, B.; Tornadijo, M.E.; Abarquero, D.; Bodelón, R.; Flórez, A.B.; et al. Technological and Safety Assessment of Selected Lactic Acid Bacteria for Cheese Starter Cultures Design: Enzymatic and Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and Biogenic Amine Production. *LWT* **2023**, *180*, doi:10.1016/J.LWT.2023.114709.
- Abarquero**, D.; Bodelón, R.; Manso, C.; Rivero, P.; JM, F.; Tornadijo, M. Effect of Autochthonous Starter and Non-starter Cultures on the Physicochemical, Microbiological and Sensorial Characteristics of Castellano Cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2023**, *77*, 234–245, doi:10.1111/1471-0307.13007.
- Abarquero**, D.; Renes, E.; Combarros-Fuertes, P.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. Evaluation of Technological Properties and Selection of Wild Lactic Acid Bacteria for Starter Culture Development. *LWT* **2022**, *171*, 114121, doi:10.1016/j.lwt.2022.114121.
- Afshari**, R.; Pillidge, C.J.; Dias, D.A.; Osborn, A.M.; Gill, H. Cheesomics: The Future Pathway to Understanding Cheese Flavour and Quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 33–47, doi:10.1080/10408398.2018.1512471.
- Al-kotami**, S.; abou ghorrah, S.; Yazji, S. Detection and Isolation of Lactic Acid Bacteria and Its Use as Local Starters in Syrian Akawi Cheese Processing. *Int. Food Res. J.* **2015**, *22*, 1699–1704.
- Alonso-Calleja**, C.; Carballo, J.; Capita, R.; Bernardo, A.; García-López, M.L. Comparison of the Acidifying Activity of *Lactococcus lactis subsp. lactis* Strains Isolated from Goat's Milk and Valdeteja Cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **2002**, *34*, 134–138, doi:10.1046/j.1472-765x.2002.01061.x.
- Altin**, C.; Kabwanga, T.; Kiran, F.; Budak, S. Evaluation of Autochthonous *Lactococcus lactis subsp. lactis* Strain as a Candidate Starter Culture in White-Brined Cheese. *Food Sci. Biotechnol.* **2023**, *33*, doi:10.1007/s10068-023-01332-y.
- Alvarado Rivas**, C.; Chacón Rueda, Z.; Otoniel Rojas, J.; Guerrero Cárdenas, B.; López Corcuera, G. Isolation, Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Venezuelan Artisanal Andino Smoked Cheese. Their Use as Starter. *Rev. Científica* **2007**, *17*, 301–308.
- Anastasiou**, R.; Kazou, M.; Georgalaki, M.; Aktypis, A.; Zoumpopoulou, G.; Tsakalidou, E. Omics Approaches to Assess Flavor Development in Cheese. *Foods* **2022**, *11*, 188, doi:10.3390/foods11020188.
- Aquilanti**, L.; Zannini, E.; Zocchetti, A.; Osimani, A.; Clementi, F. Polyphasic Characterization of Indigenous Lactobacilli and Lactococci from PDO Canestrato Pugliese Cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* **2007**, *40*, 1146–1155, doi:10.1016/j.lwt.2006.09.001.
- Araújo-Rodrigues**, H.; dos Santos, M.T.P.G.; Ruiz-Moyano, S.; Tavaría, F.K.; Martins, A.P.L.; Alvarenga, N.; Pintado, M.E. Technological and Protective Performance of LAB Isolated from Serpa PDO Cheese: Towards Selection and Development of an Autochthonous Starter Culture. *LWT* **2021**, *150*, 112079, doi:10.1016/j.lwt.2021.112079.
- Araújo-Rodrigues**, H.; Martins, A.P.L.; Tavaría, F.K.; Dias, J.; Santos, M.T.; Alvarenga, N.; Pintado, M.E. Impact of LAB from Serpa PDO Cheese in Cheese Models: Towards the Development of an Autochthonous Starter Culture. *Foods* **2023**, *12*, 701, doi:10.3390/foods12040701.
- Araújo-Rodrigues**, H.; Tavaría, F.K.; dos Santos, M.T.P.G.; Alvarenga, N.; Pintado, M.M. A Review on Microbiological and Technological Aspects of Serpa PDO Cheese: An Ovine Raw Milk Cheese. *Int. Dairy J.* **2020**, *100*, 104561, doi:10.1016/j.idairyj.2019.104561.
- Assari**, F.; Mojgani, N.; Sanjabi, M.R.; Mirdamadi, S.; Jahandar, H. Technological Assessment of Autochthonous Lactic Acid Bacteria and Their Antibacterial Activities Against Food Borne Pathogens in Goat Milk Lactic Cheese: LAB as Biopreservative in Dairy Products. *Appl. Food Biotechnol.* **2023**, *10*, 61–71, doi:10.22037/afb.v10i1.40001.
- Awad**, S.; Ahmed, N.; Soda, M.E. Evaluation of Isolated Starter Lactic Acid Bacteria in Ras Cheese Ripening and Flavour Development. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1192–1199, doi:10.1016/j.foodchem.2007.01.043.
- Belcour**, A.; Frioux, C.; Aite, M.; Bretaudeau, A.; Hildebrand, F.; Siegel, A. Metage2Metabo, Microbiota-Scale Metabolic Complementarity for the Identification of Key Species. *eLife* **2020**, *9*, e61968, doi:10.7554/eLife.61968.
- Belcour**, A.; Frioux, C.; Aite, M.; Bretaudeau, A.; Siegel, A. Metage2Metabo: Metabolic Complementarity

- Applied to Genomes of Large-Scale Microbiotas for the Identification of Keystone Species **2019**, 803056.
- Bojanic**, M.; Rasovic, M.; Mayrhofer, S.; Martinovic, A.; Dürr, K.; Domig, K.J. Lactococci of Local Origin as Potential Starter Cultures for Traditional Montenegrin Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* **2017**, *55*, 55–66, doi:10.17113/ftb.55.01.17.4854.
- Bulut**, C.; Gunes, H.; Okuklu, B.; Harsa, S.; Kilic, S.; Coban, H.S.; Yenidunya, A.F. Homofermentative Lactic Acid Bacteria of a Traditional Cheese, Comlek Peyniri from Cappadocia Region. *J. Dairy Res.* **2005**, *72*, 19–24, doi:10.1017/s0022029904000536.
- Câmara**, S.P.; Dapkevicius, A.; Riquelme, C.; Elias, R.B.; Silva, C.; Malcata, F.X.; Dapkevicius, M. Potential of Lactic Acid Bacteria from Pico Cheese for Starter Culture Development. *Food Sci. Technol. Int. Cienc. Tecnol. Los Aliment. Int.* **2019**, *25*, 303–317, doi:10.1177/1082013218823129.
- Canzek Majhenic**, A.; Rogelj, I.; Perko, B. Enterococci from Tolminc Cheese: Population Structure, Antibiotic Susceptibility and Incidence of Virulence Determinants. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *102*, 239–244, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.021.
- Carafa**, I.; Clementi, F.; Tuohy, K.; Franciosi, E. Microbial Evolution of Traditional Mountain Cheese and Characterization of Early Fermentation Cocci for Selection of Autochthonous Dairy Starter Strains. *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 94–103, doi:10.1016/j.fm.2015.09.001.
- Carafa**, I.; Stocco, G.; Franceschi, P.; Summer, A.; Tuohy, K.M.; Bittante, G.; Franciosi, E. Evaluation of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter and Non-Starter Cultures for the Production of Traditional Mountain Cheese. *Food Res. Int. Ott. Ont* **2019**, *115*, 209–218, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.069.
- Cardoso**, V.M.; Dias, R.S.; Soares, B.M.; Clementino, L.A.; Araújo, C.P.; Rosa, C.A. The Influence of Ripening Period Length and Season on the Microbiological Parameters of a Traditional Brazilian Cheese. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* **2013**, *44*, 743–749, doi:10.1590/S1517-83822013005000059.
- Couderc**, C.; Laroute, V.; Coddeville, M.; Caillaud, M.-A.; Jard, G.; Raynaud, C.; Coccagn-Bousquet, M.; Tormo, H.; Daveran-Mingot, M.-L. Harnessing Diversity of *Lactococcus lactis* from Raw Goat Milk: Design of an Indigenous Starter for the Production of Rocamadour, a French PDO Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *379*, 109837, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109837.
- de Aguiar e Câmara**, S.P.; Maduro Dias, C.; Rocha, L.; Dapkevicius, A.; Duarte Rosa, H.J.; de Borba, A.E.S.; Silveira, M. da G.; Malcata, F.X.; de Lurdes Enes Dapkevicius, M. Assessment of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Improved Manufacture of Pico Cheese Using a Cheese Model. *Int. Dairy J.* **2022**, *128*, 105294, doi:10.1016/j.idairyj.2021.105294.
- De Angelis**, M.; de Candia, S.; Calasso, M.P.; Faccia, M.; Guinee, T.P.; Simonetti, M.C.; Gobbetti, M. Selection and Use of Autochthonous Multiple Strain Cultures for the Manufacture of High-Moisture Traditional Mozzarella Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *125*, 123–132, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.043.
- de Candia**, S.; De Angelis, M.; Dunlea, E.; Minervini, F.; McSweeney, P.L.H.; Faccia, M.; Gobbetti, M. Molecular Identification and Typing of Natural Whey Starter Cultures and Microbiological and Compositional Properties of Related Traditional Mozzarella Cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 182–191, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.062.
- De Pasquale**, I.; Di Cagno, R.; Buchin, S.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Use of Autochthonous Mesophilic Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Making Pecorino Crotonese Cheese: Effect on Compositional, Microbiological and Biochemical Attributes. *Food Res. Int.* **2019**, *116*, 1344–1356, doi:10.1016/j.foodres.2018.10.024.
- Diaz-Morales**, L.J.; Sepúlveda-Valencia, J.U.; Valdés-Duque, B.E.; Osorio-Tobón, J.F.; Durango-Zuleta, M.M. Effect of the Autochthonous Starter Culture on Physicochemical, Microbiological, and Sensory Characteristics of Traditional Colombian Double-Cream Cheese: A Kinetic Approach. *LWT* **2023**, *185*, 115163, doi:10.1016/j.lwt.2023.115163.
- Dolci**, P.; Ferrocino, I.; Giordano, M.; Pramotton, R.; Verneti-Prot, L.; Zenato, S.; Barmaz, A. Impact of *Lactococcus Lactis* as Starter Culture on Microbiota and Metabolome Profile of an Italian Raw Milk Cheese. *Int. Dairy J.* **2020**, *110*, 104804, doi:10.1016/j.idairyj.2020.104804.

- Domingos-Lopes**, M.F.P.; Stanton, C.; Ross, P.R.; Dapkevicius, M.L.E.; Silva, C.C.G. Genetic Diversity, Safety and Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Artisanal Pico Cheese. *Food Microbiol.* **2017**, *63*, 178–190, doi:10.1016/j.fm.2016.11.014.
- El Galiou**, O.; Zantar, S.; Bakkali, M.; Laglaoui, A.; Centeno, J.A.; Carballo, J. Chemical and Microbiological Characteristics of Traditional Homemade Fresh Goat Cheeses from Northern Morocco. *Small Rumin. Res.* **2015**, *129*, 108–113, doi:10.1016/j.smallrumres.2015.06.005.
- Ercole**, C.; Centi, V.; Pellegrini, M.; Marotta, F.; Del Gallo, M. Effect of Ripening Time and Seasonal Changes on Microbial and Physicochemical Properties of Inland Pecorino Abruzzese Cheese. *J. Food Qual. Hazards Control* **2020**, *7*, doi:10.18502/jfqhc.7.2.2889.
- Erhardt**, M.M.; Oliveira, W. de C.; Fröder, H.; Marques, P.H.; Oliveira, M.B.P.P.; Richards, N.S.P. Lactic Acid Bacteria in Artisanal Cheese: Characterization through Metagenomics. *Fermentation* **2023**, *9*, 41, doi:10.3390/fermentation9010041.
- Feliciano**, R.J.; Boué, G.; Membré, J.-M. Overview of the Potential Impacts of Climate Change on the Microbial Safety of the Dairy Industry. *Foods* **2020**, *9*, 1794, doi:10.3390/foods9121794.
- Flórez**, A.B.; Vázquez, L.; Rodríguez, J.; Mayo, B. Phenotypic and Safety Assessment of the Cheese Strain *Lactiplantibacillus Plantarum* LL441, and Sequence Analysis of Its Complete Genome and Plasmidome. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *24*, 605, doi:10.3390/ijms24010605.
- Frau**, F.; Nuñez, M.; Gerez, L.; Pece, N.; Font, G. Development of an Autochthonous Starter Culture for Spreadable Goat Cheese. *Food Sci. Technol.* **2016**, *36*, 622–630, doi:10.1590/1678-457X.08616.
- Gaglio**, R.; Franciosi, E.; Todaro, A.; Guarcello, R.; Alfeo, V.; Randazzo, C.L.; Settanni, L.; Todaro, M. Addition of Selected Starter/Non-Starter Lactic Acid Bacterial Inoculums to Stabilise PDO Pecorino Siciliano Cheese Production. *Food Res. Int. Ott. Ont* **2020**, *136*, 109335, doi:10.1016/j.foodres.2020.109335.
- Gobbetti**, M.; De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Mancini, L.; Fox, P.F. Pros and Cons for Using Non-Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) as Secondary/Adjunct Starters for Cheese Ripening. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *45*, 167–178, doi:10.1016/j.tifs.2015.07.016.
- Gonçalves**, M.T.P.; Benito, M.J.; Córdoba, M. de G.; Egas, C.; Merchán, A.V.; Galván, A.I.; Ruiz-Moyano, S. Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-Throughput Sequencing Analysis. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 1333–1341, doi:10.1111/1750-3841.14141.
- González**, L.; Cuadrillero, A.F.; Castro, J.M.; Bernardo, A.; Tornadijo, M.E. Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from San Simón Da Costa Cheese (PDO) in Order to Develop an Autochthonous Starter Culture. *Adv. Microbiol.* **2015**, *5*, 748–759, doi:10.4236/aim.2015.511079.
- González**, L.; Zárata, V. Influence of an Autochthonous Starter Culture and a Commercial Starter on the Characteristics of Tenerife Pasteurised Goats' Milk Cheese. *Int. J. Dairy Technol.* **2012**, *65*, doi:10.1111/j.1471-0307.2012.00862.x.
- Greub**, G. Culturomics: A New Approach to Study the Human Microbiome. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 1157–1159, doi:10.1111/1469-0691.12032.
- Grizon**, A.; Theil, S.; Callon, C.; Gerber, P.; Helinck, S.; Dugat-Bony, E.; Bonnarme, P.; Chassard, C. Genetic and Technological Diversity of *Streptococcus thermophilus* Isolated from the Saint-Nectaire PDO Cheese-Producing Area. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*.
- Grizon**, A.; Theil, S.; Helinck, S.; Gerber, P.; Bonnarme, P.; Chassard, C. Genomic Characterization of Wild *Lactobacillus delbrueckii* Strains Reveals Low Diversity but Strong Typicity. *Microorganisms* **2024**, *12*, 512, doi:10.3390/microorganisms12030512.
- Guarcello**, R.; Carpino, S.; Gaglio, R.; Pino, A.; Rapisarda, T.; Caggia, C.; Marino, G.; Randazzo, C.L.; Settanni, L.; Todaro, M. A Large Factory-Scale Application of Selected Autochthonous Lactic Acid Bacteria for PDO Pecorino Siciliano Cheese Production. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 66–75, doi:10.1016/j.fm.2016.05.011.
- Guo**, H.; Zhang, W.; Kwok, L.-Y.; Menghe, B. In Vitro Evaluation of Antibiotic Resistance of *Lactobacillus bulgaricus* Strains Isolated from Traditional Dairy Products. *Czech J. Food Sci.* **2019**, *37*, 36–43, doi:10.17221/136/2018-CJFS.

- Harboe**, M.; Broe, M.L.; Qvist, K.B. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. In *Technology of Cheesemaking*; John Wiley & Sons, Ltd, **2010**; pp. 98–129 ISBN 978-1-4443-2374-0.
- Hu**, T.; Cui, Y.; Zhang, Y.; Qu, X.; Zhao, C. Genome Analysis and Physiological Characterization of Four *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.
- Huang**, Y.; Sheth, R.U.; Zhao, S.; Cohen, L.A.; Dabaghi, K.; Moody, T.; Sun, Y.; Ricaurte, D.; Richardson, M.; Velez-Cortes, F.; et al. High-Throughput Microbial Culturomics Using Automation and Machine Learning. *Nat. Biotechnol.* **2023**, *41*, 1424–1433, doi:10.1038/s41587-023-01674-2.
- Hulak**, N. Indigenous Strains of *Lactobacillus* Isolated from the Istrian Cheese as Potential Starter Cultures. *Mljekarstvo* **2016**, *66*, 282–292, doi:10.15567/mljekarstvo.2016.0404.
- Johnson**, M.E. A 100-Year Review: Cheese Production and Quality. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 9952–9965, doi:10.3168/jds.2017-12979.
- Lagier**, J.-C.; Hugon, P.; Khelaifia, S.; Fournier, P.-E.; La Scola, B.; Raoult, D. The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 237–264, doi:10.1128/cmr.00014-14.
- Landete**, J.M. A Review of Food-Grade Vectors in Lactic Acid Bacteria: From the Laboratory to Their Application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2017**, *37*, 296–308, doi:10.3109/07388551.2016.1144044.
- Lawson**, C.E.; Harcombe, W.R.; Hatzenpichler, R.; Lindemann, S.R.; Löffler, F.E.; O'Malley, M.A.; García Martín, H.; Pfleger, B.F.; Raskin, L.; Venturelli, O.S.; et al. Common Principles and Best Practices for Engineering Microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 725–741, doi:10.1038/s41579-019-0255-9.
- Levy**, S.B. Antibiotic Resistance: An Ecological Imbalance. *Ciba Found. Symp.* **1997**, *207*, 1–9; discussion 9-14, doi:10.1002/9780470515358.ch1.
- Lucey**, J.A.; Johnson, M.E.; Horne, D.S. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *J. Dairy Sci.* **2003**, *86*, 2725–2743, doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7.
- Madrau**, M.A.; Mangia, N.P.; Murgia, M.A.; Sanna, M.G.; Garau, G.; Leccis, L.; Caredda, M.; Deiana, P. Employment of Autochthonous Microflora in Pecorino Sardo Cheese Manufacturing and Evolution of Physicochemical Parameters during Ripening. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 876–885, doi:10.1016/j.idairyj.2005.08.005.
- Mangia**, N.P.; Murgia, M.A.; Garau, G.; Fancello, F.; Deiana, P. Suitability of Selected Autochthonous Lactic Acid Bacteria Cultures for Pecorino Sardo Dolce Cheese Manufacturing: Influence on Microbial Composition, Nutritional Value and Sensory Attributes. *Int. J. Dairy Technol.* **2013**, *66*, 543–551, doi:10.1111/1471-0307.12072.
- Mangia**, N.P.; Murgia, M.A.; Garau, G.; Sanna, M.G.; Deiana, P. Influence of Selected Lab Cultures on the Evolution of Free Amino Acids, Free Fatty Acids and Fiore Sardo Cheese Microflora during the Ripening. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 366–377, doi:10.1016/j.fm.2007.09.009.
- Marchand**, S.; Heylen, K.; Messens, W.; Coudijzer, K.; De Vos, P.; Dewettinck, K.; Herman, L.; De Block, J.; Heyndrickx, M. Seasonal Influence on Heat-Resistant Proteolytic Capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, Predominant Milk Spoilers Isolated from Belgian Raw Milk Samples. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 467–482, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.
- Martellacci**, L.; Quaranta, G.; Patini, R.; Isola, G.; Gallenzi, P.; Masucci, L. A Literature Review of Metagenomics and Culturomics of the Peri-Implant Microbiome: Current Evidence and Future Perspectives. *Materials* **2019**, *12*, 3010, doi:10.3390/ma12183010.
- Melkonian**, C.; Zorrilla, F.; Kjærboelling, I.; Blasche, S.; Machado, D.; Junge, M.; Sørensen, K.I.; Andersen, L.T.; Patil, K.R.; Zeidan, A.A. Microbial Interactions Shape Cheese Flavour Formation. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 8348, doi:10.1038/s41467-023-41059-2.
- Miraglia**, M.; Marvin, H.J.P.; Kleter, G.A.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E.; Cubadda, F.; Croci, L.; De Santis, B.; Dekkers, S.; et al. Climate Change and Food Safety: An Emerging Issue with Special Focus on Europe. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2009**, *47*, 1009–1021, doi:10.1016/j.fct.2009.02.005.

- Moineau, S.** Applications of Phage Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1999**, *76*, 377–382.
- Munekata, P.E.S.;** Chaves-Lopez, C.; Fernandez-Lopez, J.; Viuda-Martos, M.; Sayas-Barbera, M.E.; Perez-Picon, A.; López-Pérez, O.; Torres, E.; Garde, S.; Nuñez, M.; Alvarez, J.A.; Lorenzo, J.M. Autochthonous Starter Cultures in Cheese Production – A Review. *Food Rev. Int.* **2022**, *0*, 1–19, doi:10.1080/87559129.2022.2097691.
- Nicosia, F.D.;** Pino, A.; Maciel, G.L.R.; Sanfilippo, R.R.; Caggia, C.; de Carvalho, A.F.; Randazzo, C.L. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria Strains for Potential Use in Cheese Manufacture. *Foods* **2023**, *12*, 1154, doi:10.3390/foods12061154.
- Nieto-Arribas, P.;** Seseña, S.; Poveda, J. m.; Palop, Ll.; Cabezas, L. Genotypic and Technological Characterization of *Lactococcus lactis* Isolates Involved in Processing of Artisanal Manchego Cheese. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *107*, 1505–1517, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04334.x.
- Papadakis, P.;** Konteles, S.; Batrinou, A.; Ouzounis, S.; Tsironi, T.; Halvatsiotis, P.; Tsakali, E.; Van Impe, J.F.M.; Vougiouklaki, D.; Strati, I.F.; et al. Characterization of Bacterial Microbiota of P.D.O. Feta Cheese by 16S Metagenomic Analysis. *Microorganisms* **2021**, *9*, 2377, doi:10.3390/microorganisms9112377.
- Parente, E.;** Cogan, T.M.; Powell, I.B. Chapter 8 - Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, **2017**; pp. 201–226 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Pavunc, A.;** Kos, B.; Novak, J.; Uroić, K.; Bučan Nenadić, D.; Šušković, J. Antibiotic Susceptibility and Antimicrobial Activity of Autochthonous Starter Cultures as Safety Parameters for Fresh Cheese Production. *Mljekarstvo* **2013**, *63*, 185–194.
- Pavunc, A.;** Novak, J.; Kos, B.; Uroić, K.; Blažić, M.; Šušković, J. Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* **2012**, *50*, 141.
- Peng, X.;** Ed-Dra, A.; Yue, M. Whole Genome Sequencing for the Risk Assessment of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *63*, 11244–11262, doi:10.1080/10408398.2022.2087174.
- Pérez, G.;** Cardell, E.; Zárata, V. Technological Characterization of Lactic Acid Bacteria from Tenerife Cheese. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2003**, *38*, 537–546, doi:10.1046/j.1365-2621.2003.00696.x.
- Pino, A.;** López-Pérez, O.; Torres, E.; Garde, S.; Nuñez, M. Contribution of Autochthonous Lactic Acid Bacteria to the Typical Flavour of Raw Goat Milk Cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **2019**, *299*, 8–22, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.03.011.
- Pino, A.;** Liotta, L.; Caggia, C.; Chiofalo, V.; De Nardo, F.; Zumbo, A.; Todaro, A.; Randazzo, C.L. Effect of Seasonality on Physico-Chemical and Microbiological Properties of Nicastrese Milk and Artisanal Cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* **2021**, *368*, fnab055, doi:10.1093/femsle/fnab055.
- Pintado, A.I.E.;** Pinho, O.; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Pintado, M.M.E.; Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. Microbiological, Biochemical and Biogenic Amine Profiles of Terrincho Cheese Manufactured in Several Dairy Farms. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 631–640, doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.021.
- Poveda, J.M.;** Chicón, R.; Cabezas, L. Biogenic Amine Content and Proteolysis in Manchego Cheese Manufactured with *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* as Adjunct and Other Autochthonous Strains as Starters. *Int. Dairy J.* **2015**, *47*, 94–101, doi:10.1016/j.idairyj.2015.03.004.
- Psoni, L.;** Kotzamanidis, C.; Yiangou, M.; Tzanetakis, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactococcus lactis* Isolates from Batzos, a Greek PDO Raw Goat Milk Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *114*, 211–220, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.020.
- Renes, E.;** Fernández, D.; Abarquero, D.; Ladero, V.; Álvarez, M.A.; Tornadizo, M.E.; Fresno, J.M. Effect of Forage Type, Season, and Ripening Time on Selected Quality Properties of Sheep Milk Cheese. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 2539–2552, doi:10.3168/jds.2020-19036.
- Riquelme, C.;** Câmara, S.; Dapkevicius, M. de L.N.E.; Vinuesa, P.; da Silva, C.C.G.; Malcata, F.X.; Rego, O.A. Characterization of the Bacterial Biodiversity in Pico Cheese (an Artisanal Azorean Food). *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *192*, 86–94, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.031.

- Rodríguez Amor**, D.; Dal Bello, M. Bottom-Up Approaches to Synthetic Cooperation in Microbial Communities. *Life* **2019**, *9*, 22, doi:10.3390/life9010022.
- Ruiz-Moyano**, S.; Gonçalves dos Santos, M.T.P.; Galván, **Speranza**, B.; Bevilacqua, A.; Corbo, M.R.; Altieri, C.; Sinigaglia, A.I.; Merchán, A.V.; González, E.; Córdoba, M. de G.; Benito, M.J. Screening of Autochthonous Lactic Acid Bacteria Strains from Artisanal Soft Cheese: Probiotic Characteristics and Prebiotic Metabolism. *LWT* **2019**, *114*, 108388, doi:10.1016/j.lwt.2019.108388.
- Ruppitsch**, W.; Nisic, A.; Hyden, P.; Cabal, A.; Sucher, J.; Stöger, A.; Allerberger, F.; Martinović, A. Genetic Diversity of *Leuconostoc Mesenteroides* Isolates from Traditional Montenegrin Brine Cheese. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1612, doi:10.3390/microorganisms9081612.
- Ryu**, S.; Park, W.S.; Yun, B.; Shin, M.; Go, G.; Kim, J.N.; Oh, S.; Kim, Y. Diversity and Characteristics of Raw Milk Microbiota from Korean Dairy Farms Using Metagenomic and Culturomic Analysis. *Food Control* **2021**, *127*, 108160, doi:10.1016/j.foodcont.2021.108160.
- Sánchez-Gamboa**, C.; Hicks-Pérez, L.; Gutiérrez-Méndez, N.; Heredia, N.; García, S.; Nevárez-Moorillón, G.V. Microbiological Changes during Ripening of Chihuahua Cheese Manufactured with Raw Milk and Its Seasonal Variations. *Foods* **2018**, *7*, 153, doi:10.3390/foods7090153.
- Sarhan**, M.S.; Hamza, M.A.; Youssef, H.H.; Patz, S.; Becker, M.; ElSawey, H.; Nemr, R.; Daanaa, H.-S.A.; Mourad, E.F.; Morsi, A.T.; et al. Culturomics of the Plant Prokaryotic Microbiome and the Dawn of Plant-Based Culture Media – A Review. *J. Adv. Res.* **2019**, *19*, 15–27, doi:10.1016/j.jare.2019.04.002.
- Selma-Royo**, M.; Segata, N.; Ricci, L. Human Microbiome Cultivation Expands with Al. *Nat. Biotechnol.* **2023**, *41*, 1389–1391, doi:10.1038/s41587-023-01852-2.
- Settanni**, L.; Gaglio, R.; Guarcello, R.; Francesca, N.; Carpino, S.; Sannino, C.; Todaro, M. Selected Lactic Acid Bacteria as a Hurdle to the Microbial Spoilage of Cheese: Application on a Traditional Raw Ewes' Milk Cheese. *Int. Dairy J.* **2013**, *32*, 126–132, doi:10.1016/j.idairyj.2013.04.010.
- Silvetti**, T.; Capra, E.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Decimo, M.; Gavazzi, F.; Giannico, R.; De Noni, I.; Brasca, M. Microbial Population Profile during Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter Cheese, Produced with and without Autochthonous Starter Culture. *LWT* **2017**, *84*, 821–831, doi:10.1016/j.lwt.2017.06.022.
- M. Selection of Autochthonous Strains as Promising Starter Cultures for Fior Di Latte, a Traditional Cheese of Southern Italy. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 88–97, doi:10.1002/jsfa.6686.
- Taboada**, N.; Van Nieuwenhove, C.; Alzogaray, S.L.; Medina, R. Influence of Autochthonous Cultures on Fatty Acid Composition, Esterase Activity and Sensory Profile of Argentinean Goat Cheeses. *J. Food Compos. Anal.* **2015**, *40*, 86–94, doi:10.1016/j.jfca.2014.12.013.
- Tavaria**, F.K.; Reis, P.J.M.; Malcata, F.X. Effect of Dairy Farm and Milk Refrigeration on Microbiological and Microstructural Characteristics of Matured Serra Da Estrela Cheese. *Int. Dairy J.* **2006**, *16*, 895–902, doi:10.1016/j.idairyj.2005.08.010.
- Terzić-Vidojević**, A.; Tonković, K.; Leboš Pavunc, A.; Beganović, J.; Strahinić, I.; Kojić, M.; Veljović, K.; Golić, N.; Kos, B.; Čadež, N.; et al. Evaluation of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures for Production of White Pickled and Fresh Soft Cheeses. *LWT - Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 298–306, doi:10.1016/j.lwt.2015.03.050.
- Tidona**, F.; Francolino, S.; Ghiglietti, R.; Locci, F.; Carminati, D.; Laforce, P.; Giraffa, G. Characterization and Pre-Industrial Validation of *Streptococcus thermophilus* Strains to Be Used as Starter Cultures for Crescenza, an Italian Soft Cheese. *Food Microbiol.* **2020**, *92*, 103599, doi:10.1016/j.fm.2020.103599.
- Tormo**, H.; Ali Haimoud Lekhal, D.; Roques, C. Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Goat Milk and Effect of Farming Practices on the Dominant Species of Lactic Acid Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *210*, 9–15, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.002.
- Turchi**, B.; Nuvoloni, R.; Fratini, F.; Pedonese, F.; Ebani, V.V.; Cerri, D. Caciotta Della Garfagnana Cheese: Selection and Evaluation of Autochthonous Mesophilic Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures. *Ital. J. Anim. Sci.* **2011**, *10*, e22, doi:10.4081/ijas.2011.e22.

van der Spiegel, M.; van der Fels-Klerx, H.J.; Marvin, H.J.P. Effects of Climate Change on Food Safety Hazards in the Dairy Production Chain. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 201–208, doi:10.1016/j.foodres.2011.12.011.

Microbiol. **2007**, *103*, 2142–2152, doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03450.x.

Zárate, V.; Belda, F.; Pérez, C.; Cardell, E. Changes in the Microbial Flora of Tenerife Goats' Milk Cheese during

Veljovic, K.; Terzic-Vidojevic, A.; Vukasinovic, M.; Strahinic, I.; Begovic, J.; Lozo, J.; Ostojic, M.; Topisirovic, L. Preliminary Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Zlata Cheese. *J. Appl.*

Ripening. Int. Dairy J. **1997**, *7*, 635–641, doi:10.1016/S0958-6946(97)00065-4.

III - Diversité de souches locales de *Streptococcus thermophilus*

III.1. Etude de la diversité de *Streptococcus thermophilus*

III.1.A. Stratégie expérimentale et principaux résultats

Le développement de ferments autochtones repose sur l'isolement et la caractérisation minutieuse de souches locales. L'intérêt de leur utilisation est évalué d'un point de vue technologique dans des matrices proches du fromage (lait, fromages modèles) pour identifier les isolats possédant les capacités les plus adaptées à la variété fromagère étudiée. Le chapitre précédent soulignait l'intérêt des ferments autochtones dans la préservation des caractéristiques typiques des fromages artisanaux. Or, la diversité microbienne des laits crus est un marqueur important à l'origine de la typicité de ces fromages. Etudier la diversité intra-espèce pourrait permettre de favoriser le maintien de la typicité en valorisant les ressources microbiennes locales.

Ce chapitre présente la première publication du projet, qui visait à étudier la diversité génomique et technologique de souches de *Streptococcus thermophilus* isolées de la zone AOP Saint-Nectaire. L'objectif de l'étude était i) d'étudier la diversité isolée de la zone pour la mettre à profit lors du développement du ferment et ii) d'identifier les souches les plus prometteuses sur leurs capacités acidifiantes et protéolytiques.

Les isolats *Streptococcus thermophilus* ont été obtenus à partir de laits crus collectés sur la zone de production AOP Saint-Nectaire. Ces isolats ont été criblés une première fois prioritairement sur leurs capacités acidifiantes étudiées dans du lait reconstitué stérile. Plusieurs profils acidifiants ont été identifiés et l'étude s'est poursuivie sur plusieurs isolats représentatifs de la diversité et quelques souches isolées de ferments commerciaux. La diversité génomique de ces isolats a été investiguée en séquençant leurs génomes. L'analyse génomique comparative incluait une reconstruction phylogénétique basée sur le core-génome, fournissant des indications sur l'évolution des souches. Les résultats indiquaient que les reconstructions phylogénétiques des souches ne correspondaient pas à la distribution géographique de leur isolement, malgré une aire d'isolement restreinte.

Le pan-génome des souches a été étudié et utilisé comme indicateur de diversité génomique. La forte proportion de gènes accessoires constituant le pan-génome indiquait une forte variabilité au sein des souches étudiées. La diversité provenait principalement des gènes accessoires qui, selon une analyse fonctionnelle, étaient impliqués dans diverses catégories qui présentaient pour la plupart un intérêt potentiel dans le cadre d'une fabrication fromagère (intérêt technologique: acidification, protéolyse, lipolyse ; résistance au stress ; résistance aux phages ; etc.). L'identification de gènes spécifiquement impliqués dans le transport et le métabolisme des glucides indiquait que l'ensemble des souches locales et commerciales possédaient dans leur génome les gènes impliqués dans le métabolisme du lactose, glucose, galactose, saccharose et fructose.

En outre, l'étude des capacités acidifiantes des souches indiquait que la plupart des isolats présentaient des capacités acidifiantes rapides et intenses, qui sont d'importantes caractéristiques pour leur utilisation en tant que ferment lactique.

Diversité de souches sauvages de *S. thermophilus*

Finalement, la démarche d'analyse indiquait que la diversité de souches sauvages de *Streptococcus thermophilus* était valorisable pour le développement de ferments lactiques. La diversité ne semblait pas dépendante de la saison d'isolement.

Selon les recherches effectuées dans la littérature, l'analyse de pan-génome pour l'étude de la diversité intra-espèce de bactéries lactiques n'avait pas été reportée jusqu'à lors dans le cadre d'un développement de ferments autochtones. Pourtant, ce type d'analyse permet d'identifier la diversité disponible sur un terroir, pour la mettre à profit en l'intégrant dans le développement de ferments indigènes. Les recherches présentées dans ce chapitre constituent donc une démarche d'analyse et de valorisation de la diversité d'espèce.

III.2. Article 1 - Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area

Les résultats de cette étude ont permis la rédaction d'un premier article "Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area" publié dans "Frontiers in microbiology". L'article a été soumis en Juin 2023 et accepté en Novembre 2023. Lien d'accès : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1245510>.



OPEN ACCESS

EDITED BY

Photis Papademas,
Cyprus University of Technology, Cyprus

REVIEWED BY

Vinicius Da Silva Duarte,
Norwegian University of Life Sciences, Norway
Li Weicheng,
Inner Mongolia Agricultural University, China

*CORRESPONDENCE

Anna Grizon

✉ anna.grizon@inrae.fr

Sebastien Theil

✉ sebastien.theil@inrae.fr

RECEIVED 23 June 2023

ACCEPTED 03 October 2023

PUBLISHED 14 November 2023

CITATION

Grizon A, Theil S, Callon C, Gerber P, Helinck S, Dugat-Bony E, Bonnarme P and Chassard C (2023) Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area.

Front. Microbiol. 14:1245510.

doi: 10.3389/fmicb.2023.1245510

COPYRIGHT

© 2023 Grizon, Theil, Callon, Gerber, Helinck, Dugat-Bony, Bonnarme and Chassard. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Genetic and technological diversity of *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire PDO cheese-producing area

Anna Grizon^{1*}, Sebastien Theil^{1*}, Cecile Callon¹, Pauline Gerber², Sandra Helinck³, Eric Dugat-Bony³, Pascal Bonnarme³ and Christophe Chassard¹

¹UMR545 Fromage, INRAE, VetAgro Sup, Université Clermont Auvergne, Aurillac, France, ²Pôle Fromager AOP Massif Central, Aurillac, France, ³Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, Palaiseau, France

Streptococcus thermophilus is of major importance for cheese manufacturing to ensure rapid acidification; however, studies indicate that intensive use of commercial strains leads to the loss of typical characteristics of the products. To strengthen the link between the product and its geographical area and improve the sensory qualities of cheeses, cheese-producing protected designations of origin (PDO) are increasingly interested in the development of specific autochthonous starter cultures. The present study is therefore investigating the genetic and functional diversity of *S. thermophilus* strains isolated from a local cheese-producing PDO area. Putative *S. thermophilus* isolates were isolated and identified from milk collected in the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area and from commercial starters. Whole genomes of isolates were sequenced, and a comparative analysis based on their pan-genome was carried out. Important functional properties were studied, including acidifying and proteolytic activities. Twenty-two isolates representative of the diversity of the geographical area and four commercial strains were selected for comparison. The resulting phylogenetic trees do not correspond to the geographical distribution of isolates. The clustering based on the pan-genome analysis indicates that isolates are divided into five distinct groups. A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional annotation of the accessory genes indicates that the accessory gene contents of isolates are involved in different functional categories. High variability in acidifying activities and less diversity in proteolytic activities were also observed. These results indicate that high genetic and functional variabilities of the species *S. thermophilus* may arise from a small (1,800 km²) geographical area and may be exploited to meet demand for use as autochthonous starters.

KEYWORDS

Streptococcus thermophilus, diversity, genome comparison, functional properties, autochthonous starter, cheese

1. Introduction

Streptococcus thermophilus is a thermophilic lactic acid bacteria (LAB) with major economic importance for the dairy industry. Due to its ability to rapidly acidify the milk, it is extensively used for the manufacture of several important fermented dairy products and is considered the second most important species among LAB after *Lactococcus lactis* (Harnett et al., 2022). *Streptococcus thermophilus* is a clonal species that has only recently emerged from a commensal ancestor of the *salivarius* group (Delorme, 2008). This species is part of the genus *Streptococcus* and is the only one that obtained the Generally Recognized as Safe (GRAS) status and the Qualified Presumption of Safety (QPS) status within this genus. Comparative genomic studies on *Streptococcus thermophilus* genomes highlight that this species has lost many virulence-related functions common among pathogenic streptococci. These studies suggest that the *Streptococcus thermophilus* genome has followed a regressive evolution process toward a specialized bacterium dedicated to growth in milk. Comparative genomics also revealed that the dairy *Streptococcus* genome may have been shaped mainly through loss-of-function events and horizontal gene transfer (Bolotin et al., 2004; Hols et al., 2005; Goh et al., 2011).

In the dairy industry, *Streptococcus thermophilus* is used as a starter culture for its capability to rapidly acidify the milk, which is a technological characteristic of major importance to guarantee a good outcome of the dairy process and to enhance food safety by preventing the development of pathogenic bacteria (Rakhmanova et al., 2018). Proteolysis is considered one of the most important enzymatic pathways in the manufacture of many fermented dairy products. In cheese production, proteolysis plays a crucial role in the flavor and texture of cheese by releasing peptides and free amino acids that could undergo secondary reactions (Fox, 1989; Smit et al., 2005).

Over the past few years, changes in the way of life of consumers have imposed requirements for uniformity in the quality of traditional dairy products with high typicality (Settanni and Moschetti, 2014). Due to this growing interest in preserving the typical sensorial properties of traditional cheeses, there is an increasing demand for autochthonous (also called local, indigenous, or wild) and specific strains to replace the well-defined industrial starter strains largely widespread and extensively used in dairy industries (Munekata et al., 2022). It is now well known that a careful selection and use of autochthonous microbial strains can contribute to obtaining high-quality, functional, and safe dairy products (Gómez et al., 2016; Campagnollo et al., 2018; Fusco et al., 2019; Ait Chait et al., 2021; Huang et al., 2021). Such strains are mostly isolated from traditionally made cheeses or raw milk (Carafa et al., 2015; Terzić-Vidojević et al., 2015; Frau et al., 2016; Fusco et al., 2019; Özkan et al., 2021).

Many studies have focused on the genetic and functional diversity of *Streptococcus thermophilus* strains (Giraffa et al., 2001; Morandi and Brasca, 2012; Vendramin et al., 2017; Alexandraki et al., 2019), but few have studied the genetic diversity of wild strains of this species (Andrighetto et al., 2002; Erkus et al., 2014). Few studies have been conducted on the biodiversity analysis of *Streptococcus thermophilus* strains using whole genome sequencing (Hu et al., 2020). All these studies reported high genetic and technological diversity within *S. thermophilus* strains isolated from dairy products.

Protected designation of origin (PDO) cheese producers from Massif Central (France) mostly use commercial starter cultures for the manufacture of cheeses. The use of commercial starters in cheese

production results in the loss of typical characteristics of the products (Hansen, 2002). To strengthen the link with the area and improve the sensorial qualities and typicality of cheeses, PDO cheese producers are increasingly interested in the development of specific autochthonous starter cultures. To meet this demand, a first step would be to isolate new wild strains from the producing areas and investigate the genetic and functional diversity of these strains within these reservoirs. Saint-Nectaire is an uncooked pressed cheese that was awarded the PDO label in 1955. Made in one of the smallest PDO areas in Europe, between Puy-de-Dôme and Cantal (France), this is the third French PDO cheese with cow's milk.

The present study explores the genetic and functional diversity of wild strains of *Streptococcus thermophilus* from natural habitats at a local scale. This diversity was explored in the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area, one of the smallest PDO areas in Europe with only 1,800 km². The comparative analysis of the whole genome sequences of 26 wild strains of *Streptococcus thermophilus* was carried out. Important functional properties of the isolates were investigated, including milk acidification and proteolytic activities.

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification of *Streptococcus thermophilus* strains

2.1.1. Isolation of strains

Presumptive *Streptococcus thermophilus* strains were isolated from (i) 62 milk samples (heated for 6 h at 42°C) collected on 31 different farms in the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area (France) in summer and in winter to study the seasonal effect on biodiversity and (ii) commercial starter cultures. Isolation was carried out on M17 agar medium (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) incubated at 42°C for 48 h. Representative colonies were picked out of this medium, purified twice, and maintained frozen at -80°C in an M17 broth medium containing 20% (v/v) glycerol. One *Streptococcus thermophilus* isolate was obtained from a bacterial collection of LAB isolated in 1998 from Saint-Nectaire cheeses (INRAE-ARILAIT collection). The Saint-Nectaire PDO area spreads over 69 municipalities between Puy-de-Dôme and Cantal (France), which are referenced in Supplementary Table S1. The specifications for the PDO of Saint-Nectaire cheese describe the conditions for cow breeding, milk production, cheese manufacturing, and ripening of cheeses.¹

2.1.2. 16S rDNA identification

16S rDNA of Saint-Nectaire isolates was amplified with the universal primers WO2 (5'-100 GNTACCTTGTTACGACTT-3') and W18 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), as described previously by Callon et al. (2004). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out in a final volume of 50 µL containing 1X PCR buffer with MgCl₂, 1 colony of isolates, 0.25 mM each primer, 200 mM each dNTP, and 1 U Taq DNA polymerase. The thermal cycling conditions were 94°C for 3 min, followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 50°C for

¹ https://www.inao.gouv.fr/show_texte/4840

30 s, 72°C for 1 min 30 s, and a final extension step of 72°C for 10 min. The 16S rDNA gene sequencing was performed by LGC Biosearch Technologies (Berlin, Germany).

16S rDNA of commercial strains was amplified with the universal primers A (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and H (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'; Feurer et al., 2004). PCR amplification was carried out as described above for the Saint-Nectaire isolates. The 16S rDNA gene sequencing was performed by Eurofins Genomics (Konstanz, Germany).

To identify the partial 16S rDNA sequences obtained, a search of the NCBI GenBank DNA database was conducted using the BLAST algorithm. The percentage of similarity with DNA sequences deposited in this bank was determined.

16S rDNA sequences were deposited in the NCBI GenBank database under accession numbers OR350537-OR350561.

2.1.3. Selection of representative isolates

In total, 58 isolates and 4 commercial strains were identified as *Streptococcus thermophilus* and were screened for their acidifying and proteolytic activity and for their growth characteristics in sterilized skimmed milk. Notably, 200 mL of sterilized skimmed milk (LACTALIS Ingredients, Bourgbarré, France) was inoculated with isolates at 10^6 cfu.mL⁻¹ and incubated for 24 h in a temperature-controlled batch reactor programmed to simulate the decrease in temperature during the manufacture of Saint-Nectaire cheese type (decrease from 33°C to 9°C over 24 h). The acidification kinetics were studied by continuous pH recording (iCINAC system). Proteolysis abilities of isolates were measured using the OPA (o-phthalaldehyde) method described by Church et al. (1983). Growth characteristics of isolates were determined by enumeration of isolates on M17 agar medium every hour for 24 h.

Three groups of isolates were formed based on these results. A total of 22 isolates representative of these three groups were selected for further characterization in this study. All selected isolates collected from the farms were isolated from dairy farms with milk production and cheese manufacturing directly on the farm.

2.2. Genetic characterization of strains

2.2.1. DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted from cell cultures with Nucleospin® Tissue from Macherey Nagel according to the manufacturer's instructions. Final concentrations were measured with a Qubit™ fluorometer using the dsDNA Broad Range Kit (Thermo Fisher Scientific). The extracted DNA was further sequenced using Illumina technology. Library preparation and sequencing were handled by Eurofins genomics (Konstanz, Germany) using a Novaseq 6000 sequencing system (Illumina, San Diego, CA, United States).

2.2.2. Genome assembly and annotation

Sequencing reads from raw fastq files were filtered at Q30 with a minimal length of 110 bp with prinSeq (Cantu et al., 2019). Reads with remaining sequencing adapters were excluded with cutadapt V4.1 (Martin, 2011). Each genome was assembled using Spades V3.13 (Bankevich et al., 2012) with the careful option and annotated with Bakta V1.5 (Schwengers et al., 2021). EBI accession numbers are referenced in Table 1.

TABLE 1 *Streptococcus thermophilus* isolation sources with genomes assembly accession numbers analyzed in this study.

Isolates	Isolation source	Season of isolation	EBI accession ID project
19M1a	Farm 19	Summer	GCA_950101965
19bM2	Farm 19	Summer	GCA_950102045
21bM2	Farm 21	Summer	GCA_950101935
26bM1	Farm 26	Summer	GCA_950102035
26bM3	Farm 26	Summer	GCA_950101995
29bM1	Farm 29	Summer	GCA_950101945
29bM2	Farm 29	Summer	GCA_950102105
H10bM5	Farm 10	Winter	GCA_950101905
H11M1a	Farm 11	Winter	GCA_950102095
H11M1b	Farm 11	Winter	GCA_950102065
H11M1c	Farm 11	Winter	GCA_950102075
H11bM1	Farm 11	Winter	GCA_950102085
H11bM2	Farm 11	Winter	GCA_950102055
H14bM5	Farm 14	Winter	GCA_950102025
H20bM1	Farm 20	Winter	GCA_950101925
H23bM1	Farm 23	Winter	GCA_950101975
H23bM2	Farm 23	Winter	GCA_950101915
H23bM3	Farm 23	Winter	GCA_950101895
H26bM2	Farm 26	Winter	GCA_950102015
H26bM3	Farm 26	Winter	GCA_950101955
H26M3c	Farm 26	Winter	GCA_950102005
M134	ARILAIT collection	-	GCA_950101985
CS1	Commercial starter	-	PRJEB61322
CS3	Commercial starter	-	PRJEB61322
CS4	Commercial starter	-	PRJEB61322
CS2	Commercial starter	-	PRJEB61322

2.2.3. Pan-genome assembly and visualization

Annotated GFF3 files of 22 *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area and 4 strains of *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial starter cultures genomes were submitted to Roary (Page et al., 2015) for pan-genome analysis using default parameters. A gene presence-absence data matrix was derived and visualized using Phandango (Hadfield et al., 2018).

2.2.4. Phylogenetic reconstruction

Nucleotide sequences of 1,350 core genes (excluding duplicated genes) were extracted from Roary results. They have been aligned with Mafft (Katoh and Standley, 2013), and distance computing and tree sampling were realized with BEAST (Suchard et al., 2018). A strict molecular clock was chosen with the HKY substitution model. BEAST (Suchard et al., 2018) is a program for Bayesian analysis of molecular sequences using MCMC (Markov chain Monte Carlo). It is entirely orientated toward rooted, time-measured phylogenies inferred using strict or relaxed molecular clock models. BEAST uses MCMC to average over tree space, so that each tree is weighted proportional to

its posterior probability. We chose the strict molecular clock model with the HKY substitution model because this assumes that all branches on the tree have the same rate of evolution. This appeared reasonable considering the absence of knowledge on those rates for our new isolates.

Core-genome single nuclear polymorphism (SNP) tree was created with Parsnp (Treangen et al., 2014) on the Galaxy platform (The Galaxy Community, 2022). The resulting phylogenetic tree was visualized using iTOL.² Parsnp is a genome multi-alignment tool designed to align genome sequences. It aligns and provides the output as the multiple sequence alignment of given sequences, SNP variations, and the core genome phylogeny. For this reconstruction, LMD-9 was used as the reference genome. The genome sequencing of *Streptococcus thermophilus* LMD-9 was described previously (Makarova et al., 2006), and the complete genome sequence can be accessed at GenBank under accession number CP000419.

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) numbers (Kanehisa and Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa et al., 2023) for accessory genes were obtained using the eggno-mapper v2 web tool (Iyer et al., 2010). Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) was performed using the mixOmics package of R software V 4.2.3.³

2.3. Technological characterization of isolates

2.3.1. Preparation of model cheese curd

The model cheese curds (MCC) were prepared according to Callon et al. (2016) with some modifications. In total, 40 mL of pasteurized milk (Ferme des Peupliers, Normandie, France) was incubated at 33°C and inoculated with isolates at 10⁶ cfu.mL⁻¹. The milk was coagulated with 12 µL of calf rennet for 45 min at 33°C and then centrifuged for 20 min at 20,000 g at 33°C. The supernatant (lactoserum) was discarded, and the curd was incubated for 24 h in a temperature-controlled batch reactor programmed to simulate the decrease in temperature during the manufacture of Saint-Nectaire cheese type (decrease from 33°C to 9°C over 24 h). Each strain was tested three times.

2.3.2. Growth characteristics

To determine the growth ability of isolates, MCC samples were collected at 0, 6, and 24 h. MCC samples were blended two times for 2 min in a phosphate buffer of pH 7.5 using a Stomacher blender (Interscience, St Nom la Bretèche, France) for dissociating all the cell aggregates. After appropriate dilution in Ringer's solution, *S. thermophilus* isolates were enumerated on M17 agar and incubated at 30°C for 48 h.

2.3.3. Acidifying activity

To analyze the acidifying activities of isolates, MCC samples were collected at 0, 6, and 24 h, and pH was measured in the core of the MCC samples using a WTW pH 526 pH meter with a LOT406-M6-DXK electrode (Mettler-Toledo S.A, Viroflay, France). A classification of isolates based on their acidifying activities was

constructed according to that previously reported by Morandi and Brasca (2012), with some modifications. The pH unit target values were modified because we worked on a model cheese curd with a temperature decrease mimicking Saint-Nectaire cheesemaking (33°C to 9°C), while precedent studies worked on fermented milk at a constant temperature of 37°C.

2.3.4. Proteolytic activity

The extraction of water-soluble nitrogen from the MCC samples was carried out according to the method described by Myagkonosov et al. (2021) with some modifications. Five grams of MCC samples were mixed with 5 cm³ of deionized water and homogenized with a stomacher for 4 min. The resulting mixture was transferred to a volumetric flask, and the volume was made up to 100 mL with deionized water. The mixture was kept at 40°C for 1 h with continuous shaking. The samples were centrifuged at 3,000 g for 30 min. After centrifugation, the samples were cooled to 4°C, and the upper fat layer was removed. The supernatant was separated and filtered with a pore size of 0.45 µm. The resulting filtrate was mixed with deionized water at a ratio of 1:5. Next, 3 mL of OPA (o-phthalaldehyde) reagent prepared according to Church et al. (1983) was added to 300 µL of the solution, and after 2 min, absorbance was measured at 340 nm with a 7,200 spectrophotometer Jenway (Dutscher, France). The results have been expressed in mmol.L⁻¹ of glycine based on a calibration curve. The proteolytic activity of isolates was determined at 24 h of fermentation by subtracting the results at 0 h of fermentation.

2.3.5. Statistical analysis

Statistical analysis of biochemical data was performed using the XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). The results are reported as means ± standard deviation. The normality of the data was checked using a Shapiro–Wilk test ($p < 0.05$). The test rejected the hypothesis H_0 of normality when the value of p was ≤ 0.05 . A large number of variables did not have a normal distribution, and therefore a non-parametric test (Kruskal–Wallis) and *post-hoc* comparison (Conover–Iman procedure) were used to compare the concentrations obtained. Differences between the mean values were considered significant at $p < 0.05$. Pearson's correlations at the 5% significance level ($p < 0.05$) were used to explain the relationship between functional properties.

3. Results and discussion

3.1. Isolation and identification

In this study, strains belonging to the *Streptococcus thermophilus* species were isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area (France).

All isolates were identified on the basis of 16S rDNA sequence alignment using the NCBI blast algorithm. Isolates showing a percentage of similarity equal to or higher than 99% with *Streptococcus thermophilus* DNA sequences available in this database were considered to be *Streptococcus thermophilus*. In total, 58 isolates were identified as *Streptococcus thermophilus*.

Twenty-two isolates collected throughout the geographical producing area and representative of diversity, together with four commercial strains, were selected and characterized for their genetic

² <https://itol.embl.de/>

³ <http://mixomics.org/>

and technological properties. Conditions of isolation and the EBI accession number are referenced in Table 1. The genome sequencing and assembly-related information are shown in Supplementary Table S2.

3.2. Genetic diversity

3.2.1. Phylogenetic reconstruction

Two phylogenetic analyses were performed (Figure 1). The first one was based on core-gene alignment using the Bayesian method and allowed to identify seven clades (Figure 1A), namely, A–G. The other was based on single nucleotide polymorphisms (SNPs) detected (Figure 1B) and allowed the distinction of seven clades, namely, 1–7.

From the two resulting trees, it could be noticed that SN-isolates from the same farms were distributed in various clades. For example, in Figure 1A, isolates H11M1a, H11bM1, and H11M1b were all isolated on farm 26, but were not located in the nearby clade. A similar situation is observed in Figure 1B for isolates 26bM1, 26bM3, and H26M3c. Moreover, strains from different farms may be clustered together.

These results indicate that the phylogenetic reconstruction of isolates did not correspond to their geographical distribution, despite a small isolation area (1,800 km²) and closed milk production. Vendramin et al. (2017) and Hu et al. (2020) reported similar results with strains isolated from China and Italy, respectively, compared to strains isolated from other continents. This distinction indicated that the isolation source did not exert an important impact on the evolution of *Streptococcus thermophilus*, although the farms are quite close to one another. It is also notable that isolates from summer and winter milk were distributed into different clades and not clustered together, suggesting that the genetic variability of the isolates did not depend on the season of isolation.

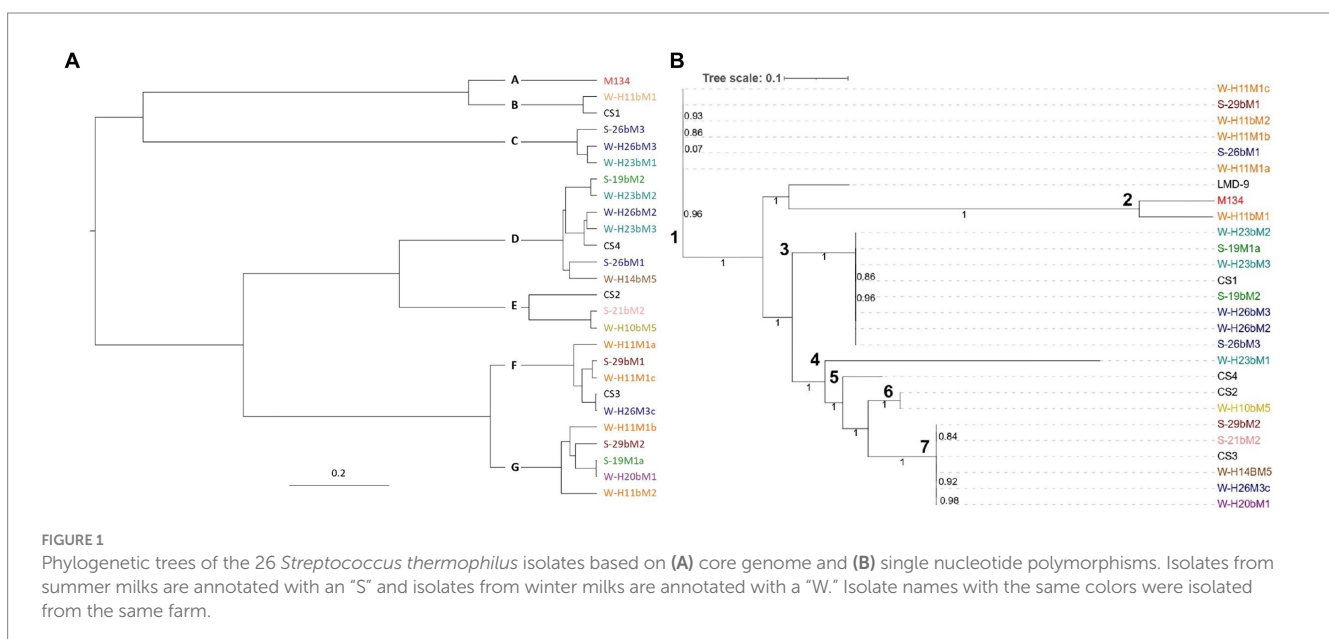
3.2.2. Pan-genome analysis

The pan-genome of the 22 Saint-Nectaire isolates and the 4 commercial strains was performed by clustering the genes encoding

complete protein sequences into core and accessory genomes using Roary (Page et al., 2015).

The core genome is the set of genes shared by all the genomes studied and can be divided into hard-core genes, which are defined to be present in >99% of the genomes, and soft-core genes, which are present in 95%–99% of the genomes. The accessory genome is shared by a subset of the genomes tested and is subdivided into shell genes, which are present in 15%–95% of genomes, and cloud genes, which are found in less than 15% of genomes. From the 3,269 genes constituting the pan-genome of the 26 *Streptococcus thermophilus* isolates studied here, we found 1,450 (44%) core genes (present in 24/26 genomes), including 1,355 (41%) hard core genes (present in 25/26 genomes) and 95 (3%) soft core genes (present in 24/25 genomes), and 1,819 (56%) accessory genes (present in less than 24 genomes), which might be responsible for the fundamental differences in phenotypic characteristics between the isolates (Daughtry et al., 2018), including 776 (24%) shell genes (present in 3–24 genomes) and 1,053 (32%) cloud genes (present in less than 3 genomes; Figure 2). These results are similar to those reported by Alexandraki et al. (2019), who analyzed the pan-genome of 23 strains of *S. thermophilus* and identified 1,089 core genes (52%) and 997 accessory genes (48%).

The generated clustering based on the pan-genome was concordant with the phylogenetic reconstruction based on SNPs (Figure 1B) in defining the relationships among isolates. It showed five main clusters with obvious differences in accessory genes for each of them (Figure 2). The first cluster consisted of SN-isolate H10bM5 and commercial strains CS4 and CS2. Cluster 2 included SN-isolates H11bM1, M134, and H23bM1. SN-isolates 21bM2, 29bM2, H20bM1, H26M3c, H14bM5, and commercial strain CS3 were clustered together. The fourth cluster comprised SN-isolates H11M1b, H11M1a, 26bM1, 29bM1, H11M1c, and H11bM2. Finally, the fifth cluster consisted of SN-isolates 19M1a, H23bM2, 19bM2, H26bM2, H23bM3, H26bM3, 26bM3, and commercial strain CS1. These results reveal a high genetic variation level probably related to the accessory gene content across isolates, which are involved in different functional categories. These findings are in accordance with Giraffa et al. (2001),

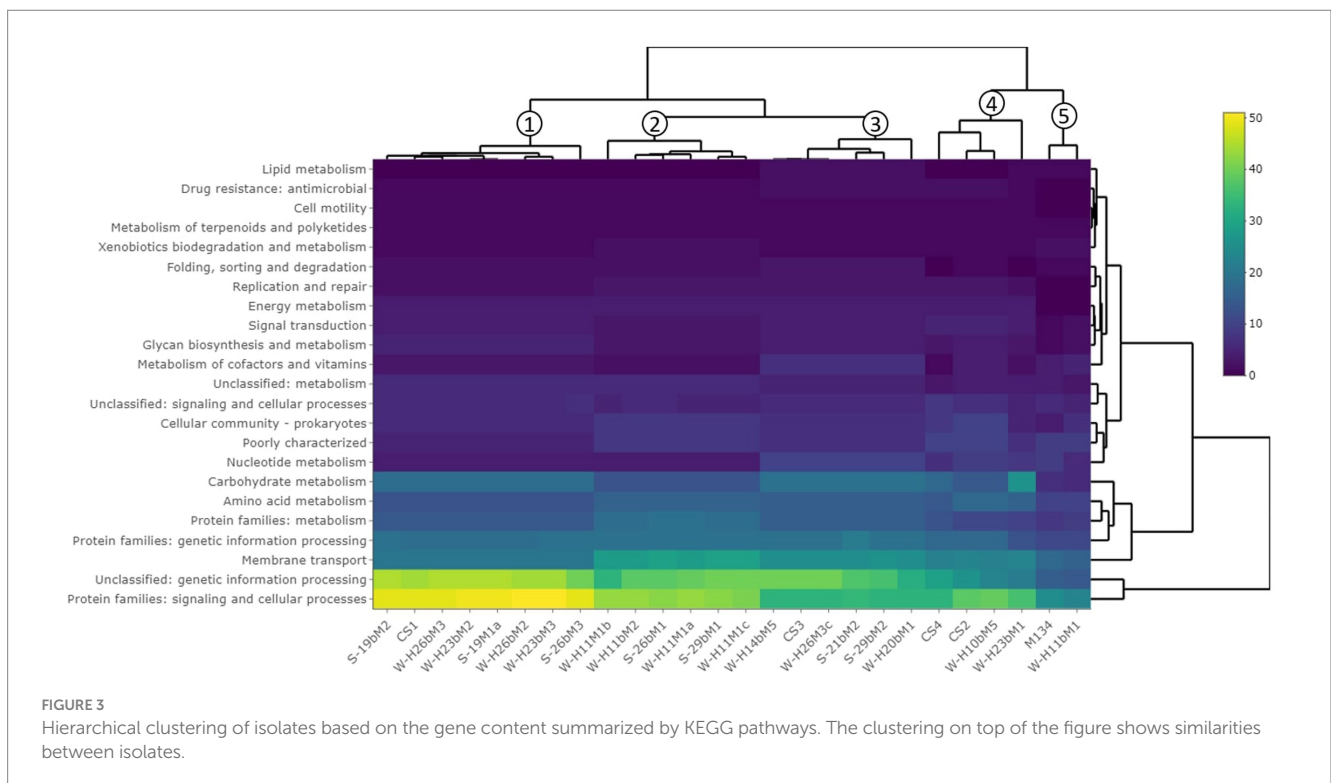
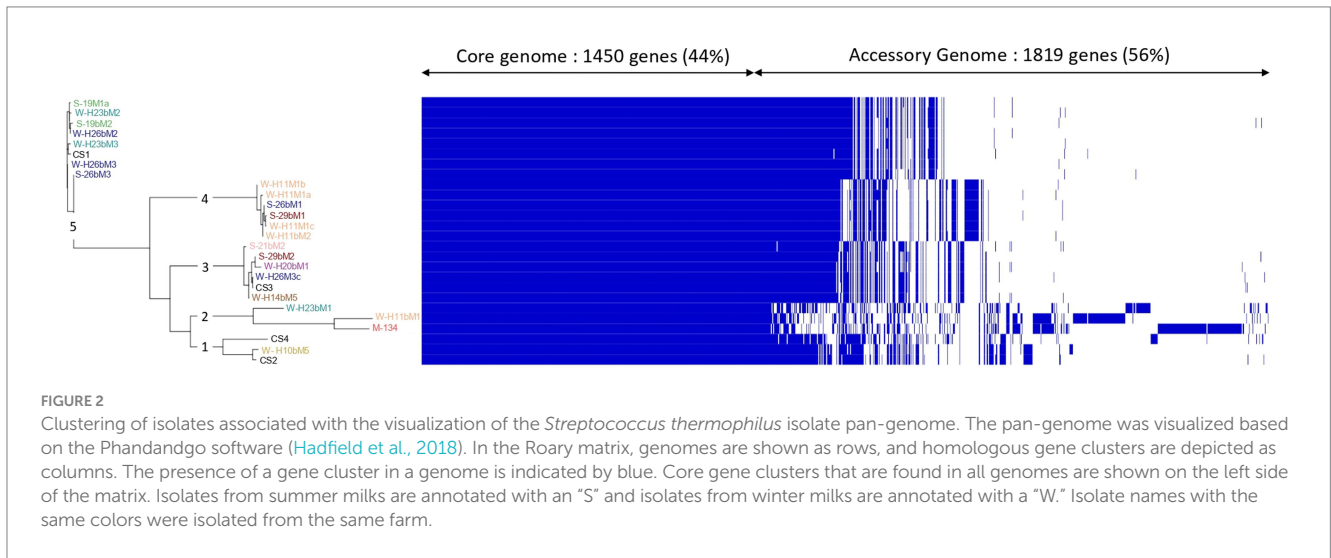


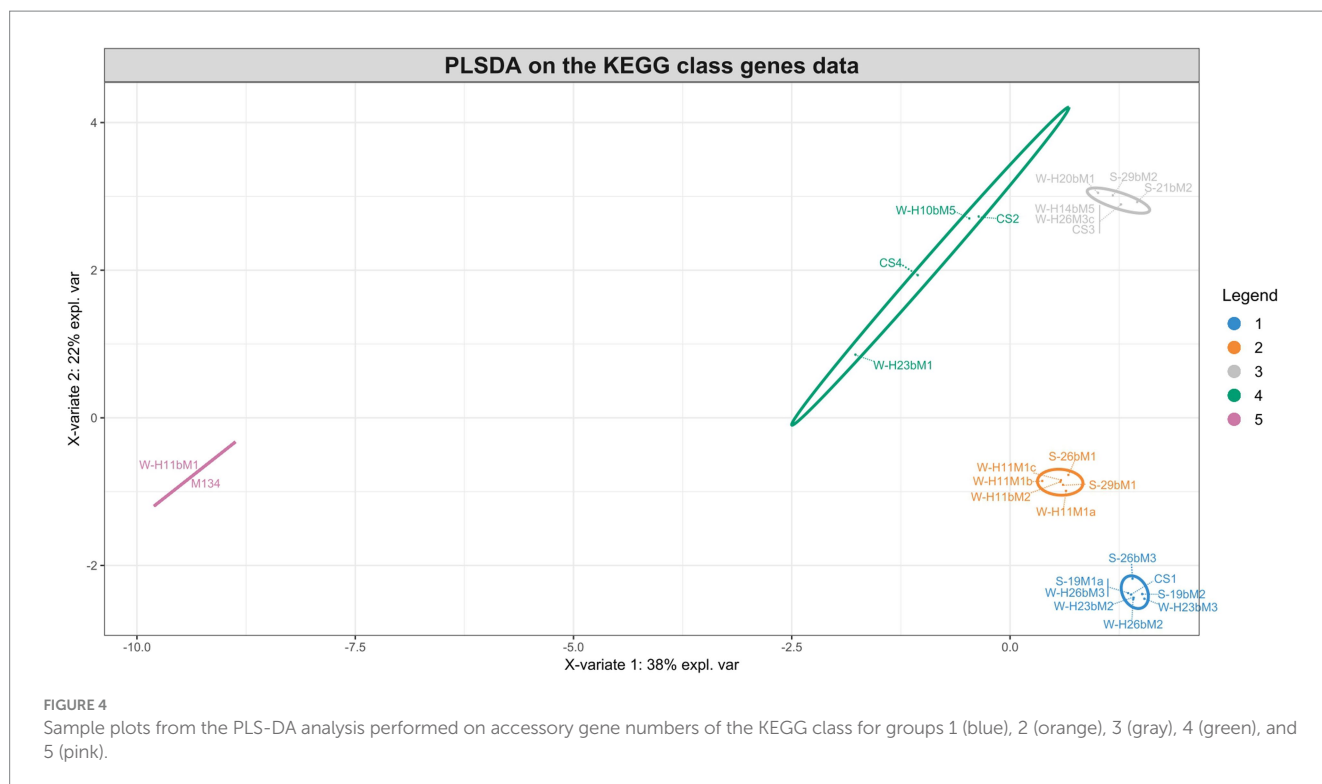
Andrighetto et al. (2002), and Morandi and Brasca (2012), who also reported a high genetic variability of *Streptococcus thermophilus* with the RAPD-PCR method.

3.2.3. KEGG functional analysis

A hierarchical clustering of the isolates was performed on the accessory genes annotated with the KEGG pathway (Figure 3). Almost 77% of the accessory genes were positively annotated with a KEGG ko number. These genes were divided into 23 functional KEGG pathways, the most important being “Protein families: signaling and cellular processes” (18% of the total annotated genes), “Unclassified: genetic information processing” (16%), “Membrane transport” (10%),

“Carbohydrate metabolism” (7%), “Protein families: genetic information processing” (7%), “Protein families: metabolism” (6%), and amino acid metabolism (6%). These results are in accordance with Vendramin et al. (2017), who performed a genome comparison of eight *Streptococcus thermophilus* strains of dairy origin isolated in Italy. They investigated the strain-specific features by assigning functional categories of the SEED subsystem to the gene content of the strains. Among the functional categories identified, four accounted for a large part of the strain diversity, including “amino acids and derivatives,” “carbohydrates,” “DNA metabolism,” and “membrane transport,” covering almost 50% of the specific genes. Although the annotations are different due to the databases used, their results are similar to the present study.





This hierarchical clustering (Figure 3) allowed an evaluation of the similarity between isolates based on the number of accessory genes associated with a functional KEGG pathway. Five groups were identified and are similar to those observed in the phylogenetic tree based on the pan-genome with a difference (Figure 2).

The first group is composed of isolates H23bM2, 19bM2, 19M1a, H26bM3, 26bM3, and CS1. The second group includes isolates H11M1c, 29bM1, H11M1a, 26bM1, H11bM2, and H11M1b. Isolates 21bM2, H14bM5, H26M3c, 29bM2, H20bM1, and CS3 formed the third group. Isolates H10bM5, H23bM1, CS4, and CS2 were clustered in the fourth group, and the fifth group consisted of isolates M134 and H11bM1.

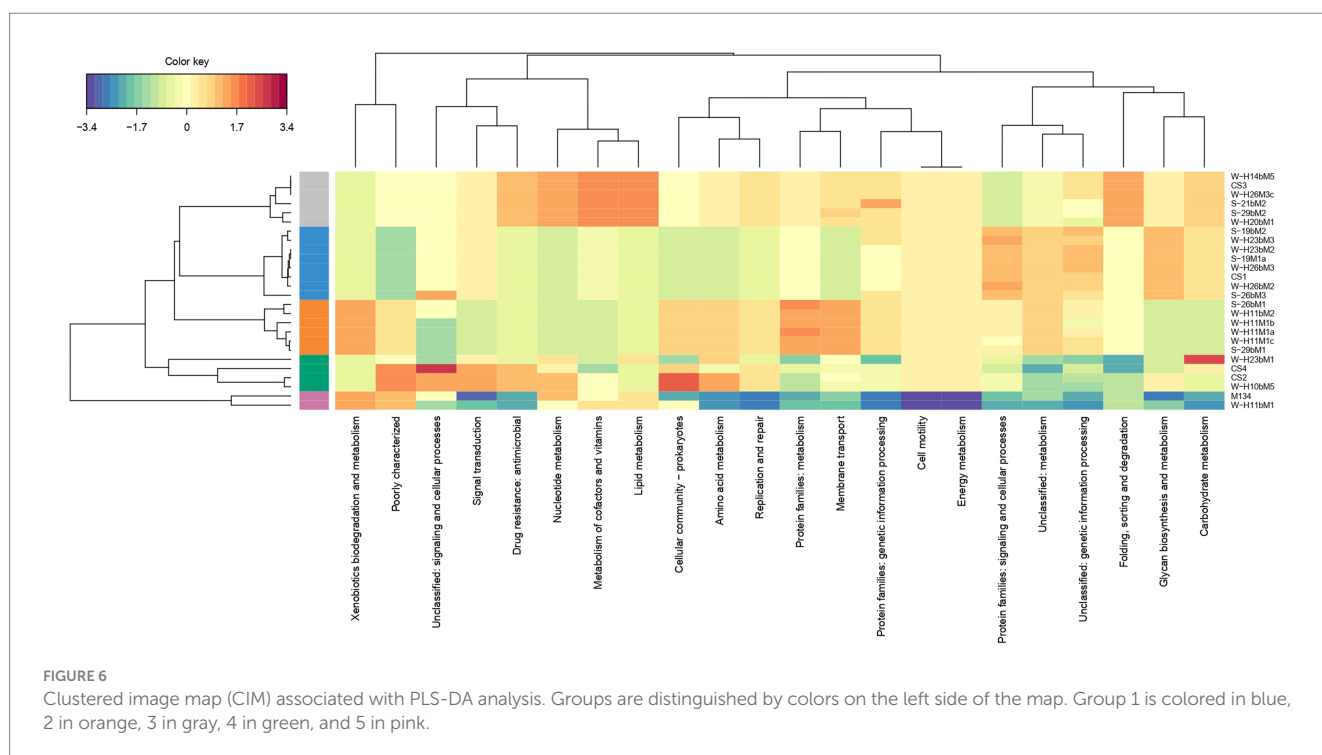
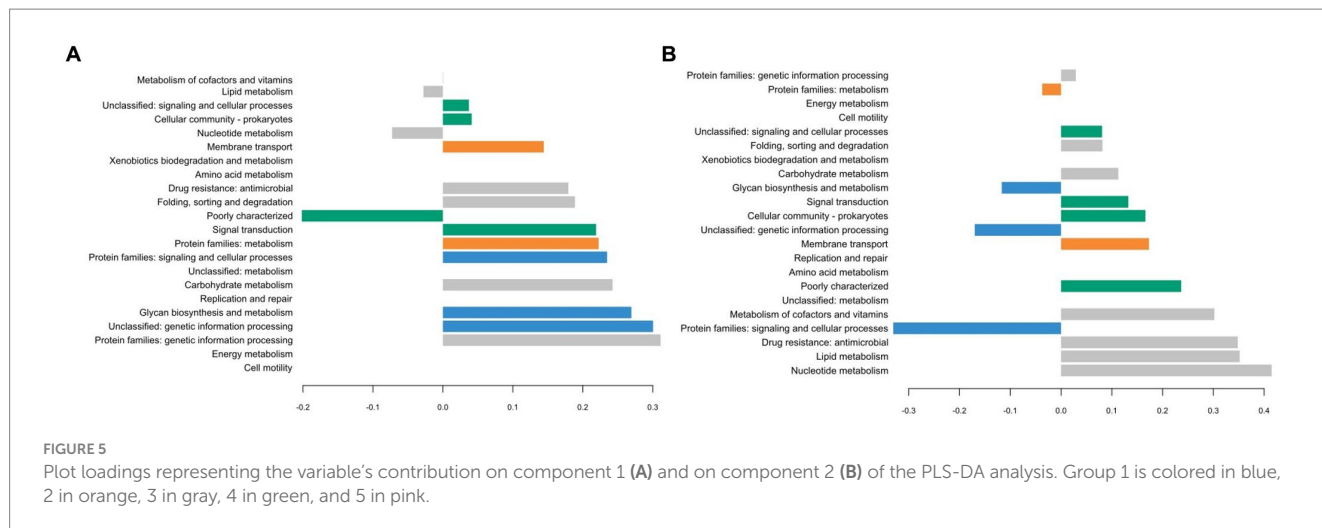
The different groups stand out for their functional KEGG class. A PLS-DA analysis was performed (Figure 4) to identify KEGG classes that differentiate isolates into these groups. PLS-DA results showed that the groups were easily recognized based on the accessory gene content of each KEGG class. These KEGG classes may be the indicators to distinguish these three clades. Figure 5 shows the variable's contribution from components 1 (A) and 2 (B) of the PLS-DA analysis, and Figure 6 represents the clustered image map (CIM) associated with it. These figures showed the functional KEGG pathways overrepresented in each of the clades that allowed their differentiation. Heatmaps, representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level), were constructed for each KEGG pathway identified as characteristic of a group (Supplementary Figures S1–S4).

The first group was characterized by three KEGG pathways, namely, "Protein families: signaling and cellular process," "Unclassified: genetic information processing," and "Glycan biosynthesis and metabolism." More accessory genes encoded for transposases and putative transposases were identified in the "Unclassified: genetic information processing" KEGG pathway for the first group in

comparison with others (Supplementary Figure S1). Transposases are typically present within bacterial genomes as small, mobile elements solely comprising their own transposition genes; they are important factors for horizontal gene transfer between strain genomes and are therefore important for the safety evaluation of strains for their use as starter cultures. However, many of the accessory genes of the first group, grouping in the "Protein families: signaling and cellular processes," were involved in the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas) proteins immune defense system in comparison to other groups (Supplementary Figure S2). It is now well known that the CRISPR/Cas system confers resistance against foreign genetic elements, such as phages (Bolotin et al., 2004; Mojica et al., 2005; Lillestøl et al., 2006). As phage infection of starters is the most common cause of incomplete fermentation in the dairy industry, such genes could represent a great advantage for the use of these isolates as starter cultures.

Then, the KEGG pathways "Protein families: metabolism" and "Membrane transport" allowed the differentiation of the second group, which might confer benefits to isolates during the manufacture of cheeses since accessory genes associated with these functional KEGG pathways encoded for dipeptidases (pepDA, pepDB; Supplementary Figure S3) and peptide transport systems (oligopeptide transport system Opp; Supplementary Figure S4), among other things, which are involved in proteolysis and thus are important for aromatic and textural properties of cheeses (Savijoki et al., 2006; Rodríguez-Serrano et al., 2018).

The third group stands out for the KEGG pathways "Protein families: genetic information processing," "Nucleotide metabolism," "Metabolism of cofactors and vitamins," "Drug resistance: antimicrobial," "Folding, sorting, and degradation," and important functional categories for cheese manufacturing, including "carbohydrate metabolism" and "Lipid metabolism." Carbohydrate



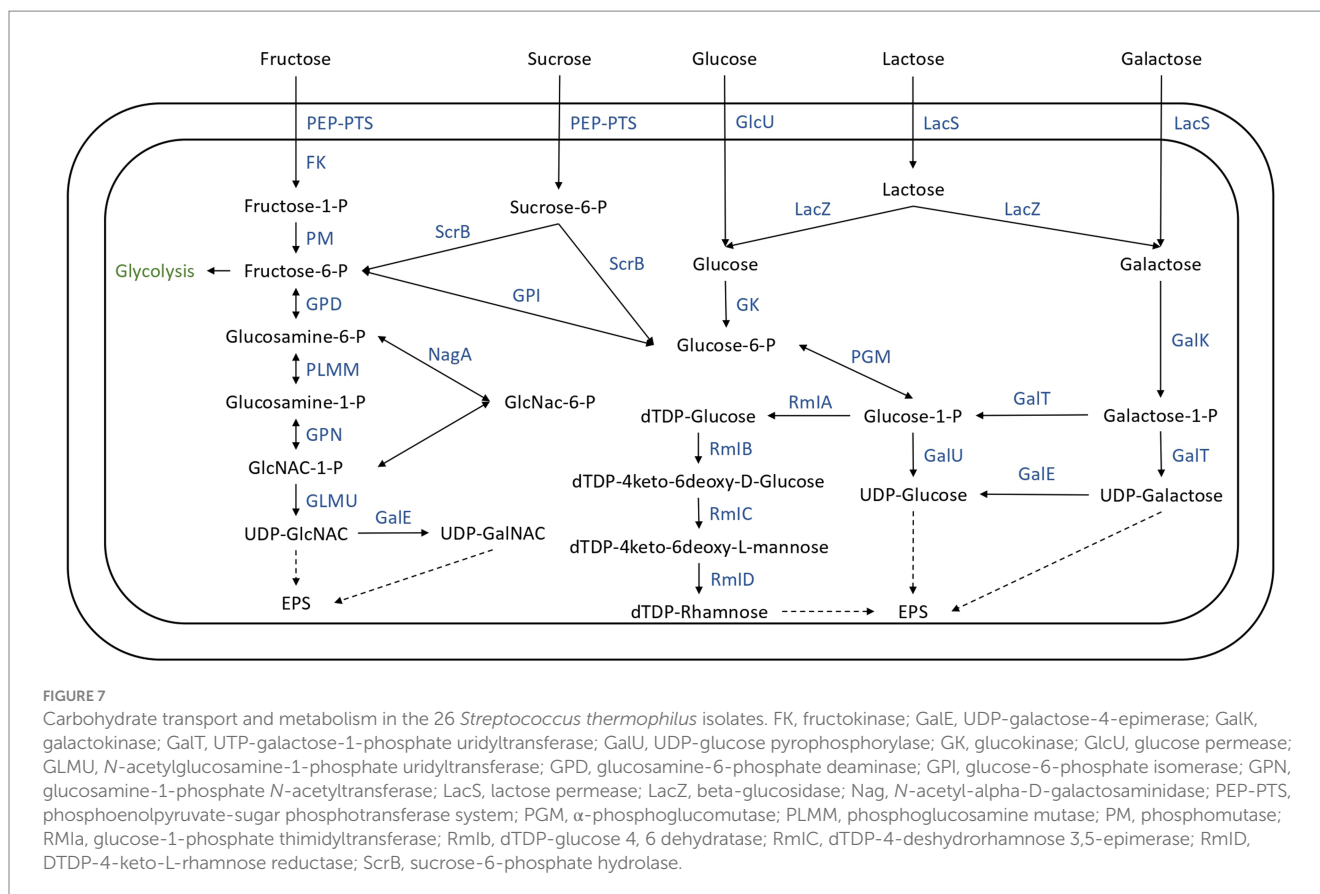
metabolism is the most important metabolism pathway for starter cultures because of their primary role in producing lactic acid from lactose (Hutkins and Goh, 2014). Lipid metabolism is also of high interest because lipolysis plays an essential role in the development of flavors in cheeses (McSweeney and Sousa, 2000).

The KEGG pathways “Cellular community: prokaryotes,” “Signal transduction,” and “Unclassified: signaling and cellular process” characterized the fourth group and might facilitate the survival of cells under stressful environmental conditions. These functional traits may be of great advantage as the manufacture of cheeses exposes starters to various environmental stresses such as low pH, osmotic stress, and high pressure (Zotta et al., 2008).

The PLS-DA analysis did not identify the characteristic KEGG functional class of the fifth group, probably due to their lower content of accessory genes in comparison with other isolates, with only 210

accessory genes for isolate M134 and 207 for isolate H11bM1. However, these isolates were distantly separated from commercial strains based on the phylogenetic reconstruction based on core genes (Figure 1) and on the clustering associated with the pan-genome (Figure 2), which could be an added value for potential use as autochthonous starter cultures to strengthen the typical characteristics of cheeses.

Interestingly, commercial strains CS1, CS2, and CS3 were not significantly distantly separated from the centroid of their respective clusters, unlike the CS4 strain (Figure 2), indicating that commercial strains are representative of *Streptococcus thermophilus* genetic diversity. According to the PLS-DA analysis (Figures 4–6), the main differences between CS4 and SN-isolates H10bM5 and CS2 were the number of genes implicated in several KEGG categories, including “Protein families: metabolism” and “Carbohydrate metabolism.” In



these categories, isolate CS4 had a higher number of accessory genes encoding dipeptidases (Supplementary Figure S3) and a higher content of accessory genes implicated in carbohydrate transport and metabolism (Supplementary Figure S5) than CS2 and H10bM5 isolates. However, these results focused only on accessory genes. To avoid this bias and study the carbohydrate metabolism of each isolate, a search for specific genes in their whole genomes was performed.

3.2.4. Carbohydrate metabolism and sugar transport system

The sugar utilization ability of *S. thermophilus* strains is of major importance in dairy fermentation as it directly affects the rate of milk acidification. Various studies suggest that the utilization of glucose, lactose, and fructose by *S. thermophilus* is consistently observed, whereas the utilization of sucrose, galactose, mannose, and maltose exhibits variable profiles (O'Leary and Woychik, 1976; Thomas et al., 2011; Erkus et al., 2014).

The lactose, glucose, galactose, sucrose, and fructose transport and utilization systems were analyzed in the genomes of the 22 SN-isolates and the 4 commercial strains (Figure 7), and the genes of each isolate implicated in these systems are listed in Supplementary Table S3.

Lactose represents the principal carbohydrate in milk and is the preferred carbon and energy source of *Streptococcus thermophilus* (Xiong et al., 2019), probably due to the adaptation of the species to the milk (Goh et al., 2011; Alexandraki et al., 2019). In this species, lactose transport and hydrolysis are controlled by the *lac* operon. It encodes a lactose permease (LacS) and a cytoplasmic β -galactosidase (LacZ) which cleave the lactose into glucose and galactose (Xiong

et al., 2019). The 26 genomes all harbored the LacZ and LacS genes (Figure 7; Supplementary Table S3). The resulting glucose moiety is phosphorylated to glucose-6-P by glucokinase and is further utilized through the glycolysis pathway (Figure 7). The Leloir pathway is the most common route for galactose utilization in *S. thermophilus*. Galactose is converted to glucose-1-phosphate by the galRKTEM gene cluster, which consists of the regulator GalR, galactokinase (GalK), galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GalT), UDP-glucose-4-epimerase (GalE), and galactosemutarotase (GalM; Xiong et al., 2019; Figure 7). However, most strains of *S. thermophilus* are unable to ferment galactose despite having intact galRKTEM gene clusters for the Leloir pathway (Vaughan et al., 2001; de Vin et al., 2005). The most probable explanation for this observed phenotype is a deficient promoter leading to insufficient transcription (Vaughan et al., 2001).

Gal-positive strains are of technological importance principally for their ability to completely ferment lactose, which results in a reduced amount of galactose being present, which cannot serve as a carbon source for spoilage or pathogenic bacteria (Hutkins and Morris, 1987).

The DNA fragments of the *galR-galK* intergenic region of the 26 isolates were picked out from their genome sequences (Supplementary Figure S6). Four different types of fragments were detected in the 26 genomes analyzed. Isolates 19M1a, H23bM2, 19bM2, 26bM3, H23bM3, H26bM2, H26bM3, and CS1 are type A; 21bM2, 29bM2, H20bM1, H26M3c, CS3, H14bM5, H10bM5, CS2, CS4, and H23bM1 are type B; H11M1a, H11M1b, H11M1c, 26bM1, 29bM1, and H11bM2 are type C; and isolates M134 and H11bM1 belong to type D.

It is now well documented that a single point of mutation with a G-to-A substitution in the -9 position of the -10 box in the *galk* promoter results in improved *galk*-promoter activity and could be responsible for the ability to ferment galactose (Vaughan et al., 2001; van den Bogaard et al., 2004; de Vin et al., 2005; Giarretta et al., 2018; Xiong et al., 2019). The presence of this mutation was examined in the 26 genomes studied here. Consequently, among the isolates, only M134 and H11bM1 appeared capable of galactose utilization as they owned the relevant mutation related to the Gal-positive phenotype. However, de Vin et al. (2005) and Hu et al. (2020) demonstrated that the gal promoter does not exclusively determine the gal-positive phenotype of *Streptococcus thermophilus* strains. Experimental verification is therefore required to validate this prediction.

The utilization of sucrose and fructose by *S. thermophilus* required a phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system (PEP-PTS), consisting of a PEP-dependent phosphotransferase (enzyme I, EI), a histidine-containing phosphocarrier protein (HPr), and a sugar-specific permease (enzyme II, EII). The 26 genomes investigated all harbored a PEP-dependent phosphotransferase and the HPr, as well as genes responsible for sucrose and fructose PTS transporter sugar-specific permease enzymes (Figure 7; Supplementary Table S3). Furthermore, genes responsible for sucrose and fructose utilization detailed in Figure 7 were detected in these genomes (Supplementary Table S3). However, experimental procedures are required to identify the ability of these isolates to ferment these carbohydrates.

3.3. Technological diversity

The acidifying abilities of 22 *Streptococcus thermophilus* isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area (SN-isolates) and 4 strains of *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial starter cultures were evaluated in model cheese curd. From the pH values obtained, ΔpH6h and ΔpH24h were calculated (Figure 8).

Half of the 22 SN-isolates lowered the pH by more than one pH unit after 6 h of fermentation, suggesting fast acidifying ability. As expected, all commercial strains presented fast acidifying abilities, which is one of the most important criteria for cheese manufacturing (Tidona et al., 2020).

Concerning the ability to reduce the pH of the model cheese curds at 24 h, the following three main groups of isolates were distinguished: (i) low acidifying isolates with a pH decrease below 1.30 pH units, including 32% of the SN-isolates (19bM2, H10bM5, H11M1b, H11M1c, H23bM2, H23bM3, and 29bM1); (ii) medium acidifying isolates, showing a pH decrease between 1.30 and 1.50 pH units, comprising 27% of total SN-isolates and 100% of the commercial strains (CS1, 19M1a, 21bM2, H11bM2, H14bM5, H26bM3, M134, CS3, CS4, and CS2); (iii) high acidifying isolates, causing a pH decrease higher than 1.50 pH units, regrouping 41% of the SN-isolates (H11M1a, H26bM2, H26M3c, 26bM1, 26bM3, 29bM2, H11bM1, H20bM1, and H23bM1). It could be noticed that SN-isolates from the same farms and SN-isolates from summer and winter milk are distributed into the three acidifying activity categories, and that the four commercial strains were clustered in the group of medium

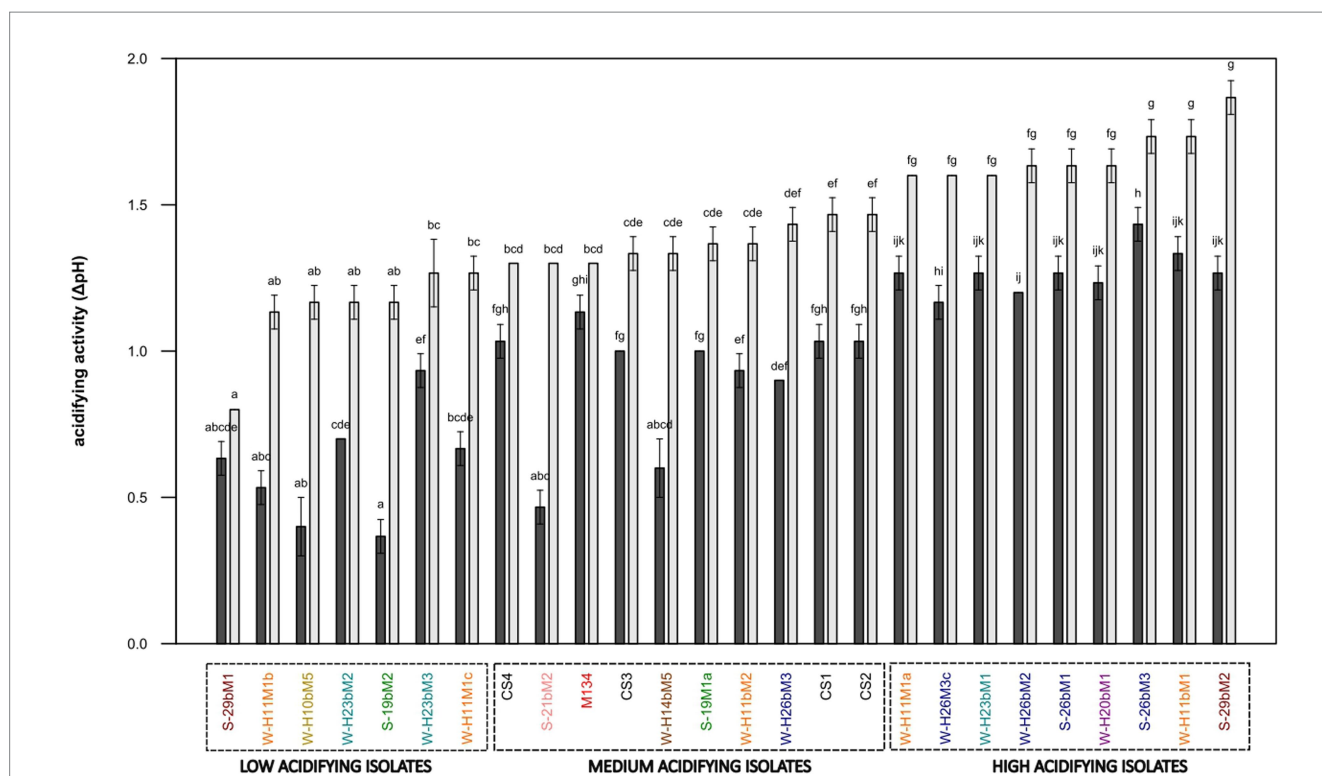


FIGURE 8
 Acidifying activity of *Streptococcus thermophilus* isolates (a–k): mean values of the same time of fermentation without a common superscript are significantly different ($p < 0.05$) according to the Conover-Iman test. Isolates from summer milks are annotated with an “S” and isolates from winter milks are annotated with a “W.” Isolate names with the same colors were isolated from the same farm.

acidifying activity, while the autochthonous SN-isolates showed various acidifying activities.

This clustering reveals a high variability in acidifying activity observed within *Streptococcus thermophilus* SN-isolates, suggesting that this feature is strain-dependent, in accordance with Giraffa et al. (2001). This diversity of acidifying activities of the SN-isolates does not depend on the season or the farms. In contrast, commercial strains showed homogeneous acidifying activity. This homogeneity is probably due to the specific selection of the strains based on their functional characteristics to be used as starter cultures (Gibbons and Rinker, 2015).

The proteolytic activities of the 22 SN-isolates and the 4 commercial strains of *Streptococcus thermophilus* were evaluated in a model cheese curd at 24h of fermentation, and the results are presented in Figure 9. The proteolytic activities of *Streptococcus thermophilus* SN-isolates and commercial strains varied slightly, from 0.046 to 0.077 mmol_{eqGlycine}·L⁻¹ for 29bM1 SN-isolates and CS2 commercial strains, respectively.

Galia et al. (2009) and Dandoy et al. (2011) have highlighted a link between high acidifying activities and the presence of an efficient proteolytic system, whereas our results showed low proteolytic activities and a limited diversity on this criteria in comparison with other studies on the characterization of *Streptococcus thermophilus* strains (Urshev et al., 2014; Hu et al., 2020; Tidona et al., 2020) or other species (Zaaraoui et al., 2021; Abarquero et al., 2022; Sugajski et al., 2022). These findings are in accordance with Harnett et al. (2022), who reported *Streptococcus thermophilus* as a LAB species

generally considered poorly proteolytic. To ensure sufficient proteolytic activity in dairy products, *Streptococcus thermophilus* is often associated with other species for the development of starter cultures, such as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The symbiotic growth of both species leads to proto-cooperation, inducing higher proteolytic and acidifying rates (Hervé-Jiménez, 2008).

In addition, a PLS-DA analysis was performed on the KEGG annotation of accessory genes with acidification groups (Supplementary Figure S7) and indicated that the KEGG annotations of accessory genes did not allow for distinguishing the acidification groups. The lack of diversity in proteolytic activities also indicates that no link could be found between these functional properties and groups obtained by hierarchical clustering based on the KEGG annotation of the accessory genes.

The literature does not often discuss the gene expression of LAB in relation to its acidifying capabilities. The variations in acidifying potential among different strains, besides the presence/absence of genes, could be due to differential expression of multiple genes related to metabolism. For instance, in a study conducted by Galia et al. (2016), two strains harboring the same allele of the prtS gene, encoding a cell-wall-anchored proteinase linked to fast acidifying capabilities, presented different acidification rates. The authors demonstrated that this difference could be due to the differential expression of several metabolic-related genes (prtS, codY, ilvE, livJ, and relA) during growth in milk, with an over-expression of these genes in the most acidifying strain compared to the other. They also reported that the transcriptional regulator CodY could also play an

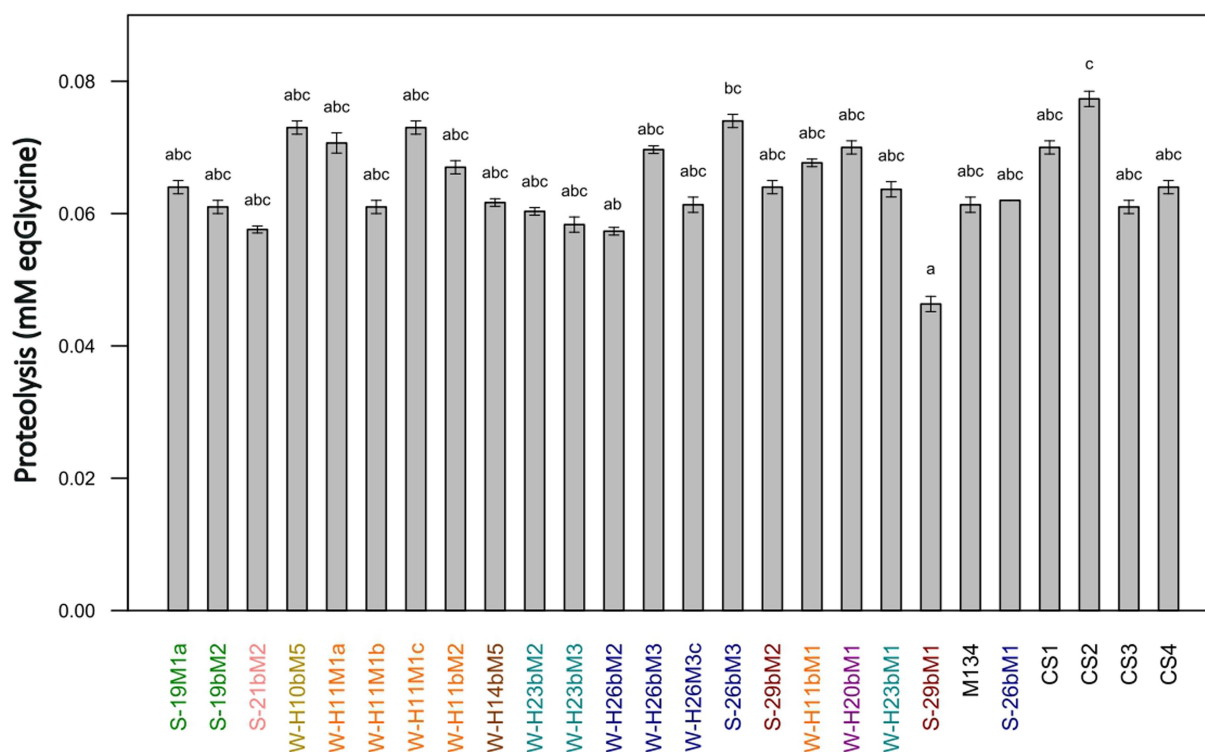


FIGURE 9

Proteolytic activities of *Streptococcus thermophilus* isolates (a–c): mean values without a common superscript are significantly different ($p < 0.05$) according to the Conover-Iman test. Isolates from summer milks are annotated with an "S" and isolates from winter milks are annotated with a "W." Isolate names with the same colors were isolated from the same farm.

important role in the acidifying capacity of *Streptococcus thermophilus* through the regulation of nitrogen and carbon metabolism. These conclusions support the results of Lu et al. (2015), who reported that CodY plays an important role in the regulation of cellular processes in *Streptococcus thermophilus* and showed that the global regulator CodY controlled amino acid metabolism and lactose utilization processes. To better understand the phenotype differences of our genetically closed isolates, a thorough study of the expression and regulation of genes involved in carbon and nitrogen metabolism should be conducted.

The lack of a link between the technological capacities and the presence/absence of the genes of the 26 isolates could also simply be due to the low number of studied isolates. Indeed, when it comes to analyzing correlations between phenotypic and genotypic traits of bacteria, the number of samples (or strains) sequenced plays a crucial role in the power to detect correlations. By increasing the number of samples, it would be possible to significantly improve the ability to identify statistically significant correlations.

4. Conclusion

Wild strains of *Streptococcus thermophilus* could represent a source of genetic and functional variability from which novel strains or properties might be selected for cheese production. This diversity exists within *Streptococcus thermophilus* isolated at the same location and is not dependent on the season of isolation. A specific technological characterization and safety evaluation of isolates should be carried out to validate the use of this diversity as an autochthonous starter culture.

Data availability statement

The data presented in this study are deposited in online repositories. Genomes can be found in the EBI repository under the project accession number PRJEB61322. All input and output files of the bioinformatic analysis are available at <https://doi.org/10.57745/MSGWXC>.

Author contributions

AG conceived the study, carried out experiments, analyzed the data, performed genome analysis, and wrote the manuscript. ST

conceived the study, performed genome analysis, analyzed the data, and participated in the writing of the manuscript. CCA designed the experiments and conceived the project. SH and ED-B supervised the experiments and provided guidance. PG conceived the project and supervised the study. PB and CCh conceived the project, participated in the writing of the manuscript, and supervised the study. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This study was funded by “Interprofession du Saint-Nectaire” and “Association Nationale Recherche Technologie” (convention CIFRE N° 2020/0839).

Acknowledgments

We thank Mathilde LACALMONTIE, Béatrice DESSERRE, and François ALLEGRETTI for their advice and technical assistance in microbiology.

Conflict of interest

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

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1245510/full#supplementary-material>

References

- Abarquero, D., Renes, E., Combarros-Fuertes, P., Fresno, J. M., and Tornadijo, M. E. (2022). Evaluation of technological properties and selection of wild lactic acid bacteria for starter culture development. *LWT* 171:114121. doi: 10.1016/j.lwt.2022.114121
- Ait Chait, Y., Gunenc, A., Hosseinian, F., and Bendali, F. (2021). Antipathogenic and probiotic potential of *Lactobacillus brevis* strains newly isolated from Algerian artisanal cheeses. *Folia Microbiol.* 66, 429–440. doi: 10.1007/s12223-021-00857-1
- Alexandraki, V., Kazou, M., Blom, J., Pot, B., Papadimitriou, K., and Tsakalidou, E. (2019). Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* support important traits concerning the evolution, biology and technological properties of the species. *Front. Microbiol.* 10:2916. doi: 10.3389/fmicb.2019.02916
- Andrighetto, C., Borney, F., Barmaz, A., Stefanon, B., and Lombardi, A. (2002). Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *Int. Dairy J.* 12, 141–144. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00134-0
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Kulakauskas, S., et al. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1554–1558. doi: 10.1038/nbt1034

- Callon, C., Arliguie, C., and Montel, M.-C. (2016). Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. *Food Microbiol.* 53, 63–70. doi: 10.1016/j.fm.2015.08.009
- Callon, C., Millet, L., and Montel, M.-C. (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy Res.* 71, 231–244. doi: 10.1017/S0022029904000159
- Campagnollo, F. B., Margalho, L. P., Kamimura, B. A., Feliciano, M. D., Freire, L., Lopes, L. S., et al. (2018). Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. *Food Microbiol.* 73, 288–297. doi: 10.1016/j.fm.2018.02.006
- Cantu, V. A., Sadural, J., and Edwards, R. (2019). PRINSEQ++, a multi-threaded tool for fast and efficient quality control and preprocessing of sequencing datasets. *PeerJ* 7:e27553v1. doi: 10.7287/peerj.preprints.27553v1
- Carafa, I., Nardin, T., Larcher, R., Viola, R., Tuohy, K., and Franciosi, E. (2015). Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented mountain cheese. *Food Microbiol.* 48, 123–132. doi: 10.1016/j.fm.2014.12.003
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., and Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66, 1219–1227. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2
- Dandoy, D., Fremaux, C., Henry de Frahan, M., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., et al. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb. Cell Fact.* 10:S21. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S21
- Daughtry, K. V., Johanningsmeier, S. D., Sanozky-Dawes, R., Klaenhammer, T. R., and Barrangou, R. (2018). Phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus buchneri* strains isolated from spoiled, fermented cucumber. *Int. J. Food Microbiol.* 280, 46–56. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.044
- de Vin, F., Rådström, P., Herman, L., and De Vuyst, L. (2005). Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy *Streptococcus thermophilus* strains reveals four different fermentation profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3659–3667. doi: 10.1128/AEM.71.7.3659-3667.2005
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 274–277. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.014
- Erkus, O., Okuklu, B., Yenidunya, A. F., and Harsa, S. (2014). High genetic and phenotypic variability of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from artisanal Yuruk yogurts. *LWT* 58, 348–354. doi: 10.1016/j.lwt.2013.03.007
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H. E., Glaser, P., and Vallaeys, T. (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *J. Appl. Microbiol.* 97, 546–556. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02333
- Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72, 1379–1400. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8
- Frau, F., Nuñez, M., Gerez, L., Pece, N., and Font, G. (2016). Development of an autochthonous starter culture for spreadable goat cheese. *Food Sci. Technol.* 36, 622–630. doi: 10.1590/1678-457X.08616
- Fusco, V., Quero, G. M., Poltronieri, P., Morea, M., and Baruzzi, F. (2019). Autochthonous and probiotic lactic acid Bacteria employed for production of "advanced traditional cheeses". *Foods* 8:412. doi: 10.3390/foods8090412
- Galia, W., Jameh, N., Perrin, C., Genay, M., and Dary-Mourot, A. (2016). Acquisition of PrtS in *Streptococcus thermophilus* is not enough in certain strains to achieve rapid milk acidification. *Dairy Sci. Technol.* 96, 623–636. doi: 10.1007/s13594-016-0292-3
- Galia, W., Perrin, C., Genay, M., and Dary, A. (2009). Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *Int. Dairy J.* 19, 89–95. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.08.004
- Giarretta, S., Treu, L., Vendramin, V., da Silva Duarte, V., Tarrach, A., Campanaro, S., et al. (2018). Comparative transcriptomic analysis of *Streptococcus thermophilus* TH1436 and TH1477 showing different capability in the use of galactose. *Front. Microbiol.* 9:1765. doi: 10.3389/fmicb.2018.01765
- Gibbons, J. G., and Rinker, D. C. (2015). The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 35, 1–8. doi: 10.1016/j.gde.2015.07.003
- Giraffa, G., Paris, A., Valcavi, L., Gatti, M., and Neviani, E. (2001). Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *J. Appl. Microbiol.* 91, 937–943. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01464.x
- Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., and Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb. Cell Fact.* 10:S22. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S22
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., and de Melo Franco, B. D. G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid Bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, salmonella typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Front. Microbiol.* 7:863. doi: 10.3389/fmicb.2016.00863
- Hadfield, J., Croucher, N. J., Goater, R. J., Abudahab, K., Aanensen, D. M., and Harris, S. R. (2018). Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics* 34, 292–293. doi: 10.1093/bioinformatics/btx610
- Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 119–131. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00238-6
- Harnett, J., Patrick, A., Caddick, C., Pearce, L., and Davey, G. (2022). "Lactic acid Bacteria: *Streptococcus thermophilus*★" in *Encyclopedia of dairy sciences*. eds. P. L. H. McSweeney and J. P. McNamara. 3rd ed (Oxford: Academic Press), 256–262.
- Hervé-Jiménez, L. (2008). Post-genomic analysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* cooperative growth in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2062. doi: 10.1128/AEM.01984-08
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 435–463. doi: 10.1016/j.fmmr.2005.04.008
- Hu, T., Cui, Y., Zhang, Y., Qu, X., and Zhao, C. (2020). Genome analysis and physiological characterization of four *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Chinese traditional fermented milk. *Front. Microbiol.* 11:184. doi: 10.3389/fmicb.2020.00184
- Huang, L., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Renye, J. A. Jr., Yang, P., Huang, Z., et al. (2021). Partial characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Chinese dairy products. *Int. J. Food Prop.* 24, 446–456. doi: 10.1080/10942912.2021.1900233
- Hutkins, R., and Goh, Y. J. (2014). *Streptococcus: Streptococcus thermophilus* In *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* (Elsevier Inc.), 554–559.
- Hutkins, R. W., and Morris, H. A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. *J. Food Prot.* 50, 876–884. doi: 10.4315/0362-028X-50.10.876
- Iyer, R., Tomar, S. K., Uma Maheswari, T., and Singh, R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: multifunctional lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 20, 133–141. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.10.005
- Kanehisa, M. (2019). Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci.* 28, 1947–1951. doi: 10.1002/pro.3715
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Kawashima, M., and Ishiguro-Watanabe, M. (2023). KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res.* 51, D587–D592. doi: 10.1093/nar/gkac963
- Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
- Katoh, K., and Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010
- Lillestøl, R., Redder, P., Garrett, R. A., and Brügger, K. (2006). A putative viral defense mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2, 59–72. doi: 10.1155/2006/542818
- Lu, W. W., Wang, Y., Wang, T., and Kong, J. (2015). The global regulator CodY in *Streptococcus thermophilus* controls the metabolic network for escalating growth in the milk environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2349–2358. doi: 10.1128/AEM.03361-14
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15611–15616. doi: 10.1073/pnas.0607117103
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- McSweeney, P. L. H., and Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80, 293–324. doi: 10.1051/lait:2000127
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3
- Morandi, S., and Brasca, M. (2012). Safety aspects, genetic diversity and technological characterisation of wild-type *Streptococcus thermophilus* strains isolated from north Italian traditional cheeses. *Food Control* 23, 203–209. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.07.011
- Munekata, P. E. S., Chaves-Lopez, C., Fernandez-Lopez, J., Viuda-Martos, M., Sayas-Barbera, M. E., Perez-Alvarez, J. A., et al. (2022). Autochthonous starter cultures in cheese production – a review. *Food Rev. Intl.* 39, 5886–5904. doi: 10.1080/87559129.2022.2097691
- Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Ovchinnikova, E. G., and Krayushkina, V. N. (2021). Express method for assessing proteolysis in cheese and aromatic additives with cheese flavor. *Food Syst* 3, 4–10. doi: 10.21323/2618-9771-2020-3-4-4-10
- O'Leary, V. S., and Woychik, J. H. (1976). Utilization of lactose, glucose, and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in Milk treated with lactase enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 89–94. doi: 10.1128/aem.32.1.89-94.1976
- Özkan, E. R., Demirci, T., Öztürk, H. İ., and Akin, N. (2021). Screening *Lactobacillus* strains from artisanal Turkish goatskin casing Tulum cheeses produced by nomads via molecular and in vitro probiotic characteristics. *J. Sci. Food Agric.* 101, 2799–2808. doi: 10.1002/jsfa.10909

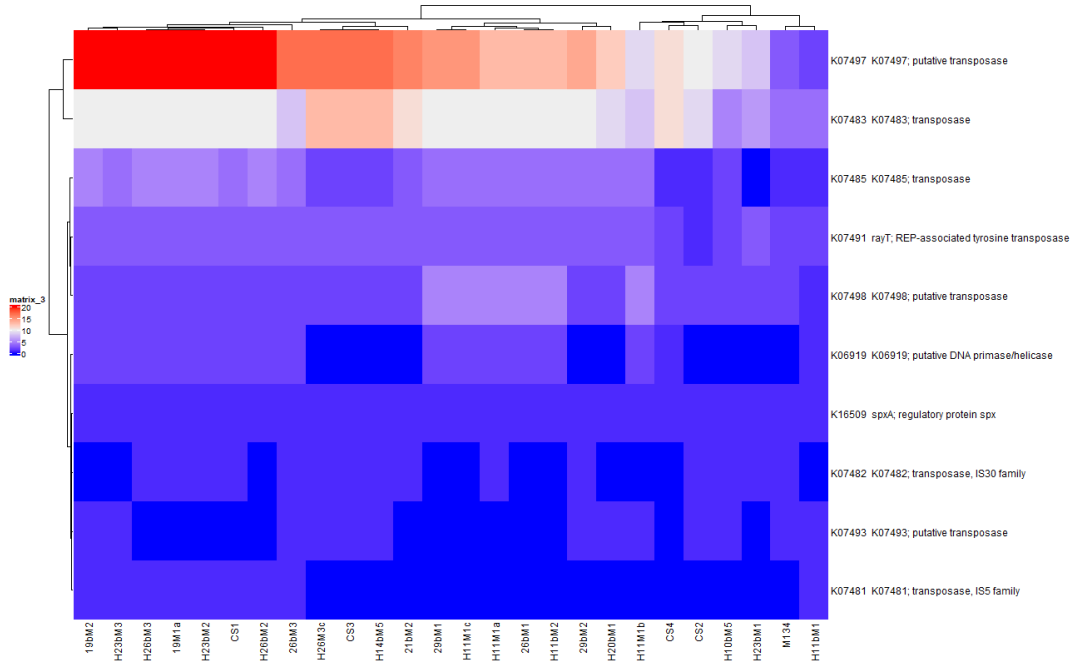
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., et al. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421
- Rakhmanova, A., Khan, Z. A., and Shah, K. (2018). A mini review fermentation and preservation: role of lactic acid Bacteria. *MOJFPT* 6, 414–417. doi: 10.15406/mojfpt.2018.06.00197
- Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, J. M., Cruz-Guerrero, A. E., Gomez-Ruiz, L., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., et al. (2018). Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 1581–1588. doi: 10.4014/jmb.1807.07017
- Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 394–406. doi: 10.1007/s00253-006-0427-1
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., and Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics* 7:000685. doi: 10.1099/mgen.0.000685
- Settanni, L., and Moschetti, G. (2014). New trends in technology and identity of traditional dairy and fermented meat production processes: preservation of typicality and hygiene. *Trends Food Sci. Technol.* 37, 51–58. doi: 10.1016/j.tifs.2014.02.006
- Smit, G., Smit, B. A., and Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 591–610. doi: 10.1016/j.femsre.2005.04.002
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., and Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4:vey016. doi: 10.1093/ve/vey016
- Sugajski, M., Maślak, E., Zloch, M., Rafińska, K., Pomastowski, P., Białczak, D., et al. (2022). New sources of lactic acid bacteria with potential antibacterial properties. *Arch. Microbiol.* 204:349. doi: 10.1007/s00203-022-02956-0
- Terzić-Vidojević, A., Tonković, K., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Strahinić, I., Kojić, M., et al. (2015). Evaluation of autochthonous lactic acid bacteria as starter cultures for production of white pickled and fresh soft cheeses. *LWT* 63, 298–306. doi: 10.1016/j.lwt.2015.03.050
- The Galaxy Community (2022). The galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* 50, W345–W351. doi: 10.1093/nar/gkac247
- Thomas, M., Wrzosek, L., Ben-Yahia, L., Noordine, M.-L., Gitton, C., Chevret, D., et al. (2011). Carbohydrate metabolism is essential for the colonization of *Streptococcus thermophilus* in the digestive tract of Gnotobiotic rats. *PLoS One* 6:e28789. doi: 10.1371/journal.pone.0028789
- Tidona, F., Francolino, S., Ghiglietti, R., Locci, F., Carminati, D., Laforce, P., et al. (2020). Characterization and pre-industrial validation of *Streptococcus thermophilus* strains to be used as starter cultures for Crescenza, an Italian soft cheese. *Food Microbiol.* 92:103599. doi: 10.1016/j.fm.2020.103599
- Treangen, T. J., Ondov, B. D., Koren, S., and Phillippy, A. M. (2014). The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* 15:524. doi: 10.1186/s13059-014-0524-x
- Urshev, Z., Ninova-Nikolova, N., Ishlimova, D., Pashova-Baltova, K., Michaylova, M., and Savova, T. (2014). Selection and characterization of naturally occurring high acidification rate *Streptococcus thermophilus* strains. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 28, 899–903. doi: 10.1080/13102818.2014.966233
- van den Bogaard, P. T. C., Hols, P., Kuipers, O. P., Kleerebezem, M., and de Vos, W. M. (2004). Sugar utilisation and conservation of the gal-lac gene cluster in *Streptococcus thermophilus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 10–17. doi: 10.1078/0723-2020-00258
- Vaughan, E. E., van den Bogaard, P. T. C., Catzeddu, P., Kuipers, O. P., and de Vos, W. M. (2001). Activation of silent gal genes in the lac-gal regulon of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 183, 1184–1194. doi: 10.1128/jb.183.4.1184-1194.2001
- Vendramin, V., Treu, L., Campanaro, S., Lombardi, A., Corich, V., and Giacomini, A. (2017). Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food Microbiol.* 63, 47–57. doi: 10.1016/j.fm.2016.11.002
- Xiong, Z.-Q., Kong, L.-H., Meng, H.-L., Cui, J.-M., Xia, Y.-J., Wang, S.-J., et al. (2019). Comparison of gal-lac operons in wild-type galactose-positive and -negative *Streptococcus thermophilus* by genomics and transcription analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 46, 751–758. doi: 10.1007/s10295-019-02145-x
- Zaaraoui, L., Bouksaim, A., Elhamdani, M., Benali, A., Oukassou, M., Ounine, K., et al. (2021). Typical Moroccan goat lactic acid Bacteria and their assay as starters. *Nova Biotec Chim.* 20:e958. doi: 10.36547/nbc.958
- Zotta, T., Ricciardi, A., Ciocia, F., Rossano, R., and Parente, E. (2008). Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 34–42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.024

Diversité de souches sauvages de *S. thermophilus*

Supplementary Table S2: Municipalities comprised in the Saint-Nectaire cheese PDO area

Cantal department				
Allanche	Beaulieu	Champs-sur-Tarentaine-Marchal	Chanterelle	Condat
Landeyrat	Lanobre	Lugarde	Marcenat	Marchastel
Montboudif	Montgreleix	Pradiers	Saint-Amandin	Saint-Bonnet-de- Condat
Saint-Saturnin	Ségur-les-Villas	Trémouille	Vernols	
Puy-de-Dôme department				
Anzat-le-Luguet	Ardes	Aurières	Aydat	Bagnols
Besse-et-Saint-Anastaise	Chambon-sur-Lac	Chassagne	Chastreix	Compains
Courgoul	Cournols	Creste	Cros	Dauzat-sur-Vodable
Egliseneuve-d'Entraigues	Espinchal	Grandeyrolles	LaBourboule	La Chapelle-Marcousse
La Godivelle	La Tour-d'Auvergne	Labessette	Larodde	Le Vernet-Sainte-Marguerite
Mazoirs	Montaigut-le-Blanc	Mont-Dore	Murat-le-Quaire	Murol
Olloux	Orcival	Picherande	Rentières	Roche-Charles-la-Mayrand
Saint-Alyre-ès-Montagne	Saint-Diéry	Saint-Donat	Saint-Genès-Champespe	Saint-Nectaire
Saint-Pierre-Colamine	Saint-Victor-la-Rivière			

Figure S1 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the “Unclassified: genetic information processing” KEGG pathway.



Diversité de souches sauvages de *S. thermophilus*

Figure S2 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the “Protein families: signaling and cellular processes” KEGG pathway.

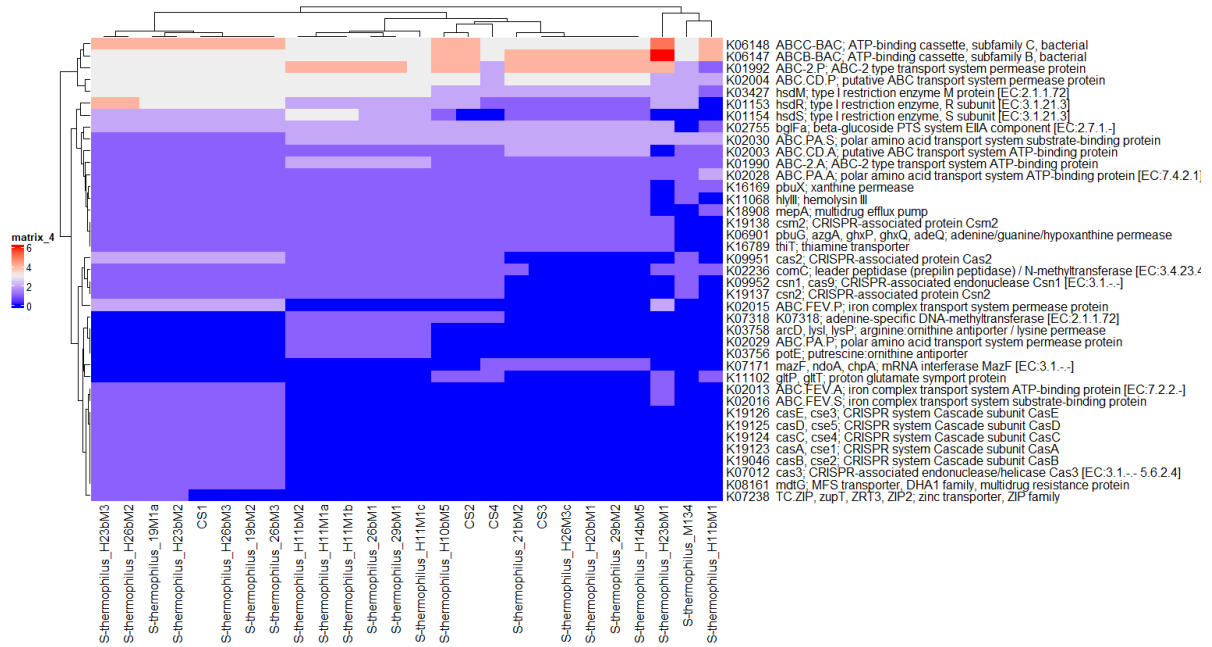


Figure S3 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the “Protein families: metabolism” KEGG pathway.

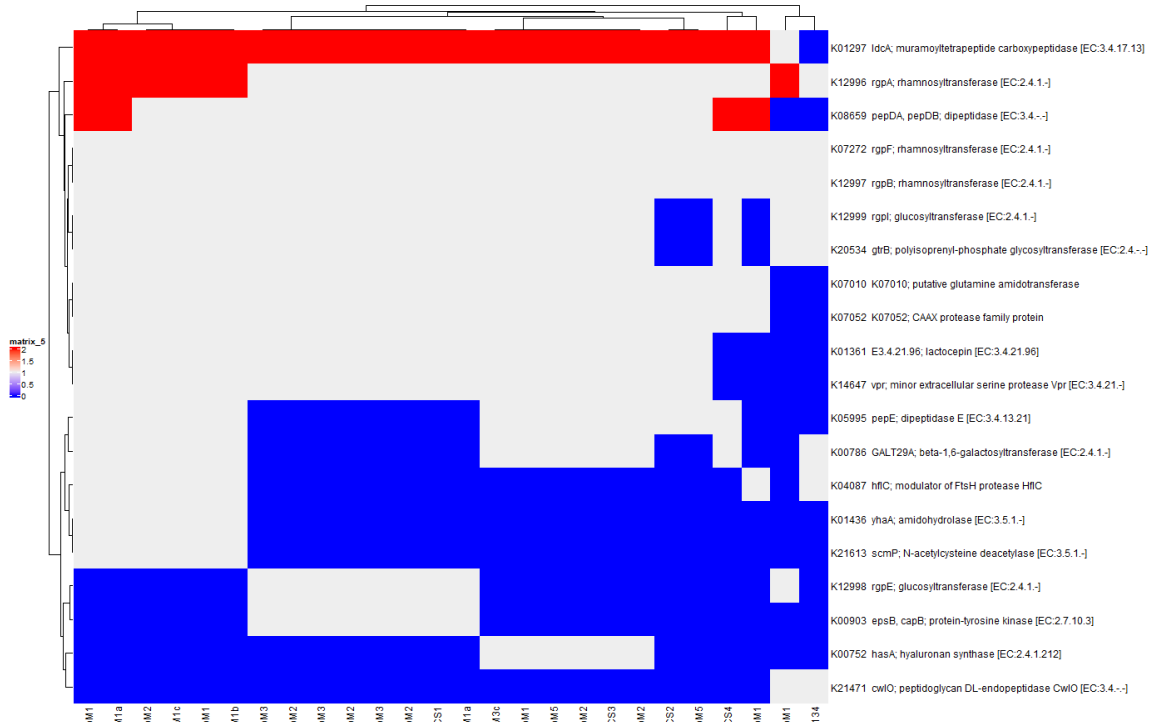
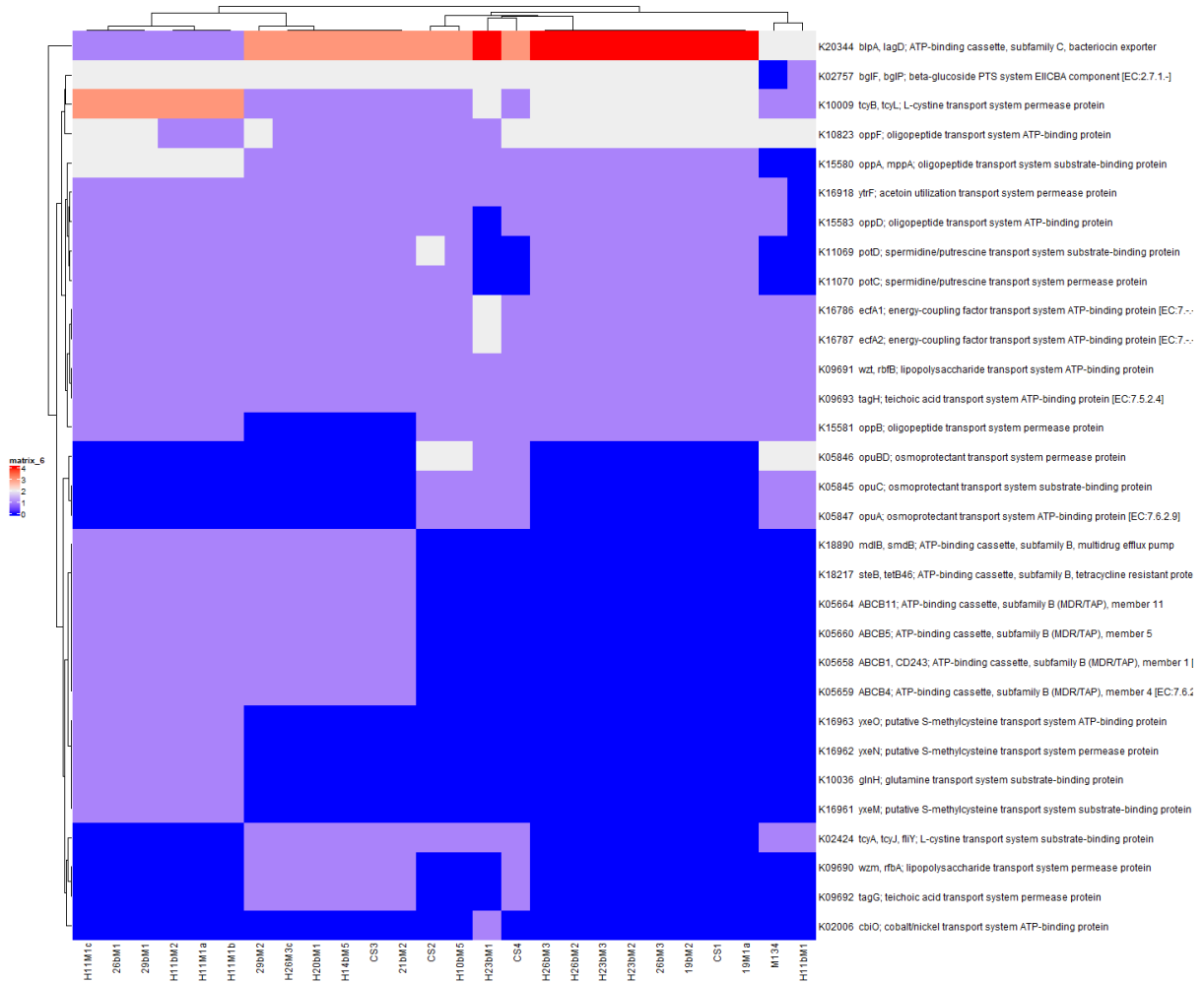


Figure S4 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the “Membrane transport” KEGG pathway.



Diversité de souches sauvages de *S. thermophilus*

Figure S5 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the “Carbohydrate metabolism” KEGG pathway.

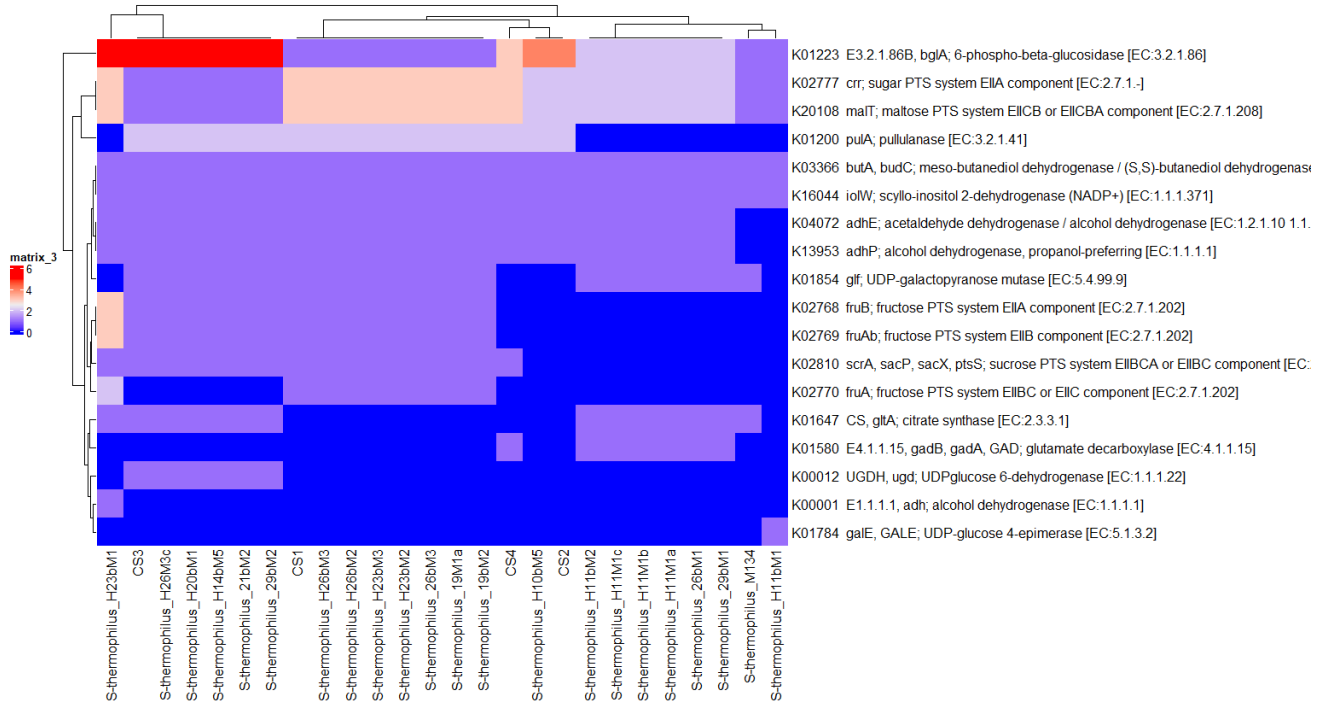


Figure S6 Alignment of the four different nucleotide sequences as found in the galR-galk intergenic region of the 26 isolates. The intergenic region contains the promoter sequences for the galR and the gal genes. The -10 and -35 regions are underlined, and the transcriptional start sites are indicated at +1

```

← galR
TypeA agtatcctcctcatatcttcagataacataactttta-tttttacctatattttact-a
TypeB agtatcctcctcatatcttcagataacataactttattttttacctatattttact-a
TypeC agtatcctcctcatatcttcagataacataactttattttttacctatattttactaa
TypeD agtatcctcctcgcgatatcttcagataacataacttttc- tttttacctatattttact-a
*****+1*****-10*****-35*****

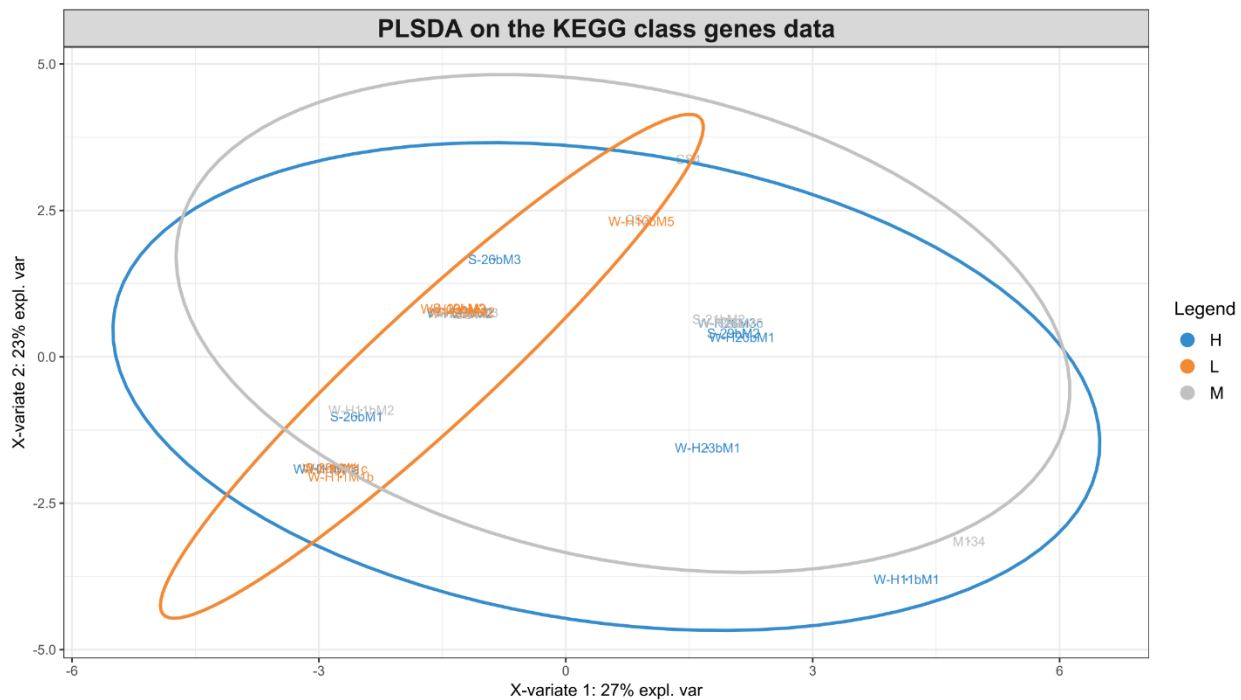
TypeA aaaaaatagtaaaaaatattgattttccatgtgaaaggggttacgatttcagtataaaca
TypeB aaaaaatagtaaaaaatattgattttccatgtgaaaggggttacgatttcagtataaaca
TypeC aaaaaatagtaaaaaatattgattttccatgtgaaaggggttacgatttcagtataaaca
TypeD aaaaaatagtaaaagtattgattttccatgtgaaagggattacagatttcagtgtaaaca
*****-35*****-10*****+1*****

TypeA aaagaataagtgagatacatcct
TypeB aaagaataagtgagatacatcct
TypeC aaagaataagtgagatacatcct
TypeD aaagaataagtgagatacagcct
*****
galk →

```

Diversité de souches sauvages de *S. thermophilus*

Figure S7 Sample plots from the PLS-DA analysis performed on accessory gene numbers of the KEGG class for high acidifying (blue), medium acidifying (grey) and low acidifying (orange) isolates.



*IV - Diversité de souches locales de
Lactobacillus delbrueckii*

IV.1. Etude de la diversité de *Lactobacillus delbrueckii*

IV.1.A. Stratégie expérimentale et principaux résultats

Dans le chapitre précédent, une démarche d'analyse de la diversité génomique a été mise en place et indiquait une forte variabilité génomique et technologique de souches sauvages de *Streptococcus thermophilus* isolées de la zone de production Saint-Nectaire. Cette démarche peut être utilisée pour d'autres espèces bactériennes, dont *Lactobacillus delbrueckii*, la seconde espèce constituant le ferment autochtone développé dans ce projet.

Ce chapitre présente la deuxième publication du projet, et visait à étudier la diversité génomique et technologique de souches de *Lactobacillus delbrueckii* isolées de la zone AOP Saint-Nectaire. L'objectif de l'étude était i) d'étudier la diversité isolée de la zone pour favoriser la typicité des produits locaux, ii) d'identifier les souches possédant les activités protéolytiques les plus prometteuses et iii) de valider la démarche de valorisation de la diversité basée sur l'analyse génomique comparative.

Les souches de *Lactobacillus delbrueckii* ont été isolées à partir de laits crus collectés sur plusieurs fermes localisées sur la zone d'appellation. Une souche par ferme a été conservée pour l'analyse de diversité génomique et technologique. Chacune des souches a été identifiée comme appartenant à la sous espèce subsp. *lactis*. Une forte homogénéité a été constatée au sein des souches locales selon les analyses portant sur le core-génome et sur le pan-génome. Des génomes de références publiques d'origines diverses avaient donc été intégrés à l'étude pour déterminer la diversité au sein de la sous-espèce en général. La sous-espèce *L. delbrueckii* subsp. *lactis* présentait une forte hétérogénéité dans sa globalité. Bien qu'une importante homogénéité caractérisait les souches locales, celles-ci se différençaient tout de même des génomes de référence, indiquant une typicité spécifique au terroir Saint-Nectaire.

L'analyse fonctionnelle des gènes accessoires indiquait que les souches locales étaient caractérisées par un plus grand nombre de gènes impliqués dans des fonctions métaboliques clés en transformation fromagère (métabolisme des glucides, lipides et protéines). L'identification de gènes impliqués dans la protéolyse indiquait que la plupart des souches locales possédaient de nombreux gènes responsables du transport des peptides et du métabolisme des protéines. Les souches locales semblaient également posséder plus de gènes impliqués dans le métabolisme du lactose, glucose et galactose que les génomes de références inclus dans l'étude.

La production de composés aromatiques volatils par les souches sauvages avait également été étudiée et comparée à des souches commerciales. Les souches locales se différençaient les unes des autres sur ce critère, et d'importants composés identifiés comme contribuant aux saveurs des fromages étaient produits par ces souches. Les activités protéolytiques étaient en accord avec les analyses génomiques et semblaient intéressantes en comparaison avec un ferment commercial de référence.

Finalement, bien qu'une faible hétérogénéité ait été observée au sein des souches sauvages de *Lactobacillus delbrueckii*, leur différenciation face aux génomes de référence indiquait une typicité importante, qui, en complément de leurs caractéristiques technologiques, pourrait être valorisable dans le cadre d'un ferment autochtone. La démarche d'analyse de la diversité génomique pour l'étude du potentiel « ferment » de souches apparaît donc comme une stratégie de caractérisation et de sélection efficace et applicable à toutes les espèces bactériennes.

IV.2. Article 2 - Genetic and technological characterization of wild *Lactobacillus delbrueckii* strains reveals low diversity but strong typicity

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un deuxième article "Genomic characterization of wild *Lactobacillus delbrueckii* strains reveals low diversity but strong typicity" publié dans « MDPI – Microorganisms ». L'article a été soumis en Janvier 2024 et accepté en Février 2024. Lien d'accès : <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030512>.



Article

Genomic Characterization of Wild *Lactobacillus delbrueckii* Strains Reveals Low Diversity but Strong Typicity

Anna Grizon ¹, Sébastien Theil ¹, Sandra Helinck ², Pauline Gerber ³, Pascal Bonnarne ^{2,*} and Christophe Chassard ^{1,*}

¹ UMR 0545 Fromage, INRAE, VetAgro Sup, Université Clermont Auvergne, 20 Côte de Reyne, F-15000 Aurillac, France; anna.grizon@inrae.fr (A.G.); sebastien.theil@inrae.fr (S.T.)

² UMR SayFood, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, F-91120 Palaiseau, France; sandra.helinck@inrae.fr

³ Pôle Fromager AOP Massif Central, F-15000 Aurillac, France; pauline.gerber@pole-fromager-aop-mc.fr

* Correspondence: pascal.bonnarme@inrae.fr (P.B.); christophe.chassard@inrae.fr (C.C.)

Abstract: Investigating the diversity of a given species could give clues for the development of autochthonous starter cultures. However, few studies have focused on the intraspecies diversity of *Lactobacillus delbrueckii* strains, a technologically important lactic acid bacterium for the dairy industry. For this reason, *Lactobacillus delbrueckii* strains from the Saint-Nectaire Protected Designation of Origin (PDO) area were isolated and characterized. Genetic diversity was determined based on core genome phylogenetic reconstruction and pangenome analysis, while phenotypic assessments encompassed proteolysis and volatile compound production potential. A total of 15 *L. delbrueckii* ssp. *lactis* unique new strains were obtained. The genetic analysis and further proteolytic activities measurement revealed low variability among these Saint-Nectaire strains, while substantial genetic variability was observed within the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* subspecies as a whole. The volatile compound profiles slightly differed among strains, and some strains produced volatile compounds that could be of particular interest for cheese flavor development. While the genetic diversity among Saint-Nectaire strains was relatively modest compared to overall subspecies diversity, their distinct characteristics and pronounced differentiation from publicly available genomes position them as promising candidates for developing autochthonous starter cultures for cheese production.

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii*; intraspecies diversity; autochthonous starter culture; genetic diversity; volatile compounds production



Citation: Grizon, A.; Theil, S.; Helinck, S.; Gerber, P.; Bonnarne, P.; Chassard, C. Genomic Characterization of Wild *Lactobacillus delbrueckii* Strains Reveals Low Diversity but Strong Typicity. *Microorganisms* **2024**, *12*, 512. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030512>

Academic Editors: Pedro Rodríguez-López and Aleksandra Maria Kocot

Received: 29 January 2024

Revised: 29 February 2024

Accepted: 1 March 2024

Published: 2 March 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Lactobacillus delbrueckii, a thermophilic lactic acid bacterium (LAB), occupies a significant place in the dairy fermentation industry. Among the six *Lactobacillus delbrueckii* subspecies, the two ssp. *bulgaricus* and ssp. *lactis* are widely used for their pivotal role in yogurt and cheese production, respectively. Despite its industrial importance, there is a lack of comprehensive studies addressing the genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii*, especially its wild strains. Current research predominantly focuses on the subspecies *bulgaricus*, for which a rich diversity was reported in some studies but with strong environmental influences on strain distribution [1,2]. To date, few studies focus on ssp. *lactis*. Giraffa et al. [3] studied the phenotypic and genotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *lactis* starter strains, employing assays for acidifying and peptidase activities alongside RAPD-PCR and PFGE techniques. Their findings highlighted significant strain heterogeneity linked to isolation sources and periods.

In recent years, there has been a growing interest in developing autochthonous starter cultures for cheese manufacturing. It has been reported that such starters could preserve typical sensory properties of cheeses. Unlike commercial starters, these autochthonous

cultures maintain the authentic flavors and aromas that define regional or traditional varieties, thereby safeguarding the identity and geographical indications of these cheeses [4–6]. Some studies also indicate that autochthonous starter cultures could exhibit favorable safety attributes, with the control of potentially harmful compounds production or their probiotic potential [7–10]. Developing new local microbial cultures also further contributes to sustainability and resilience of local dairy industries by strengthening food sovereignty and autonomy.

In this context, exploring intraspecies diversity appears to be an effective method for selecting strains with important technological characteristics and typicity signatures associated with a specific terroir [11]. The present study explores the genetic and functional diversity of wild strains of *Lactobacillus delbrueckii*. This diversity was explored in the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area, one of the smallest PDO areas in Europe with only 1800 km². The comparative analysis of the whole genome sequences of 15 unique new wild strains of *Lactobacillus delbrueckii* was carried out, and important functional properties of the strains were investigated, including proteolytic activities and production of volatiles compounds. The fifteen isolated *L. delbrueckii* ssp. *lactis* exhibited a strong genetic and technological homogeneity. However, the strains were distantly clustered from the public genomes, indicating a local typicity, associated with interesting functional and technological properties for their potential use as autochthonous starter cultures. To our knowledge, this work was the first to use the pangenome analysis to promote local *L. delbrueckii* subsp. *lactis* strains as starter culture. The use of microbial ecology principles in this study could offer cheese producers the benefits of autochthonous starter cultures.

2. Materials and Methods

2.1. Isolation and Identification of Wild Strains

Presumptive *Lactobacillus delbrueckii* strains were isolated from (i) 50 milk samples (heated for 6 h at 42 °C to enrich milk with thermophilic bacteria and promote the isolation of *Lactobacillus delbrueckii* strains) collected on 25 different farms in the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area (France) in summer and in winter of the year 2020 and (ii) commercial starter cultures commonly used in Saint-Nectaire cheese production. Isolation was carried out on deMan, Rogosa, Sharpe (MRS) agar medium (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) incubated at 42 °C for 48 h. Representative colonies were picked out of this medium, purified twice, and maintained frozen at –80 °C in an MRS broth medium containing 20% (*v/v*) glycerol. The Saint-Nectaire PDO area spreads over 69 municipalities between Puy-de-Dôme and Cantal (France), which are referenced in Table S1. The specifications for the PDO of Saint-Nectaire cheese describe the conditions for cow breeding, milk production, cheese manufacturing, and ripening of cheeses (https://www.inao.gouv.fr/show_texte/4840, accessed on 17 December 2023).

The species identification was carried out by amplification and sequencing of 16S rDNA gene (Eurofins Genomics, Konstanz, Germany) using WO2 and W18 as described previously [11,12]. To identify the partial 16S rDNA sequences obtained, a search of the NCBI GenBank DNA database was conducted using the BLAST algorithm. The percentage of similarity with DNA sequences deposited in this bank was determined. The 16S rDNA sequences were deposited in the NCBI GenBank database under accession numbers PP090971(H15BR1); PP090972 (73BR5); PP090973 (110BR2); PP090974 (110BR5); PP090975 (144BR1); PP090976 (149BR5); PP090977 (155BR2); PP090978 (H14BR1); PP090979 (H19BR1); PP090980 (46BR1); PP090981 (H29BR1); PP090982 (H28BR3); PP090983 (H24BR3); PP090984(H23BR3); PP090985(187BR1).

2.2. DNA Extraction and Sequencing

Genomic DNA was extracted from cell cultures with Nuclospin[®] Tissue from Macherey Nagel (Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions. Final concentrations were measured with a Qubit[™] fluorometer using the dsDNA Broad Range Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The extracted DNA was further sequenced using

Illumina technology (Eurofins genomics, Konstanz, Germany). Library preparation and sequencing were handled by Eurofins genomics (Konstanz, Germany) using a Novaseq 6000 sequencing system (Illumina, San Diego, CA, USA). Sequencing reads from raw fastq files were filtered at Q30 with a minimal length of 110 bp with prinSeq [13]. Reads with remaining sequencing adapters were excluded with cutadapt V4.1 [14]. Each genome was assembled using Spades V3.13 [15] with the careful option and annotated with Prokka V1.5 [16]. The SN-strains genomes were compared to publicly available genomes. Accession numbers of the strains from this study and from the public genomes, as well as isolation sources, are referenced in Table 1.

Table 1. *Lactobacillus delbrueckii* isolation sources with genomes assembly accession numbers analyzed in this study.

Strains	Isolation Source	Accession Number
H15BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920275 ¹
H29BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920385 ¹
H24BR3 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920445 ¹
H28BR3 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920295 ¹
H23BR3 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920345 ¹
H19BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920365 ¹
H14BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920425 ¹
155BR2 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920285 ¹
144BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920375 ¹
149BR5 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920315 ¹
73BR5 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920405 ¹
110BR2 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920335 ¹
110BR5 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920435 ¹
46BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920395 ¹
187BR1 (SN-strain)	Raw milk	GCA_963920355 ¹
CSYR1 ^{CS}	Commercial starter	-
ND02	Unknown	GCA_000182835.1 ²
CNRZ327	Environment	GCA_000751695.2 ²
KCTC3034	Sour milk	GCA_002016675.1 ²
DSM20072	Emmental cheese	GCA_002017855.1 ²
CNRZ700	Environment	GCA_000751275.1 ²
CNRZ333	Environment	GCA_000751235.1 ²
CRL581	Argentinian cheese	GCA_000409675.1 ²
KCTC 3035	Unknown	GCA_001888985.1 ²
CNRZ226	Environment	GCA_000751655.1 ²
DSM20074	Environment	GCA_001908495.1 ²
DSM 26046	Fermented beverage	GCA_001888925.1 ²
KCTC 13731	Environment	GCA_001888945.1 ²
PB2003/044-T3-4	Biological product	GCA_000179375.1 ²
JCM 17838	Fermented vegetable	GCA_001888965.1 ²
KCCM3417	Environment	GCA_001888905.1 ²
ACTC 11842	Bulgarian yogurt	GCA_000056065.1 ²
MN-BM-F01	Traditional fermented dairy	GCA_001469775.1 ²
LBB.B5	Home-made yogurt	GCA_001647065.1 ²
ND04	Fermented camel milk	GCA_002000885.1 ²
JCM 15610	Dairy fermented product	GCA_001908415.1 ²

¹ EBI accession numbers sequenced in this study. ² NCBI accession numbers of genomes publicly available.
^{CS} Commercial strain.

2.3. Pangenome Assembly and Visualization

Annotated GFF3 files of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area and public genomes were submitted to Roary [17] for pangenome analysis using default parameters. A gene presence–absence data matrix was derived and visualized using Phandango [18].

2.4. Phylogenetic Reconstruction

A core-genome single nuclear polymorphism (SNP) tree was created with Parsnp [19] on the Galaxy platform [20]. The resulting phylogenetic tree was visualized using iTOL (<https://itol.embl.de/>, accessed on 16 December 2023). Parsnp is a genome multi-alignment tool designed to align genome sequences. It aligns and provides the output as the multiple sequence alignment of given sequences, SNP variations, and the core genome phylogeny. To estimate the genome sequence similarities, the average nucleotide identity (ANI) was calculated using OrthoANI [21].

2.5. KEGG Functional Analysis

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) numbers [22,23] for accessory genes were obtained using the eggno-mapper v2 web tool [24]. Partial least squares discriminant analysis (sPLS-DA) was performed using the mixOmics package of R software V 4.2.3 (<http://mixomics.org/>, accessed on 14 November 2023).

2.6. Preparation of Model Cheese Curd

The model cheese curds (MCCs) were prepared according to Grizon et al. and Callon et al. [11,25]. In total, 40 mL of pasteurized milk (Ferme des Peupliers, Normandie, France) was incubated at 33 °C and inoculated with strains at 10^4 cfu·mL⁻¹. The milk was coagulated with 12 µL of calf rennet for 45 min at 33 °C and then centrifuged for 20 min at 20,000× g at 33 °C. The supernatant (lactoserum) was discarded, and the curd was incubated for 24 h in a temperature-controlled batch reactor programmed to simulate the decrease in temperature during the manufacture of Saint-Nectaire cheese type (decrease from 33 °C to 9 °C over 24 h). Each strain was tested three times.

2.7. Production of Volatile Compounds Using the DHS-TDU GC-MS Method

Three grams of each MCC sample were precisely weighed into a 20 mL vial, which was sealed with a septum-equipped screw cap and stored at −80 °C. The samples were allowed to stabilize at 4 °C overnight (approximately 16 h) before analysis. On the day of analysis, the samples were placed on a 10 °C DHS plate. For the dynamic headspace extraction (DHS), the samples were subjected to agitation and heating, followed by headspace purging with inert gas through needles. The extracted compounds were trapped and concentrated on a temperature-controlled Tenax polymer. Removal of water was achieved through dry purging with inert gas. The DHS operating conditions were as follows: incubation temperature 30 °C, incubation time 3 min, needle temperature 120 °C, trap extraction Tenax polymer, 30 °C, 300 mL He volume, 30 mL/min He flow, dry purge 30 °C, 300 mL He volume, 50 mL/min He flow. For the desorption (TDU)—injection (CIS), the molecules were thermally desorbed from the trap using inert gas sweep and were subsequently injected through a cooled injection system (CIS, PTV) to enable a discrimination-free transfer to the GC column. The TDU operating conditions were as follows: inert gas He, initial temperature 30 °C, ramped at 60 °C/min to 290 °C, held for 7 min, transfer temperature 300 °C. The IS operating conditions were as follows: inert gas He, initial temperature −100 °C, ramped at 12 °C/s to 270 °C, held for 5 min. For the gas chromatography (GC), the compounds were injected onto a polar capillary column (HP-Innowax, Agilent Waldbronn, Germany) and separated using a temperature program: 40 °C for 5 min, followed by a ramp of 40 °C/min to 155 °C, and then a ramp of 20 °C/min from 155 to 250 °C, with a subsequent maintenance at 250 °C for 5 min. Identification (MS): identification of compounds was based on retention time, and mass spectra were compared to the NIST 2017 Mass Spectral Library. Chromatographic peaks were integrated using total ion current (TIC) or extract ion chromatogram (EIC) for sample comparison, with direct TIC vs. EIC peak area comparisons being avoided. Peak areas of blank samples were subtracted from the assay samples. The peak areas of compounds for MCC samples inoculated with strains were determined at 24 h of fermentation by subtracting the results of MCCs made without inoculation of bacteria. Each strain was tested three times, and the results represent the average of the

three replicates. Data were normalized, and a heatmap was created using heatmaply packages of R software to visualize data.

2.8. Proteolytic Activities

The extraction of water-soluble nitrogen from the MCC samples was carried out according to the method described by Myagkonosov et al. [26] with some modifications. Five grams of MCC samples were mixed with 5 mL of deionized water and homogenized with a stomacher for 4 min. The resulting mixture was transferred to a volumetric flask, and the volume was made up to 100 mL with deionized water. The mixture was kept at 40 °C for 1 h with continuous shaking. The samples were centrifuged at 3000× g for 30 min. After centrifugation, the samples were cooled to 4 °C, and the upper fat layer was removed. The supernatant was separated and filtered with a pore size of 0.45 µm. The resulting filtrate was mixed with deionized water at a ratio of 1:5. Next, 3 mL of OPA (o-phthalaldehyde) reagent prepared according to Church et al. [27] was added to 300 µL of the solution, and after 2 min, absorbance was measured at 340 nm with a 7200 spectrophotometer Jenway (Dutscher, France). The results have been expressed in mmol·L⁻¹ of glycine based on a calibration curve. The proteolytic activity of strains was determined at 24 h of fermentation by subtracting the results at 0 h of fermentation. Twenty-four hours is the production time after addition of lactic starters and before removing the molds. Each strain was tested three times. Results are expressed as means of the three repetitions.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analysis on volatile compounds production data was performed using the XLSTAT software V 2022.4.1 (Addinsoft, Paris, France). The results are reported as means of area units (AU × 10⁴) ± standard deviation (sd × 10⁴). The normality of the data was checked using a Shapiro–Wilk test ($p < 0.05$). The normal distribution was validated, and therefore an ANOVA and Tukey’s test were used to compare the area units obtained. Differences between the mean values were considered significant at $p < 0.05$.

Statistical analysis on proteolytic activities data was performed using the XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). The results are reported as means ± standard deviation. The normality of the data was checked using a Shapiro–Wilk test ($p < 0.05$). The test rejected the hypothesis H_0 of normality when the value of p was ≤ 0.05 . A large number of variables did not have a normal distribution, and therefore a non-parametric test (Kruskal–Wallis) and post hoc comparison (Dunn procedure) were used to compare the concentrations obtained. Differences between the mean values were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Isolation and Identification of 15 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* Wild Strains

In this study, strains belonging to the *Lactobacillus delbrueckii* species were isolated from the Saint-Nectaire cheese-producing PDO area (France). All strains were identified on the basis of 16S rDNA sequence alignment using the NCBI blast algorithm. Strains showing a percentage of similarity equal to or higher than 99% with *Lactobacillus delbrueckii* DNA sequences available in this database were considered to be *Lactobacillus delbrueckii*. In total, 33 isolates from 15 farms were identified as *Lactobacillus delbrueckii*. A total of 15 unique strains collected throughout 15 farms of the geographical producing area (1 isolate per farm), together with 1 commercial strain, were selected and characterized for their genetic and technological properties. Conditions of isolation and EBI accession numbers are referenced in Table 1. The genome sequencing and assembly-related information are shown in Table S2.

The calculation of average nucleotide identity (ANI) values could provide accurate taxonomic guidance based on whole-genome sequences. Baek et al. [28] demonstrated that ANI values among the *L. delbrueckii* subspecies were large enough to identify subspecies. Pairwise similarities for all SN-strains, commercial strains, and publicly available genomes were calculated using orthoANI [21] to identify subspecies to which SN-strains and the

commercial strain belong (Figure 1). The results stated that all SN-strains formed a compact cluster, together with the ND02 genome. The ND02 strain was originally classified as *L. delbrueckii* subsp. *bulgaris*, but El Kafsi et al. [29] considered ND02 as representative of the subsp. *lactis*. They realized a multi-locus sequence typing analysis and identified ND02 as part of the *ssp. lactis* or *ssp. delbrueckii* cluster. Using a 16S rRNA alignment, ND02 shared nucleotides conserved in the *ssp. lactis* and *delbrueckii* strains that differ from the *ssp. bulgaricus*. They concluded from these results that ND02 was misclassified and belonged to the *lactis* subspecies. The results obtained here suggest that the strains belonged to the *L. delbrueckii* *ssp. lactis* subspecies. In contrast, the commercial strain CSYR1 belonged to *L. delbrueckii* *ssp. bulgaricus*. Since the study focused on wild strains of *L. delbrueckii*, genomic analysis did not include the CSYR1 strain to avoid bias in comparative analysis. Genomic analysis focused on *L. delbrueckii* *ssp. lactis* SN-strains and publicly available genomes.

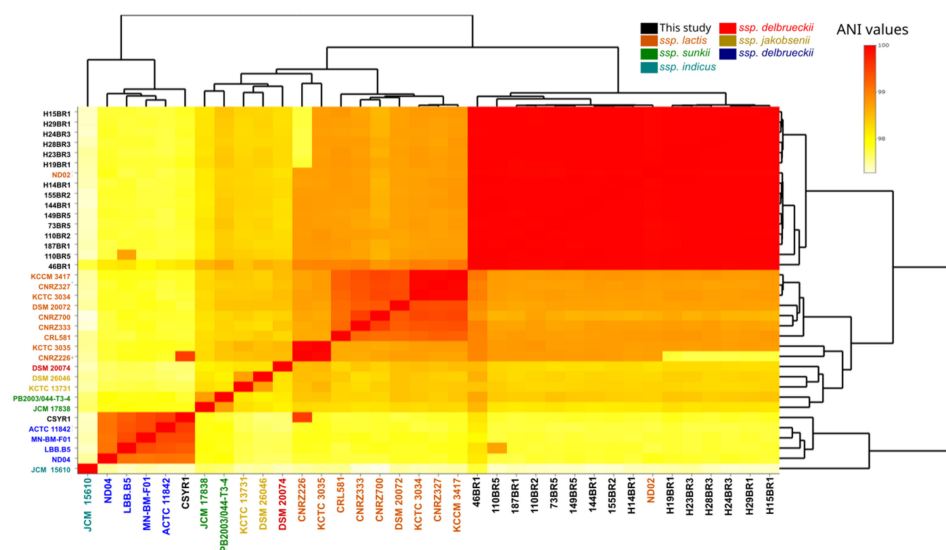


Figure 1. Average nucleotide identity (ANI), demonstrating the genomic distance among *L. delbrueckii* subspecies.

3.2. Genetic Homogeneity among SN-Strains

3.2.1. Pangenome Analysis

For exploring intraspecies diversity, a phylogenetic analysis based on core-genome single nucleotide polymorphisms (SNPs) was assessed (Figure 2). Interestingly, the first clade consisted of all Saint-Nectaire strains and the ND02 genome. The second clade included all other references genomes. The unique clade grouping all SN-strains revealed an absence of diversity within these strains. Phylogenetic analysis provides information about relationships between strains of a species using core genes. Such analysis, however, could not provide a comprehensive overview of the intraspecies genetic diversity, as it does not include the distribution of accessory genes across genomes. In contrast, pangenome analysis identifies ecological differences between genomes of a given species, determining the presence or the absence of all genes of a genome in a given strain. To evaluate the overall genetic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* *ssp. lactis* isolated from a small geographical area, pangenome analysis of the 15 Saint-Nectaire strains and 9 publicly available genomes was performed by clustering the genes encoding complete protein sequences into core and accessory genomes using Roary (Figure 3) [17]. By definition, the core genome is the set of genes shared by at least 95% of the genomes and consists of genes that probably encode essential functions for the cell growth, while the accessory genome is shared by a subset of the genomes tested (less than 95% of the genomes tested) and encodes functions that confer selective advantages to a strain [30]. Considering this, from the 4311 genes constituting the pangenome of the *Lactobacillus delbrueckii* *ssp. lactis* genomes studied here, 1228 (28%) were core genes and 3083 (72%) were accessory genes. In a pangenome analysis of the whole

L. delbrueckii species, Baek et al. [28] reported similar values, with a pangenome of 4332 genes, comprising 25% core genes and 75% accessory genes. The large proportion of accessory genes reported here suggested a high genetic diversity in these strains.

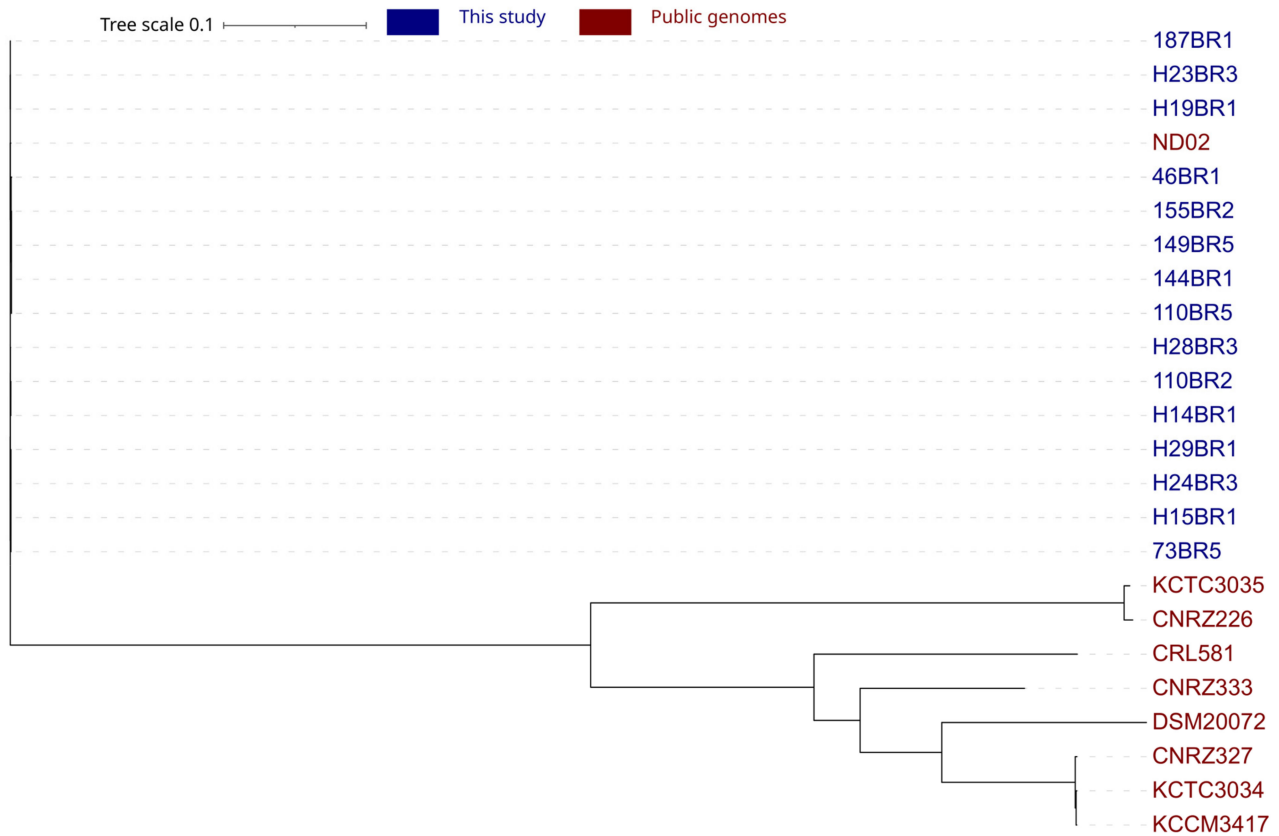


Figure 2. Phylogenetic trees of the 24 *Lactobacillus delbrueckii* strains based on single nucleotide polymorphisms.

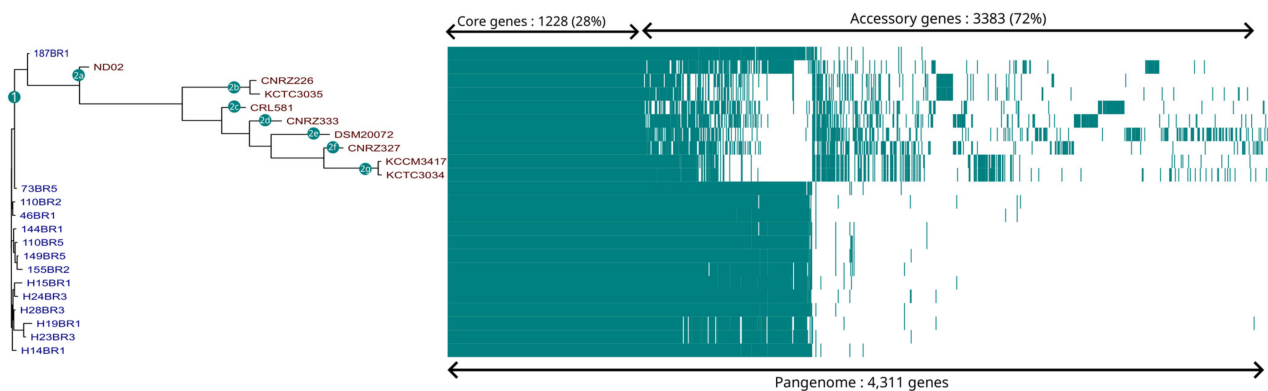


Figure 3. Clustering of strains associated with the visualization of the *Lactobacillus delbrueckii* pangenome. The pangenome was visualized based on the Phandango software (<http://jameshadfield.github.io/phandango/>), accessed on 17 November 2023; Hadfield et al., 2018 [18]. In the Roary matrix, genomes are shown as rows, and homologous gene clusters are depicted as columns. The presence of a gene cluster in a genome is indicated by blue. Core gene clusters found in all genomes are shown on the left side of the matrix. Strain names colored in blue were isolated in this study, and strain names colored in red were from public databases.

In total, pangenome analysis of the 23 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* strains highlighted two main clusters with differences in accessory genes content for each of them

(Figure 3). The second cluster could be divided in seven sub-clusters, named 2a to 2g (Figure 3). The generated clustering based on the pangenome was concordant with the phylogenetic reconstruction based on SNPs in defining the relationships among strains, with the exception of ND02 that was part of the second cluster (Figure 3). Accordingly, the genetic diversity observed was not the consequence of the SN-strains genomes included, since they were clustered together.

A functional annotation with KEGG orthology was performed to understand the main differences between the accessory genes of the different clusters and to identify putative functional specificities of the SN-strains. The accessory genes positively annotated with a KEGG ko number were divided into 29 functional KEGG pathways, including 5 categories grouping almost 51% of these genes, which are “Protein families: signaling and cellular processes” (13% of the total annotated genes), “Carbohydrate metabolism” (12%), “Protein families: genetic information processing” (10%), “Membrane transport” (10%), and “Protein families: metabolism” (6%; Figure S1).

The hierarchical clustering based on KEGG annotations reveals three groups similar to the pangenome clustering (Figure S1). A sparse variant of a partial least squares discriminant analysis (sPLS-DA) was performed (Figure 4) to identify KEGG pathways that differentiate strains into these groups. The results showed that the SN-strains are grouped together, while public genomes are more scattered, stating that no heterogeneity could be observed from the accessory genes of the SN-strains, while the diversity of the sub-species *lactis* as a whole seemed to be important. The SN-strains were separated from the public genomes predominantly along component 1, indicating that component 1 has a strong influence on the separation between the two groups (Figure 3). The bar plots for the contributions on component 1 showed which KEGG pathways are most discriminant for each component (Figure 4). Accordingly, the following KEGG pathways stand out as the most representative of the SN-strains: “Unclassified: metabolism”, “Membrane transport”, “Carbohydrate metabolism”, “Protein families: metabolism”, and “Lipid metabolism”. The second component mainly separated SN-isolates from the DSM20072 genome (Figure 4), and the main contributor of this separation was the “Lipid metabolism” KEGG pathway (Figure 5b). Carbohydrate metabolism is considered the most important metabolism pathway in lactic acid bacteria for their use as starters, as it directly affects the rate of milk acidification. Lipid metabolism is also an important biochemical process because lipolysis can contribute positively to cheese aroma or lead to a rancidity defect [31]. A high number of genes encoding for the oligopeptides transport system were identified in the « Membrane transport » functional categories for this cluster (Figure S2). Peptide transporters are key components of the proteolytic system in lactic acid bacteria, and proteolysis is one of the most important biochemical event during cheese production, with a major impact on flavor and texture [32–34]. In contrast, the following KEGG pathways stand out as among the most representative of the public genomes (Figure 5): «Unclassified: genetic information processing», «Protein families: genetic information processing», «Signal transduction». The abundant genes associated with these categories could increase the survival ability of strains when facing the change in environmental stress conditions. The manufacture of cheeses exposes starters to various environmental stresses (low pH, osmotic stress, and high pressure) [34], and such genes could therefore confer advantages in cheese production. Another important category, «Amino acid metabolism», that might affect the cheese-making process characterized this second cluster with a high number of genes implicated in aromatic amino acids biosynthesis (*aroE*, *aroA*, *aroK*, *aroD*, *aroQ*, *aroKB*) (Figure S3). Since aromatic amino acids are important precursors of flavor compounds, genes encoding enzymes of the biosynthetic pathways for these amino acids are very interesting in the context of cheese-making [35].

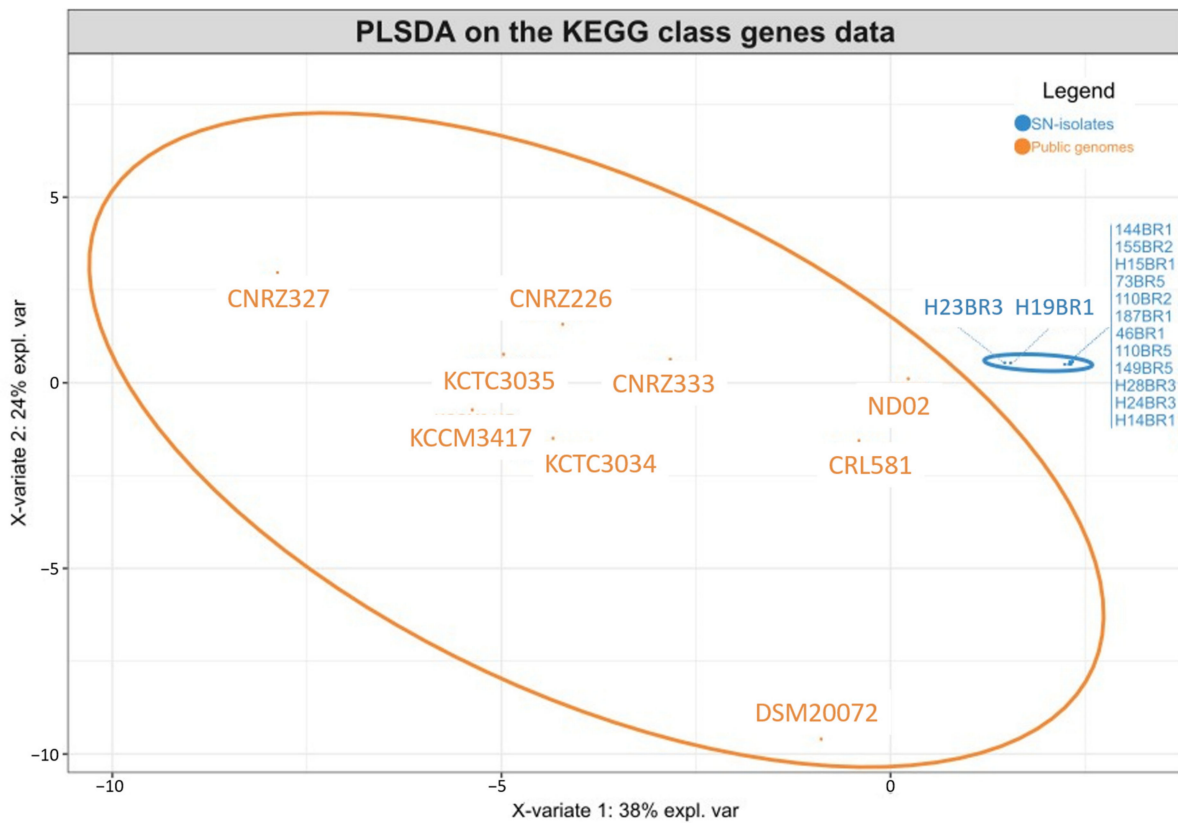


Figure 4. Sample plots from the PLS-DA analysis performed on accessory gene numbers of the KEGG class for the 8 groups.

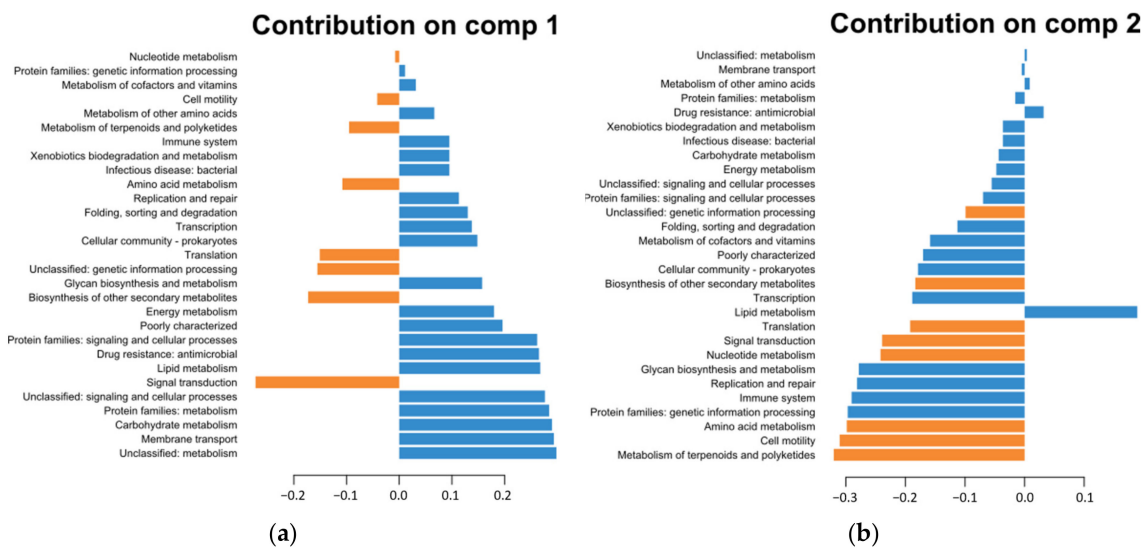


Figure 5. Plot loadings representing the variable’s contribution on component 1 (a) and on component 2 (b) of the PLS-DA analysis. Blue plots represent the SN-strains, while orange plots represent the public genomes.

3.2.2. Carbohydrate Putative Metabolism

The capacity of lactic acid bacteria strains to metabolize carbohydrates holds significant importance in dairy fermentation, as it directly influences the rate of milk acidification. El Khafsi et al. [29] reported that *L. delbrueckii* ssp. *lactis* possessed the capacity for metabolizing a wide range of carbohydrates. Nonetheless, they also reported significant

variability within the strains, showing differences in both number and types of metabolized carbohydrates among individual strains. The lactose, glucose, and galactose transport and utilization systems were analyzed in the genomes of the SN-strains and in the included genomes (Figure 6).

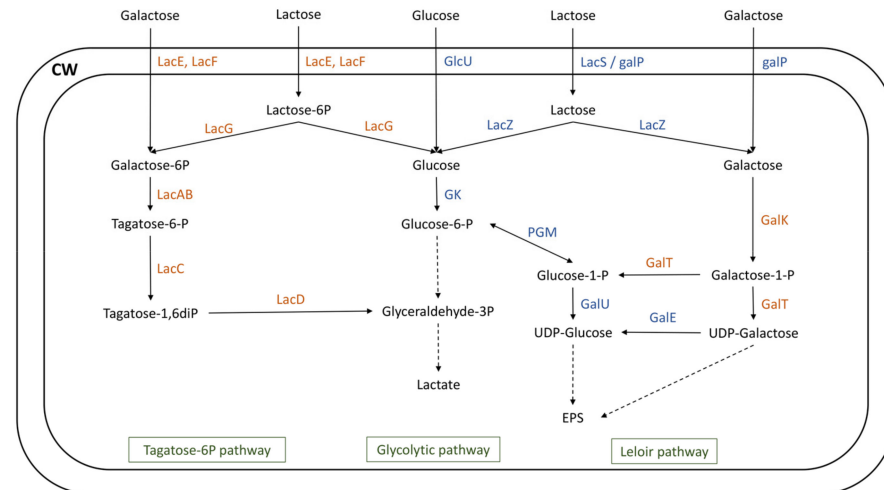


Figure 6. Carbohydrate transport and metabolism in the *Lactobacillus delbrueckii* genomes. Enzymes colored in blue are part of the core-genome, while those colored in brown are part of the accessory genome. GalE, phosphoglucomutase; GalK, galactokinase; galP, galactose and lactose permease; GalT, galactose 1-P uridylyltransferase; GalU, UDP-glucose pyrophosphorylase; GK, glucokinase; GlcU, glucose permease; LacAB, galactose-6-phosphate isomerase; LacC, tagatose-6-phosphate kinase; LacD, tagatose 1,6-diphosphate aldolase; LacE, PTS family lactose porter, EIICB components; LacF, PTS family lactose porter, EIIA components; LacG, 6-phospho- β -galactosidase; LacS, lactose permease; LacZ, β -galactosidase; PGM, phosphoglucomutase.

The fermentation processes carried out by LAB extensively rely on the utilization of lactose, a disaccharide consisting of two moieties, namely glucose and galactose [36]. Lactose utilization requires transport systems, encoded by a permease system (*galP* or *lacS*) or a phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system (PEP-PTS) encoded by *lacEF*. After internalization into the cell, lactose is cleaved into galactose and glucose by a cytoplasmic β -galactosidase (*lacZ*), and galactose can be metabolized thanks to two pathways: Leloir or tagatose-6-phosphate (tagatose-6P) pathway [37]. The resulting glucose moiety is phosphorylated to glucose-6-P by glucokinase (*gk*) and is further utilized through the glycolytic pathway. LAB can also independently internalize glucose (thanks to the GlcU transporter) and galactose (using the *lacEF* PEP-PTS transporter or *galP* permease). Iskandar et al. [38] suggested that the transport system utilized for the internalization of galactose orientates the carbon flux towards one specific pathway. An internalization using a PEP-PTS system is thus linked to the tagatose-6P pathway, while the utilization of a permease system is linked to the Leloir pathway.

In the Leloir pathway, galactose is converted to glucose-1-phosphate by the galRK-TEM gene cluster, which consists of the regulator GalR, galactokinase (GalK), galactose-1-phosphate uridylyltransferase (GalT), UDP-glucose-4-epimerase (GalE), and galactose mutarotase (GalM) [37,38].

In the tagatose-6P pathway, lactose-6P is hydrolyzed by a phospho- β -galactosidase (encoded by *lacG*) into glucose and galactose-6P. The latter is then transformed into glyceraldehyde-3P via a series of reactions encoded by *lacAB* (galactose-6-phosphate isomerase), *lacC* (tagatose-6-phosphate kinase), and *lacD* (tagatose-1,6-diphosphate aldolase) [37,39].

The 15 genomes of SN-strains investigated all harbored a PEP-PTS systems as well as specific permeases responsible for lactose, galactose, and glucose transport. Furthermore, genes responsible for their metabolism (Figure 6) were detected in these genomes (Table S3).

On the contrary, none of the supplementary genomes included in this study possessed all the genes involved in the utilization of these carbohydrates, except in the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* ND02 genome.

In *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genome DSM20072, a gene encoding for galactokinase (galK) was not found. It was previously demonstrated that the deletion of this gene in the *Streptococcus mutans* UA159 strain significantly reduced its capacity to utilize lactose and galactose. Weiss et al. [40] reported a galactose-negative but a lactose-positive phenotype for the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* DSM20072 strain. In *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genomes CNRZ327 and CNRZ333, tagatose-6-phosphate kinase encoding by lacC was not found. However, Zeng et al. [41] demonstrated that the absence of this gene had a low impact on the utilization of lactose and galactose in the *S. mutans* UA159 strain. El Kafsi et al. [29] reported galactose-negative and galactose-positive phenotypes for the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* CNRZ327 and CNRZ333 strains, respectively. The galactose- and lactose-negative phenotype of the CNRZ226 strain reported by El Kafsi et al. [29] signifies that this strain seemed to be unable to ferment lactose and galactose due to incomplete Leloir and tagatose-6P pathways (Figure 6). Although the phenotype of the KCTC3035 strain has not been reported in the literature, its profile, similar to the CNRZ226 strain (Figure 6), may indicate an identical fermentation phenotype.

El Kafsi et al. [29] studied the carbohydrate metabolism potential in the genomes of five *L. delbrueckii* ssp. *lactis* and highlighted a high level of variability within the subspecies. Our results corroborate their findings, with seven profiles of lactose, galactose, and glucose metabolism potential (Figure 6, Table S3). SN-strains all had a similar profile, reflecting a strong homogeneity. These results indicate that SN-strains appeared to be able to metabolize both glucose and galactose moieties of lactose, a key feature of dairy lactic acid bacteria. Although these analyses covered only three carbohydrates, they confirmed the KEGG annotations of accessory genes and revealed that SN-strains seemed to possess a higher number of genes implicated in carbohydrates metabolism in comparison with other genomes. However, experimental procedures are required to identify the ability of these strains to ferment these carbohydrates.

3.2.3. Proteins and Peptides Putative Metabolism

The proteolytic system of LAB, and especially that of *L. delbrueckii* species, is essential for the supply of amino acids essential for their growth, as milk does not contain adequate concentrations of free amino acids [42]. This pathway is also of industrial importance since its derivatives are known to contribute to the formation of texture and flavor of cheeses [32]. In *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains, proteolysis is initiated by a cell-envelope proteinase (CEP) encoded by *pvtL*, which is responsible for the casein hydrolysis into oligopeptides [43]. The second step includes peptides transport into the cell by the Opp system [44], which are then degraded by intracellular peptidases into smaller peptides and amino acids [45].

The search for *pvtL* genes was conducted in the genomes of the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genomes studies here. The SN-strains H19bR1 and H23bR3 and reference genomes KCTC3035 and CNRZ226 did not appear to possess the specific cell-wall-bound proteinase. All other SN-strains and the reference genomes owned a single copy of the CEP gene *pvtL* (Table S4). The presence of a cell-envelope proteinase in the genomes of LAB is a prerequisite to ensure proteolysis in milk, as it plays a critical role in the first step of caseins hydrolysis. As a consequence, strains without this proteinase should exhibit low proteolytic activities in fermented milk products [46].

The genome analysis revealed the presence of an oligopeptides ABC transporter encoded by the *opp* gene cluster in all SN-strains genomes and in some reference genomes. This peptides transport system was not found in the genomes of the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* KCCM317, KCTC3034, CNRZ327, and DSM20072 strains. The *opp* transport system operon encodes two ATP-binding proteins (OppD and OppF), two membrane proteins (OppB and OppC), and a substrate-binding protein (OppA, Table S4), as previously reported by Brown et al. [47]. However, various peptides uptake systems were characterized in

lactic acid bacteria but were not investigated in this study, such as the OPT oligopeptides ABC transporter system, encoded by the *optABCDF* operon, previously characterized in *L. delbrueckii* strains [47].

Additionally, a total of 13 peptidases were identified in the genomes studied, including *pepC*, *pepM*, *pepF*, *pepO*, *pepDA*, *pepV*, *pepT*, *pepP*, *pepQ*, *pepX*, *pepR*, and *pepI*, present in the core-genome and *pepN* present in the accessory genome, as it was absent in the genome of the *L. delbrueckii* ssp. *lactis* CNRZ327 strain. Elean et al. [48] analyzed the proteolytic system of 26 *Lactobacillus delbrueckii* strains, including 8 spp. *lactis* strains, and reported 15 peptidases that were part of the core-genome and 1 of the accessory genome (*pepL*).

Caseins hydrolysis potential seemed to be homogeneous among *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genomes studied here, including within SN-strains, since similar profiles were observed in the proteolysis enzymatic pathway, except for some strains. However, most SN-strains harbored a complete pathway, which could indicate an interesting potential during the cheese-making process.

3.3. Phenotypic Analysis with Technological Interests

3.3.1. Proteolytic Activities

The proteolytic activities of the SN-strains and one commercial strain of *Lactobacillus delbrueckii* were evaluated in a model cheese curd at 24 h of fermentation, and the results are presented in Figure 7. The proteolytic activities varied slightly, from 0.088 to 0.117 mM Glycine.L⁻¹ for H19BR1 SN-strains and H29BR1 SN-strains, respectively. The proteolytic activities of the two SN-strains H19BR1 and H23BR3 were significantly different from the two SN-strains H28BR3 and H29BR1. The genomic analysis of the strains revealed that both SN-strains H19BR1 and H23BR3 did not harbor the specific CEP encoding by the *prtL* gene, which is essential to enable strains to hydrolyze milk caseins [47]. These two SN-strains showed the lowest activities among the tested strains. The proteolytic activities of the 11 other SN-strains were not significantly different ($p < 0.05$) from the two references strains and therefore exhibit interesting proteolysis potential for their use as starter culture. Proteolysis contributes significantly to cheese flavors by liberating peptides and free amino acids that undergo secondary reactions [32].

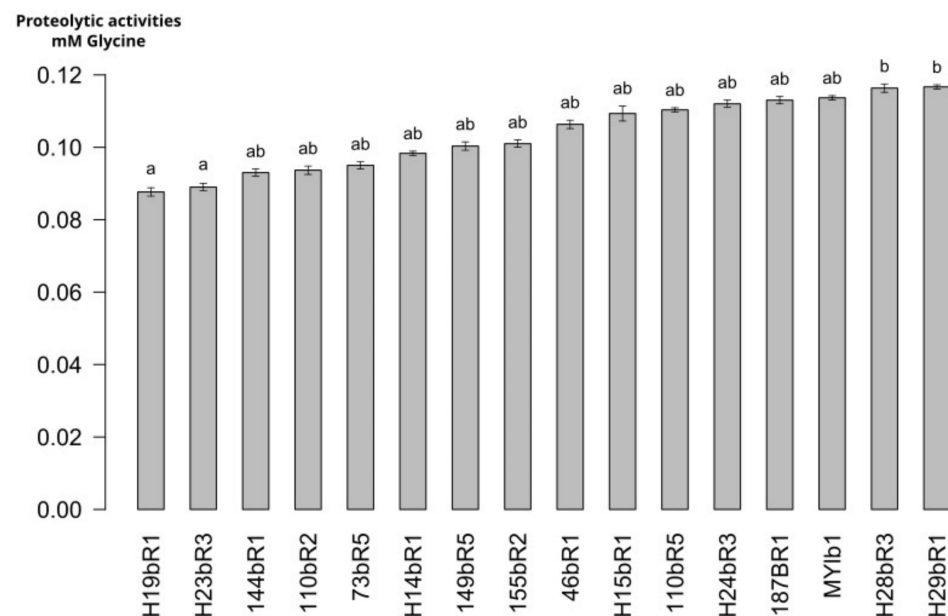


Figure 7. Proteolytic activities of *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains (a,b): mean values without a common superscript are significantly different ($p < 0.05$) according to the Dunn procedure test.

3.3.2. Production of Volatile Compounds

Important enzymatic pathways and biochemical reactions induced by microbial communities lead to the formation of flavor volatile compounds that importantly contribute to flavor development of cheeses [49]. The production of volatile compounds by SN-strains and two commercial strains was investigated in model cheese curd using the DHS-TDU GC-MS technique. The strains were compared to a control commercial starter culture (CCSC) and an *L. delbrueckii* strain isolated from the CCSC starter (RCS).

The hierarchical clustering associated with the heatmap visualization (Figure S4) demonstrated that SN-strains, the control commercial starter culture, and the commercial strain could be divided in five groups according to their volatile flavor compound profiles. Strains H19BR1 and H23BR3 were grouped with the reference commercial strain RCS, suggesting that their profiles are similar to that of the reference strain. Strain 46BR1 formed a group with the reference starter culture CCSC. SN-strains 155BR2 and 144BR1 formed a group, and H15BR1 and 110BR2 were grouped together. All other SN-strains were grouped together. These results suggest slight variability within SN-strains.

In total, 40 volatile flavor compounds were identified, including 9 aldehydes, 14 ketones, 4 carboxylic acids, 9 alcohols, 3 esters, and 1 aromatic hydrocarbon (Table 2).

Carboxylic acid compounds are important components of dairy products [35,50]. Acetic acid, an important compound of fermentation associated with vinegar taste in some products [51,52], was detected in all MCC samples. Hexanoic acid, a volatile compound associated with cheesy, rancid, and sweat-like flavor in dairy products [53], was identified in MCC samples fermented by the CCSC and SN-strains 110bR5, 144bR1, H19bR1, and H23bR3.

Aldehydes have mainly been identified in dairy products. Hexanal and 3-methylbutanal were among the aldehydes most commonly detected in surface-ripened cheeses [50]. Hexanal is associated with green, lemon, and herbal notes [53–56], and its concentration in cheeses seems to be variable according to the ripening state. This compound was identified in 73BR5, 110BR2, H15BR1, H28BR3, H29BR1, and 187BR1 samples. 3-methylbutanal, a branched-chain aldehyde compound, was identified in CCSC and 73BR5 samples. This compound was previously detected in hard cheddar cheese and reported to be responsible for desirable flavor, and its associated notes have been described as “nutty”, “malty, cheese, green and dark chocolates” notes [50,57,58]. The volatile compound benzaldehyde, frequently detected in cheeses and associated with bitter almond and sweet cherry flavors [59,60], was detected in various samples (CCSC, 7BR5, 110BR2, H15BR1, H19BR1, H23BR3, H28BR3, H29BR1, 187BR1).

Alcohol compounds are the volatile compounds generally detected in highest numbers in surface-ripened cheeses [50]. Ethanol compound was detected in samples CCSC, 46BR1, 73BR5, 144BR1, 155BR2, H19BR1, and H23BR3. This compound contributes to dry, dust, and alcohol notes in cheeses [50]. 3-methylbutanol is often associated with fresh cheese, alcoholic, and floral [61]. This compound was identified in all the samples analyzed in this study. Helinck et al. [35] demonstrated that *L. delbrueckii* subsp. *lactis* was able to produce 3-methylbutanol compound from leucine by the action of an α -keto acid decarboxylase.

Ketone compounds are a key component of various dairy products [59–61]. Among all the ketones detected in this study, 2-pentanone (orange peel, sweet, and fruity notes) and acetoin were identified in all the samples. In contrast, 2,3-butanedione, an important volatile compound related to buttery flavor in dairy products [62,63], was only detected in CCSC, H19BR1, and H23BR3 MCC samples.

Table 2. Volatile compounds identified in MCC samples fermented with *Lactobacillus delbrueckii* SN-strains. Results are expressed as means of area units (AU $\times 10^4$) \pm standard deviation (sd $\times 10^4$).

Strain	110BR2	110BR5	144BR1	155BR2	187BR1	46BR1	73BR5	CCSC	H15BR1	H19BR1	H23BR3	H28BR3	H29BR1	RCS
Esters														
Ethyl Acetate	-	-	-	-	-	274 \pm 2.1 a	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethyl hexanoate	-	-	497 \pm 42.5 b	-	-	1425 \pm 26.4 a	-	61 \pm 0.7 c	-	30 \pm 0.8 c	145 \pm 3.2 c	-	-	133 \pm 1.8 c
Ethyl Octanoate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11 \pm 0.5 c	12 \pm 0.3 b	-	-	13 \pm 0.5 a
Ketones														
2-Butanone	2403 \pm 239.2 b	-	-	-	-	-	-	2702 \pm 38.9 a	2422 \pm 272.1 ab	-	-	-	-	-
2,3-Butanedione	-	-	-	-	-	-	-	4499 \pm 19.9 b	-	4703 \pm 6.6 a	3290 \pm 29.6 d	-	-	3745 \pm 146 c
Methyl Isobutyl Ketone	314 \pm 7.6 bcd	213 \pm 15.5 gh	119 \pm 13.3 i	421 \pm 5.7 a	316 \pm 2.9 bc	275 \pm 3.8 def	343 \pm 42.3 b	291 \pm 6.3 cde	414 \pm 10.4 a	273 \pm 1.6 ef	317 \pm 1.1 bc	244 \pm 9.1 fg	191 \pm 0.9 h	444 \pm 4.3 a
Acetoin	31 \pm 0.3 g	15 \pm 0.2 g	54 \pm 0.6 g	370 \pm 8.4 f	42 \pm 0.9 g	12447 \pm 72.1 b	63 \pm 0.0 g	13206 \pm 81.2 a	85 \pm 0.2 g	9327 \pm 84.1 d	5930 \pm 77.1 e	39 \pm 0.2 g	23 \pm 0.7 g	9928 \pm 29.6 c
2,3-Pentanedione	-	-	-	-	25 \pm 0.5 d	-	9 \pm 0.2 e	123 \pm 3.6 b	11 \pm 0.2	120 \pm 6.8 bc	115 \pm 0.2 c	-	-	143 \pm 2.1 a
2-Heptanone	-	164 \pm 4.9 a	72 \pm 0.4 c	-	-	23 \pm 1.0 g	-	154 \pm 5.3 b	55 \pm 0.3 de	52 \pm 0.2 e	59 \pm 0.7 d	42 \pm 0.1 f	46 \pm 0.7 f	70 \pm 0.2 c
Acetoin acetate	-	-	-	-	-	-	-	62 \pm 0.3 d	-	652 \pm 2.8 a	395 \pm 3.6 c	-	-	464 \pm 2.5 b
2-Hydroxy-3-pentanone	-	-	-	-	-	-	-	181 \pm 5.6 c	-	149 \pm 2.2 d	208 \pm 5.6 b	-	-	236 \pm 3.0 a
Acetophenone	-	-	-	-	-	-	-	12 \pm 2.2 a	-	-	-	-	-	-
2-Propanone, 1-hydroxy-	-	-	-	-	-	-	-	55 \pm 0.5 a	-	54 \pm 0.5 b	-	-	-	43 \pm 0.1 c
Acetone	1136 \pm 47.3 f	705 \pm 5.9 j	1330 \pm 41.4 e	5848 \pm 37.3 a	1077 \pm 82.3 fg	1782 \pm 55.1 d	979 \pm 4.3 ghi	1130 \pm 13.8 f	906 \pm 4.5 i	3842 \pm 6.1 c	5776 \pm 99.2 a	1045 \pm 6.6 fgh	919 \pm 9.3 hi	4405 \pm 57 b
2-Pentanone	684 \pm 3 g	1205 \pm 2.7 a	760 \pm 11.4 f	803 \pm 3.9 e	743 \pm 19.4 f	983 \pm 4.5 b	665 \pm 1.6 g	748 \pm 6.8 f	933 \pm 5.2 c	542 \pm 2.0 i	622 \pm 3.1 h	964 \pm 3.9 b	874 \pm 5.0 d	390 \pm 6.4 j
2-Nonanone	-	-	-	-	-	23 \pm 0.5 a	-	14 \pm 0.8 b	-	-	-	-	-	-
2,3-Dimethylhydroquinone	-	-	-	-	-	-	-	46 \pm 0.9 a	-	-	-	-	-	-
Aldehydes														
2-Methylbutanal	-	-	-	-	-	-	146 \pm 0.9 b	225 \pm 14 a	-	-	-	-	-	-
3-Methylbutanal	-	-	-	-	-	-	1374 \pm 90.7 a	1167 \pm 25.5 b	-	-	-	-	-	-
Decanal	16 \pm 0.3 a	-	16 \pm 0.6 a	13 \pm 1.0 b	-	-	12 \pm 0.8 b	-	-	-	-	-	12 \pm 0.5 b	-
Benzaldehyde	26 \pm 0.3 e	-	-	-	118 \pm 1.3 a	-	45 \pm 0.9 b	8 \pm 0.1 g	25 \pm 0.4 e	11 \pm 0.2 f	8 \pm 0.0 g	43 \pm 1 c	35 \pm 0.2 d	-
Benzaldehyde, 4-methyl-	15 \pm 0.5 c	-	-	-	-	-	35 \pm 0.4 b	-	-	-	-	39 \pm 0.3 a	-	-
Hexanal	66 \pm 0.5 d	-	-	-	143 \pm 8.8 a	-	42 \pm 0.2 f	-	50 \pm 0.8 e	-	-	97 \pm 0.4 b	87 \pm 0.9 c	-
Heptanal	34 \pm 2.3 b	-	-	-	135 \pm 14 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Octanal	-	-	-	-	8 \pm 0.2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Nonenal, (E)-	-	-	-	-	7 \pm 0.2 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcohols														
2-Butanol, (R)-	-	644 \pm 2.7 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Propanol, 2-methyl-	286 \pm 2.4 j	423 \pm 2.2 g	506 \pm 3.9 f	416 \pm 2.4 g	416 \pm 4.8 g	559 \pm 7 e	308 \pm 4.7 i	938 \pm 7.5 a	298 \pm 1.5 ij	778 \pm 5.7 b	761 \pm 5.3 c	334 \pm 2.7 h	251 \pm 4.4 k	675 \pm 3.8 d

Table 2. Cont.

Strain	110BR2	110BR5	144BR1	155BR2	187BR1	46BR1	73BR5	CCSC	H15BR1	H19BR1	H23BR3	H28BR3	H29BR1	RCS
3-Methyl-Butanol	36 ± 0.3 e	63 ± 0.2 e	34 ± 0.7 e	75 ± 0.2 de	37 ± 0.2 e	2966 ± 53.1 b	28 ± 0.0 e	4689 ± 100.8 a	60 ± 0.2 e	369 ± 5.1 c	115 ± 1.1 de	33 ± 0.4 e	28 ± 1.0 e	155 ± 3.6 d
3-Pentanol	-	-	-	-	-	-	-	509 ± 1.4 a	-	307 ± 7.4 b	156 ± 4.2 d	-	-	259 ± 5.2 c
Ethanol	-	-	457 ± 0.1 c	1443 ± 28.3 a	-	138 ± 6.6 de	211 ± 0.7 d	114 ± 2.6 e	-	110 ± 5.2 e	1356 ± 89.1 b	-	-	1336 ± 12.3 b
1-Butanol	153 ± 1.6 b	-	-	106 ± 0.2 e	168 ± 1.0 a	61 ± 0.6 g	147 ± 1.8 c	65 ± 0.1 f	124 ± 3.4 d	-	-	63 ± 0.1 fg	13 ± 0.3 h	-
1-Penten-3-ol	8 ± 0.3 b	-	-	9 ± 0.1 b	32 ± 1.3 a	-	6 ± 0.1 c	-	-	-	-	-	-	-
1-Pentanol	-	-	-	60 ± 0.1 b	183 ± 17.8 a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Octadecanol	-	-	-	-	-	-	-	48 ± 0.4 a	-	40 ± 0.2 b	-	-	-	-
Aromatic hydrocarbons														
Toluene	254 ± 1.7 b	186 ± 1.7 ef	155 ± 0.5 gh	188 ± 0.9 e	167 ± 1.3 fg	153 ± 1.8 gh	246 ± 13.7 b	222 ± 3.9 cd	226 ± 14.4 c	274 ± 1.7 a	144 ± 3.4 hi	203 ± 11.6 de	132 ± 2.1 i	157 ± 0.7 gh
Carboxylic acids														
Acetic acid	27 ± 0.3 ij	47 ± 0.6 gh	17 ± 0.6 jk	92 ± 0.2 e	57 ± 0.2 g	334 ± 3.2 c	10 ± 7.2 k	1143 ± 5.8 a	37 ± 0.8 hi	326 ± 1.5 c	241 ± 0.8 d	70 ± 1.0 f	41 ± 0.3 h	381 ± 11 b
Hexanoic acid	-	34 ± 0.3 b	16 ± 0.4 d	-	-	-	-	253 ± 4.4 a	-	23 ± 0.3 c	35 ± 0.3 b	-	-	36 ± 0.2 b
Octanoic acid	-	-	-	-	-	-	-	34 ± 1.9 a	-	-	-	-	-	-
Butanoic acid	-	165 ± 3.3 c	76 ± 0.2 d	-	-	-	-	1442 ± 24.2 a	-	1357 ± 2.7 b	-	-	-	180 ± 8.4 c

(a–k): mean values without a common superscript in each rows are significantly different ($p < 0.05$) according to the Tukey's test.

Some ester compounds positively contribute to the flavor in cheeses [64,65]. Notably, ethyl octanoate and ethyl hexanoate are important flavor compounds of cheeses due to their sweet, fruity, and floral notes [51]. They both were identified in H19BR1 and H23BR3 samples, and ethyl hexanoate was also identified in CCSC, 46BR1, and 144BR1 samples.

Toluene, an aromatic hydrocarbon frequently identified in cheeses [65–70] and associated with nutty and rancid odors, was detected in all samples.

Overall, minor differences were observed between MCC samples manufactured with the different strains, but important compounds were produced by SN-strains during the fermentation of MCC samples. It has been previously reported that using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as a starter culture significantly affects the volatile compound profiles in hard cooked cheeses during ripening [69]. Volatile compounds identified in this study could positively affect the Saint-Nectaire cheeses aroma in the context of a utilization of SN-strains as starter cultures in this cheese type.

Liu et al. [69] studied the aroma of fermented milk produced by 28 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A sensory analysis indicated that fermented milks were classified in four different groups, including one “cheesy-type” and one “fermented-type”. A total of 95 volatile compounds in these two groups were identified by GC-IMS and GC-MS, and 12 aroma-active compounds were selected by GC-O-MS. Finally, six aroma-active compounds were determined as the key ones, including 2,3-butanedione, δ -decalactone, acet-aldehyde, butanoic acid, acetic acid, and hexanoic acid. Butanoic acid was identified as the decisive aroma compound for the cheesy-type, and hexanoic acid the decisive aroma compound of fermented-type. In our study, δ -decalactone and acetaldehyde were not identified in MCC samples fermented by the strains. However, compounds identified as 2,3 butanedione, butanoic acid, acetic acid, and hexanoic acid were found in MCC samples fermented by commercial starter CCSC, commercial strain RCS, and the two SN-strains H19BR1 and H23BR3. Consequently, the two latter strains seemed to be those that could most influence the “cheesy-type” or “fermented-type” sensorial characteristics of the MCC samples. However, sensorial analyses are required to validate this prediction.

4. Discussion

The use of commercial starters for the manufacture of artisanal cheeses is associated with a reduction in the variability of the cheese microbiota and thus a standardization of the final products [71]. Using the particular microbial richness and footprint of raw milk and cheese to develop indigenous starters is a real asset for ensuring the reproducibility of products without losing their typicality [72]. The isolation campaign allowed isolating 15 *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains from the Saint-Nectaire PDO area. The phylogenetic analysis, together with the pangenome generated with the 15 SN-strains, the commercial strain, and the 9 publicly available genomes, highlighted a high variability within the *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* but a strong genetic heterogeneity among SN-strains. Tsuchihashi et al. [2] reported similar results in a study conducted on 226 *L. delbrueckii* strains isolated from raw milk in Hokkaido (Japan). They identified, in an MLSA analysis, a sub-cluster I-B1 accounting for 69.9% of isolated strains and reported that strains assigned to this cluster were dominant among *L. delbrueckii* isolated from raw milk in Hokkaido. The geographical origin and genomic evolution of strains appear to be closely linked in certain species. Song et al. [72] observed links between clusters identified using pan-core genomes analysis and geographical origins of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* isolates. They explained those links with a possible evolution to adapt to their particular environments. The subspecies *L. delbrueckii* subsp. *lactis* has been studied less frequently. Nevertheless, Giraffa et al. [3] reported a correlation between clusters formed by random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) analysis and sources or periods of isolation of strains related to this subspecies. In this study, the separation of the *L. delbrueckii* spp. *lactis* SN-strains from the other strains, and the absence of diversity within SN-strains, indicated a strong influence of the Saint-Nectaire area geographical origin on the evolution of the SN-strains. It has been shown that local environments influence the composition of natural

microflora [70–75]. Therefore, the environmental conditions of the small Saint-Nectaire PDO area and the Saint-Nectaire production process might be the reason for an adaptive evolution of the strains to the specific niche, leading to the observed low diversity.

The KEGG functional annotation of the accessory genes provided insights about the key functions of each cluster formed by the pangenome analysis. Interestingly, the accessory genes of the SN-strains were characterized by many KEGG functional categories that could be of serious interest as part of the development of indigenous starter culture adapted to cheese technology. The SN-strains seemed to own a high number of genes implicated in three key metabolisms in cheese production (carbohydrate, lipid metabolism, and proteolysis). The carbohydrate metabolism and proteolysis potential of the strains were investigated based on their whole genome analysis to validate these results. The lactose, galactose, and glucose metabolism potential from publicly available strains genomes included in this study seemed more reduced than that of SN-strains, except for the ND02 genome. El Kafsi et al. [29] and Song et al. [72] reported an association between fermentation profiles and in silico metabolic pathway analyses. Accordingly, fermentation profiles of SN-strains would be more varied than other genomes studied. However, experimental verification is required to identify the ability of these isolates to ferment these carbohydrates. Low variability of proteolytic potential was observed among *L. delbrueckii* ssp. *lactis* genome, although this is the only genetic characteristic which allowed us to differentiate some of the SN-strains. As only a search for specific genes was conducted, a more in-depth in silico analysis of the proteolytic systems would be interesting to assess diversity among strains. Elean et al. [48] conducted a study on the proteolytic system of 27 *L. delbrueckii*, including the search for specific genes implicated in proteolysis, a structural analysis of the CEPs, and an in silico analysis of the *prt* gene promoter; they concluded that *L. delbrueckii* ssp. *lactis* displayed a great variability. Though the genetic variability of the SN-strains was low in comparison with the diversity within the subspecies *L. delbrueckii* ssp. *lactis*, most of the strains exhibited genetic characteristics associated with metabolic potential of major importance for their use as starter culture in cheese production. To confirm these predictions, an assessment of technological properties was performed.

Exploration of the volatile compounds production appears to be an important parameter for the selection of autochthonous strains as candidates for the development of starter cultures. Randazzo et al. [74] studied the effect of wild strains on the volatile compounds of Pecorino Siciliano cheese. They demonstrated that the addition of wild strain had a significant impact on the typical flavor compounds of the cheeses. In this study, several profiles of volatile compounds were identified using the DHS-TDU GC-MS method, indicating that SN-strains showed a technological variability on this criterion. In total, 40 volatile compounds were identified, including aldehydes, alcohols, carboxylic acids, esters, and aromatic hydrocarbons compounds that were reported to contribute to fermented milk and cheese flavors in previous studies. These findings were consistent with those of Dan et al. [76], who compared 17 strains of *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to a control strain using the solid-phase microextraction (SPME) GC-MS method and reported variables profiles according to the strains. Furthermore, we identified two SN-strains, H19BR1 and H23BR3, and the SN-strain 46BR1 that exhibited a similar profile to the reference strain, and the reference commercial starter, respectively. However, the formers showed the lowest proteolytic activities. These strains could therefore be good candidates for the development of starter cultures for cheese manufacturing for their volatile compound production potential but should be used in association with other strains to ensure sufficient proteolytic activities. In this study, only the production of volatile compounds by SN strains in pure cultures was studied. However, Buchin et al. [68] suggested that *L. delbrueckii* ssp. *lactis* could also affect the aroma of cheeses by providing precursors or nitrogen compounds that could favor other species. Although some major compounds were detected in MCC samples fermented with the different *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains, only a quantitative approach with the calculation of odor activity values could determine in a later stage if the compounds produced can contribute significantly to the aroma of cheeses.

We previously isolated and characterized a rich collection of *Streptococcus thermophilus* in terms of diversity from the Saint-Nectaire cheese PDO area [11], but the present study indicates that the possibility of isolating strains with high intraspecies genetic and functional variability from a small geographic area is not systematic. The absence of variability among *L. delbrueckii* SN-strains may be influenced by the isolation method used over the Saint-Nectaire PDO geographical area in the present study. The use of a single and somewhat selective medium (event if used classically in routine) could represent a bias in the isolation of the total available diversity. An interesting alternative strategy might have been to study the diversity upstream isolation, through a shotgun metagenomic sequencing approach, coupled with the pangenome analysis of metagenome-assembled genomes (MAGs). Such an approach would allow us to explore the possibility of isolating high genetic variability from a geographical area and to identify key functions to elaborate new strategies for the isolation of strains with technological interest. Zhai and Wei [76] constructed a genome collection of *Lactococcus lactis* by integrating MAGs and isolate genomes and assessed the genetic diversity of this species. They observed a pangenome in an open-state and highlighted an unexpectedly high diversity within the taxon. The method they used to understand the genetic and functional properties of *Lactococcus lactis* could be leveraged for the study of genetic diversity in a given geographical area with the aim to develop specific autochthonous starter cultures and should be tested for further diversity analysis.

According to the above results, the Saint-Nectaire cheese-producing area seems to be an important factor of adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, leading to strong core- and pangenome homogeneity among strains. The adaptation of strains to this particular environment has led to a specific genomic footprint of SN-strains in comparison with genomes from other sources (public genomes), indicating a significant distinct specificity. In addition, the strains were able to produce important volatile compounds that could positively impact cheese aroma.

In conclusion, genetic and technological characterization of strains was an effective way to explore the opportunity to isolate candidates for the development of starter cultures in a limited geographical area. Moreover, in addition to the impact of these functions directly on the cheese-making process, studying the metabolic potential of each strain using these accessory genes' functional annotation could provide clues for the production of starter cultures upstream of cheese manufacturing. Although low diversity was observed among SN-strains, their pronounced differentiation compared to publicly available genomes suggests a strong typicity of these strains, which, together with their technological characteristics, could make a significant benefit for their use as starter culture in Saint-Nectaire cheese production. The use of these autochthonous strains as starter cultures for producing Saint-Nectaire cheese could help to preserve the microbiological richness of raw milk from the area of production, maintaining the sensory properties of this cheese variety, and could significantly affect the local food autonomy. Further experiments are in process to pursue the development of new starter cultures including *L. delbrueckii* SN-strains from safety assessment to the technological validation in cheese-making large facilities.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms12030512/s1>, Table S1: Municipalities comprising the Saint-Nectaire cheese PDO area; Table S2: Genome sequencing and assembly-related information; Table S3: The lactose, glucose, and galactose transport and utilization systems; Table S4: The proteolytic systems of the strains; Table S5: Growth characteristics of the *Lactobacillus delbrueckii* SN-strains in MCC samples; Figure S1: Hierarchical clustering of strains based on the gene content summarized by KEGG pathways; Figure S2: Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the Membrane transport KEGG pathway; Figure S3: Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the amino acid metabolism KEGG pathway; Figure S4: Hierarchical clustering associated with heatmap of volatile metabolite profiles from MCC samples fermented by different *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains. Each square in the heatmap expresses normalized volatile peak area (means of three replicates) respective to the color range.

Author Contributions: Conceptualization, A.G., P.B. and C.C.; Data curation, A.G. and S.T.; Formal analysis, A.G. and S.T.; Funding acquisition, S.T., P.B., P.G. and C.C.; Investigation, A.G.; Methodology, A.G., S.T. and S.H.; Project administration, S.T., P.B., P.G. and C.C.; Resources, A.G., S.H., P.B., P.G. and C.C.; Software, A.G. and S.T.; Supervision, P.B. and C.C.; Validation, A.G., P.B. and C.C.; Writing—original draft, A.G.; Writing—review and editing, A.G., S.T., S.H., P.B., P.G. and C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by “Interprofession du Saint-Nectaire” and “Association Nationale Recherche Technologie” (convention CIFRE N° 2020/0839).

Data Availability Statement: The data presented in this study are deposited in online repositories. Genomes can be found in the EBI repository under the project accession number PRJEB61322.

Acknowledgments: We thank Anne-Claire Peron, Mathilde Lacalmontie, Béatrice Desserre, and François Allegretti for their advice and technical assistance in chemistry and microbiology and Céline Gres for administrative support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Song, Y.; Sun, Z.; Guo, C.; Wu, Y.; Liu, W.; Yu, J.; Menghe, B.; Yang, R.; Zhang, H. Genetic Diversity and Population Structure of *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *bulgaricus* Isolated from Naturally Fermented Dairy Foods. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tsuchihashi, H.; Ichikawa, A.; Takeda, M.; Koizumi, A.; Mizoguchi, C.; Ishida, T.; Kimura, K. Genetic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii* Isolated from Raw Milk in Hokkaido, Japan. *J. Dairy Sci.* **2022**, *105*, 2082–2093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Giraffa, G.; Andrighetto, C.; Antonello, C.; Gatti, M.; Lazzi, C.; Marcazzan, G.; Lombardi, A.; Neviani, E. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Strains of Dairy Origin. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *91*, 129–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Abarquero, D.; Renes, E.; Combarros-Fuertes, P.; Fresno, J.M.; Tornadijo, M.E. Evaluation of Technological Properties and Selection of Wild Lactic Acid Bacteria for Starter Culture Development. *LWT* **2022**, *171*, 114121. [[CrossRef](#)]
5. Cuffia, F.; Bergamini, C.V.; Hynes, É.R.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C. Evaluation of Autochthonous Cultures to Improve the Cheese Flavor: A Case Study in Hard Cheese Model. *Food Sci. Technol. Int. Cienc. Tecnol. Aliment. Int.* **2020**, *26*, 173–184. [[CrossRef](#)]
6. Viana de Souza, J.; Silva Dias, F. Protective, Technological, and Functional Properties of Select Autochthonous Lactic Acid Bacteria from Goat Dairy Products. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)]
7. Guarcello, R.; De Angelis, M.; Settanni, L.; Formiglio, S.; Gaglio, R.; Minervini, F.; Moschetti, G.; Gobbetti, M. Selection of Amine-Oxidizing Dairy Lactic Acid Bacteria and Identification of the Enzyme and Gene Involved in the Decrease of Biogenic Amines. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 6870–6880. [[CrossRef](#)]
8. Özkan, E.R.; Demirci, T.; Akin, N. In Vitro Assessment of Probiotic and Virulence Potential of *Enterococcus faecium* Strains Derived from Artisanal Goatskin Casing Tulum Cheeses Produced in Central Taurus Mountains of Turkey. *LWT* **2021**, *141*, 110908. [[CrossRef](#)]
9. Özkan, E.R.; Demirci, T.; Öztürk, H.İ.; Akin, N. Screening *Lactobacillus* Strains from Artisanal Turkish Goatskin Casing Tulum Cheeses Produced by Nomads via Molecular and In Vitro Probiotic Characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **2021**, *101*, 2799–2808. [[CrossRef](#)]
10. Tittarelli, F.; Perpetuini, G.; Di Gianvito, P.; Tofalo, R. Biogenic Amines Producing and Degrading Bacteria: A Snapshot from Raw Ewes’ Cheese. *LWT* **2019**, *101*, 1–9. [[CrossRef](#)]
11. Grizon, A.; Theil, S.; Callon, C.; Gerber, P.; Helinck, S.; Dugat-Bony, E.; Bonnarme, P.; Chassard, C. Genetic and Technological Diversity of *Streptococcus thermophilus* Isolated from the Saint-Nectaire PDO Cheese-Producing Area. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1245510. [[CrossRef](#)]
12. Callon, C.; Millet, L.; Montel, M.-C. Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from AOC Salers Cheese. *J. Dairy Res.* **2004**, *71*, 231–244. [[CrossRef](#)]
13. Cantu, V.A.; Sadural, J.; Edwards, R. PRINSEQ++, a Multi-Threaded Tool for Fast and Efficient Quality Control and Preprocessing of Sequencing Datasets. *PeerJ* **2019**, *7*, e27553v1.
14. Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 10–12. [[CrossRef](#)]
15. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D.; et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Seemann, T. Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid Large-Scale Prokaryote Pan Genome Analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hadfield, J.; Croucher, N.J.; Goater, R.J.; Abudahab, K.; Aanensen, D.M.; Harris, S.R. Phandango: An Interactive Viewer for Bacterial Population Genomics. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 292–293. [[CrossRef](#)]
19. Treangen, T.J.; Ondov, B.D.; Koren, S.; Phillippy, A.M. The Harvest Suite for Rapid Core-Genome Alignment and Visualization of Thousands of Intraspecific Microbial Genomes. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 524. [[CrossRef](#)]
20. The Galaxy Community. The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2022 Update. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, W345–W351. [[CrossRef](#)]
21. Lee, I.; Ouk Kim, Y.; Park, S.-C.; Chun, J. OrthoANI: An Improved Algorithm and Software for Calculating Average Nucleotide Identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 1100–1103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Ishiguro-Watanabe, M. KEGG for Taxonomy-Based Analysis of Pathways and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2023**, *51*, D587–D592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kanehisa, M.; Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 27–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cantalapiedra, C.P.; Hernández-Plaza, A.; Letunic, I.; Bork, P.; Huerta-Cepas, J. eggNOG-Mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 5825–5829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Callon, C.; Arliguie, C.; Montel, M.-C. Control of Shigatoxin-Producing *Escherichia Coli* in Cheese by Dairy Bacterial Strains. *Food Microbiol.* **2016**, *53*, 63–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Myagkonosov, D.S.; Abramov, D.V.; Ovchinnikova, E.G.; Krayushkina, V.N. Express Method for Assessing Proteolysis in Cheese and Aromatic Additives with Cheese Flavor. *Food Syst.* **2021**, *3*, 4–10. [[CrossRef](#)]
27. Church, F.C.; Swaisgood, H.E.; Porter, D.H.; Catignani, G.L. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* **1983**, *66*, 1219–1227. [[CrossRef](#)]
28. Baek, M.; Kim, K.W.; Yi, H. Subspecies-Level Genome Comparison of *Lactobacillus delbrueckii*. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 3171. [[CrossRef](#)]
29. El Kafsi, H.; Binesse, J.; Loux, V.; Buratti, J.; Boudebouze, S.; Dervyn, R.; Kennedy, S.; Galleron, N.; Quinquis, B.; Batto, J.-M.; et al. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* and ssp. *bulgaricus*: A Chronicle of Evolution in Action. *BMC Genom.* **2014**, *15*, 407. [[CrossRef](#)]
30. Tettelin, H.; Riley, D.; Cattuto, C.; Medini, D. Comparative Genomics: The Bacterial Pan-Genome. *Curr. Opin. Microbiol.* **2008**, *11*, 472–477. [[CrossRef](#)]
31. Thierry, A.; Collins, Y.F.; Abeijón Mukdsi, M.C.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G.; Spinnler, H.E. Chapter 17—Lipolysis and Metabolism of Fatty Acids in Cheese. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; pp. 423–444, ISBN 978-0-12-417012-4.
32. Savijoki, K.; Ingmer, H.; Varmanen, P. Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *71*, 394–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ardö, Y.; McSweeney, P.L.H.; Magboul, A.A.A.; Upadhyay, V.K.; Fox, P.F. Chapter 18—Biochemistry of Cheese Ripening: Proteolysis. In *Cheese*, 4th ed.; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2017; pp. 445–482, ISBN 978-0-12-417012-4.
34. Zotta, T.; Ricciardi, A.; Ciocia, F.; Rossano, R.; Parente, E. Diversity of Stress Responses in Dairy Thermophilic Streptococci. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *124*, 34–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Helinck, S.; Le Bars, D.; Moreau, D.; Yvon, M. Ability of Thermophilic Lactic Acid Bacteria to Produce Aroma Compounds from Amino Acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3855–3861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kumar, A.; Weatherly, M.R.; Beaman, D.C. Sweeteners, Flavorings, and Dyes in Antibiotic Preparations. *Pediatrics* **1991**, *87*, 352–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Kandler, O. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* **1983**, *49*, 209–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Iskandar, C.F.; Cailliez-Grimal, C.; Borges, F.; Revol-Junelles, A.-M. Review of Lactose and Galactose Metabolism in Lactic Acid Bacteria Dedicated to Expert Genomic Annotation. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *88*, 121–132. [[CrossRef](#)]
39. Grossiord, B.; Vaughan, E.E.; Luesink, E.; de Vos, W.M. Genetics of Galactose Utilisation via the Leloir Pathway in Lactic Acid Bacteria. *Lait* **1998**, *78*, 77–84. [[CrossRef](#)]
40. Weiss, N.; Schillinger, U.; Kandler, O. *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comb. nov.. *Syst. Appl. Microbiol.* **1983**, *4*, 552–557. [[CrossRef](#)]
41. Zeng, L.; Das, S.; Burne, R.A. Utilization of Lactose and Galactose by *Streptococcus mutans*: Transport, Toxicity, and Carbon Catabolite Repression. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 2434–2444. [[CrossRef](#)]
42. Hébert, E.M.; Raya, R.R.; de Giori, G.S. Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium. *Curr. Microbiol.* **2004**, *49*, 341–345. [[CrossRef](#)]
43. Villegas, J.M.; Brown, L.; Savoy de Giori, G.; Hébert, E.M. Characterization of the Mature Cell Surface Proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 4277–4286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Doeven, M.K.; Kok, J.; Poolman, B. Specificity and Selectivity Determinants of Peptide Transport in *Lactococcus lactis* and Other Microorganisms. *Mol. Microbiol.* **2005**, *57*, 640–649. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Wegmann, U.; Klein, J.R.; Drumm, I.; Kuipers, O.P.; Henrich, B. Introduction of Peptidase Genes from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* into *Lactococcus lactis* and Controlled Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4729–4733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Ji, D.; Ma, J.; Xu, M.; Agyei, D. Cell-Envelope Proteinases from Lactic Acid Bacteria: Biochemical Features and Biotechnological Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2021**, *20*, 369–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Brown, L.; Villegas, J.M.; Elean, M.; Fadda, S.; Mozzi, F.; Saavedra, L.; Hebert, E.M. YebC, a Putative Transcriptional Factor Involved in the Regulation of the Proteolytic System of *Lactobacillus*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 8579. [[CrossRef](#)]
48. Elean, M.; Albarracin, L.; Villena, J.; Kitazawa, H.; Saavedra, L.; Hebert, E.M. In Silico Comparative Genomic Analysis Revealed a Highly Conserved Proteolytic System in *Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Fox, P.F. Cheese: An Overview. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: Volume 1 General Aspects*; Fox, P.F., Ed.; Springer: Boston, MA, USA, 1993; pp. 1–36, ISBN 978-1-4615-2650-6.
50. Bertuzzi, A.S.; McSweeney, P.L.H.; Rea, M.C.; Kilcawley, K.N. Detection of Volatile Compounds of Cheese and Their Contribution to the Flavor Profile of Surface-Ripened Cheese. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 371–390. [[CrossRef](#)]
51. Cheng, H. Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2010**, *50*, 938–950. [[CrossRef](#)]
52. Wang, J.; Yang, Z.J.; Xu, L.Y.; Wang, B.; Zhang, J.H.; Li, B.Z.; Cao, Y.P.; Tan, L. Key Aroma Compounds Identified in Cheddar Cheese with Different Ripening Times by Aroma Extract Dilution Analysis, Odor Activity Value, Aroma Recombination, and Omission. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 1576–1590. [[CrossRef](#)]
53. Condurso, C.; Verzera, A.; Romeo, V.; Ziino, M.; Conte, F. Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Mass Spectrometry Analysis of Dairy Product Volatiles for the Determination of Shelf-Life. *Int. Dairy J.* **2008**, *18*, 819–825. [[CrossRef](#)]
54. Curioni, P.M.G.; Bosset, J.O. Key Odorants in Various Cheese Types as Determined by Gas Chromatography-Olfactometry. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 959–984. [[CrossRef](#)]
55. Kilcawley, K.N. Cheese Flavour. In *Fundamentals of Cheese Science*; Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 2017; pp. 443–474, ISBN 978-1-4899-7681-9.
56. Thomsen, M.; Martin, C.; Mercier, F.; Tournayre, P.; Berdagué, J.-L.; Thomas-Danguin, T.; Guichard, E. Investigating Semi-Hard Cheese Aroma: Relationship between Sensory Profiles and Gas Chromatography-Olfactometry Data. *Int. Dairy J.* **2012**, *26*, 41. [[CrossRef](#)]
57. Avsar, Y.K.; Karagul-Yuceer, Y.; Drake, M.A.; Singh, T.K.; Yoon, Y.; Cadwallader, K.R. Characterization of Nutty Flavor in Cheddar Cheese. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1999–2010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Hannon, J.A.; Kilcawley, K.N.; Wilkinson, M.G.; Delahunty, C.M.; Beresford, T.P. Production of Ingredient-Type Cheddar Cheese with Accelerated Flavor Development by Addition of Enzyme-Modified Cheese Powder. *J. Dairy Sci.* **2006**, *89*, 3749–3762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Singh, T.K.; Drake, M.A.; Cadwallader, K.R. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 166–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Smit, G.; Smit, B.A.; Engels, W.J.M. Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 591–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Molimard, P.; Spinnler, H.E. Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *J. Dairy Sci.* **1996**, *79*, 169–184. [[CrossRef](#)]
62. Lawlor, J.B.; Delahunty, C.M.; Wilkinson, M.G.; Sheehan, J. Relationships between the Gross, Non-Volatile and Volatile Compositions and the Sensory Attributes of Eight Hard-Type Cheeses. *Int. Dairy J.* **2002**, *12*, 493–509. [[CrossRef](#)]
63. Pan, D.D.; Wu, Z.; Peng, T.; Zeng, X.Q.; Li, H. Volatile Organic Compounds Profile during Milk Fermentation by *Lactobacillus pentosus* and Correlations between Volatiles Flavor and Carbohydrate Metabolism. *J. Dairy Sci.* **2014**, *97*, 624–631. [[CrossRef](#)]
64. Alemayehu, D.; Hannon, J.A.; McAuliffe, O.; Ross, R.P. Characterization of Plant-Derived Lactococci on the Basis of Their Volatile Compounds Profile When Grown in Milk. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *172*, 57–61. [[CrossRef](#)]
65. Liu, S.-Q.; Holland, R.; Crow, V.L. Esters and Their Biosynthesis in Fermented Dairy Products: A Review. *Int. Dairy J.* **2004**, *14*, 923–945. [[CrossRef](#)]
66. Delgado, F.J.; González-Crespo, J.; Cava, R.; Ramírez, R. Formation of the Aroma of a Raw Goat Milk Cheese during Maturation Analysed by SPME–GC–MS. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1156–1163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Yvon, M.; Rijnen, L. Cheese Flavour Formation by Amino Acid Catabolism. *Int. Dairy J.* **2001**, *11*, 185–201. [[CrossRef](#)]
68. Buchin, S.; Duboz, G.; Salmon, J.-C. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as a Starter Culture Significantly Affects the Dynamics of Volatile Compound Profiles of Hard Cooked Cheeses. *Eur. Food Res. Technol.* **2017**, *243*, 1943–1955. [[CrossRef](#)]
69. Liu, A.; Liu, Q.; Bu, Y.; Hao, H.; Liu, T.; Gong, P.; Zhang, L.; Chen, C.; Tian, H.; Yi, H. Aroma Classification and Characterization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Fermented Milk. *Food Chem. X* **2022**, *15*, 100385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Corbo, M.R.; Racioppo, A.; Monaci, N.; Speranza, B. Commercial Starters or Autochthonous Strains? That Is the Question. In *Starter Cultures in Food Production*; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2017; pp. 174–198, ISBN 978-1-118-93379-4.
71. Silvetti, T.; Capra, E.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Decimo, M.; Gavazzi, F.; Giannico, R.; De Noni, I.; Brasca, M. Microbial Population Profile during Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter Cheese, Produced with and without Autochthonous Starter Culture. *LWT* **2017**, *84*, 821–831. [[CrossRef](#)]
72. Song, Y.; Zhao, J.; Liu, W.; Li, W.; Sun, Z.; Cui, Y.; Zhang, H. Exploring the Industrial Potential of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* by Population Genomics and Genome-Wide Association Study Analysis. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 4044–4055. [[CrossRef](#)]
73. Van de Guchte, M.; Penaud, S.; Grimaldi, C.; Barbe, V.; Bryson, K.; Nicolas, P.; Robert, C.; Oztas, S.; Mangenot, S.; Couloux, A.; et al. The Complete Genome Sequence of *Lactobacillus bulgaricus* Reveals Extensive and Ongoing Reductive Evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 9274–9279. [[CrossRef](#)]

74. Randazzo, C.L.; Pitino, I.; De Luca, S.; Scifò, G.O.; Caggia, C. Effect of Wild Strains Used as Starter Cultures and Adjunct Cultures on the Volatile Compounds of the Pecorino Siciliano Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 269–278. [[CrossRef](#)]
75. Dan, T.; Ren, W.; Liu, Y.; Tian, J.; Chen, H.; Li, T.; Liu, W. Volatile Flavor Compounds Profile and Fermentation Characteristics of Milk Fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2183. [[CrossRef](#)]
76. Zhai, Y.; Wei, C. Open Pangenome of *Lactococcus lactis* Generated by a Combination of Metagenome-Assembled Genomes and Isolate Genomes. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 948138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Diversité de souches sauvages de *L. delbrueckii*

Figure S1 Hierarchical clustering of strains based on the gene content summarized by KEGG pathways.

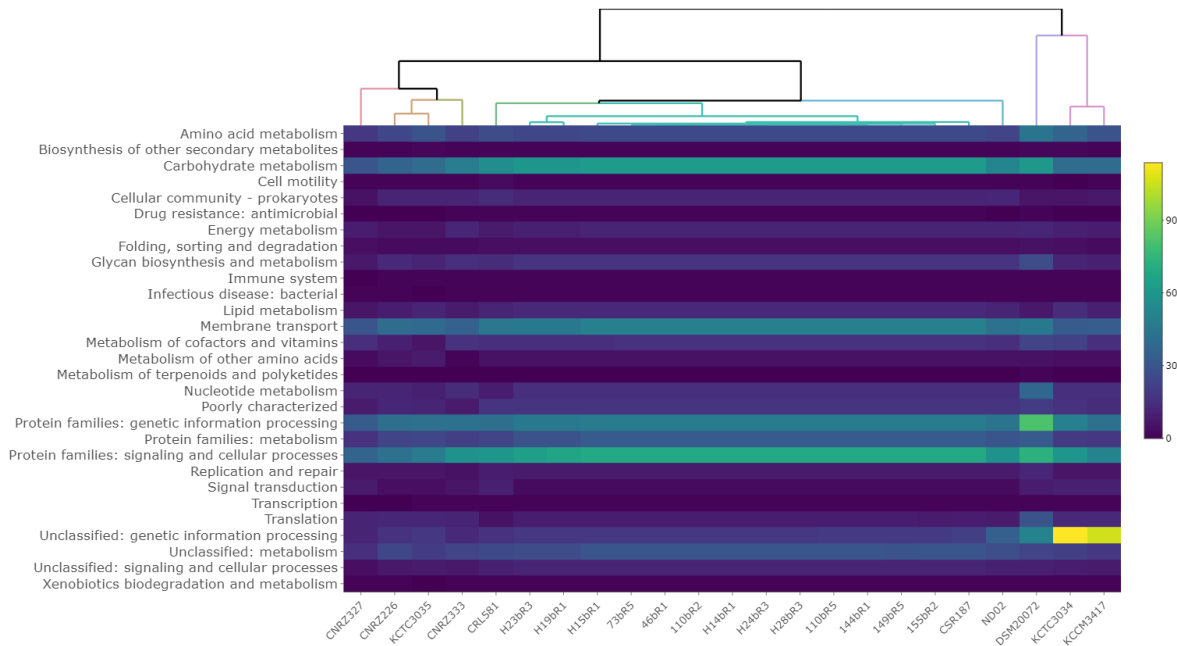
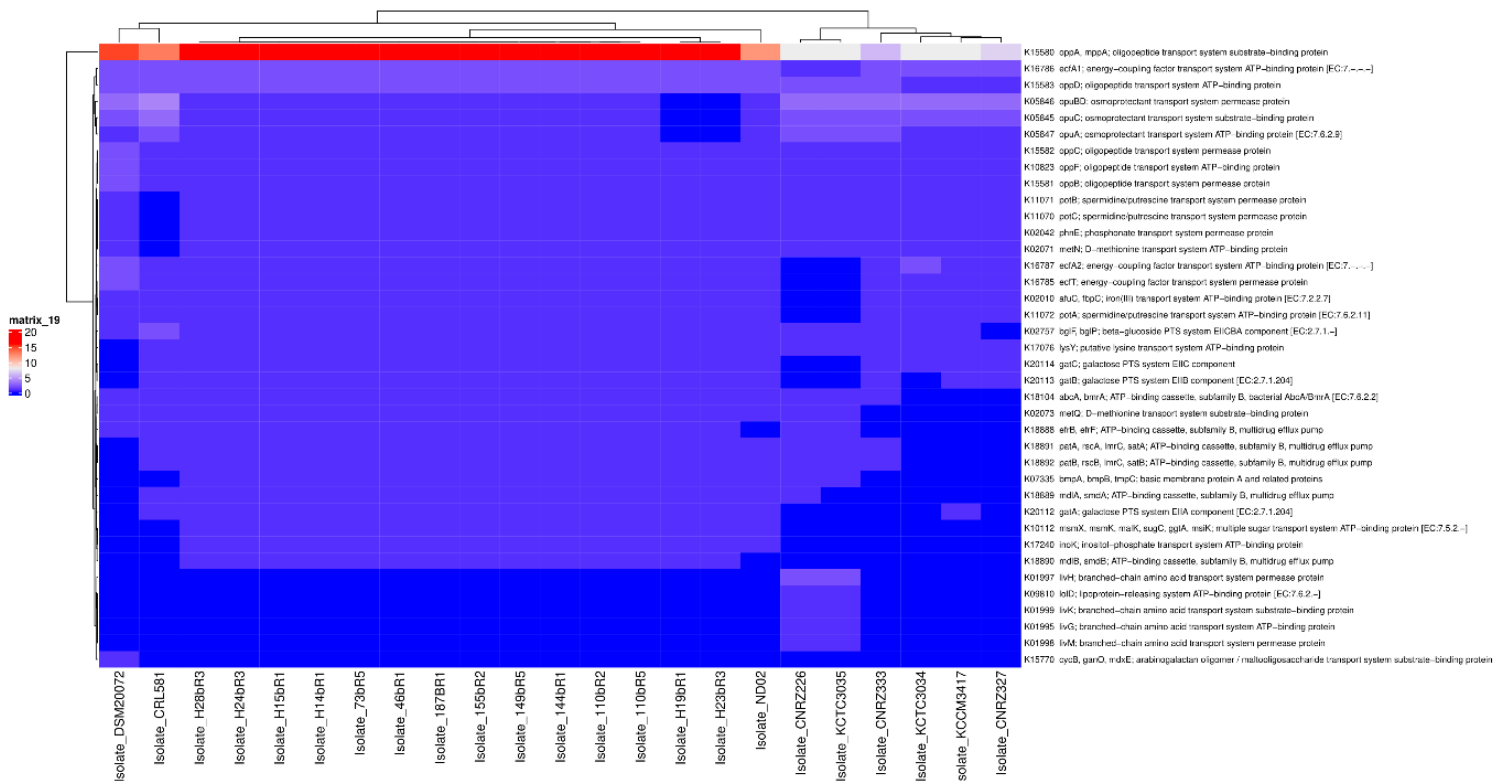
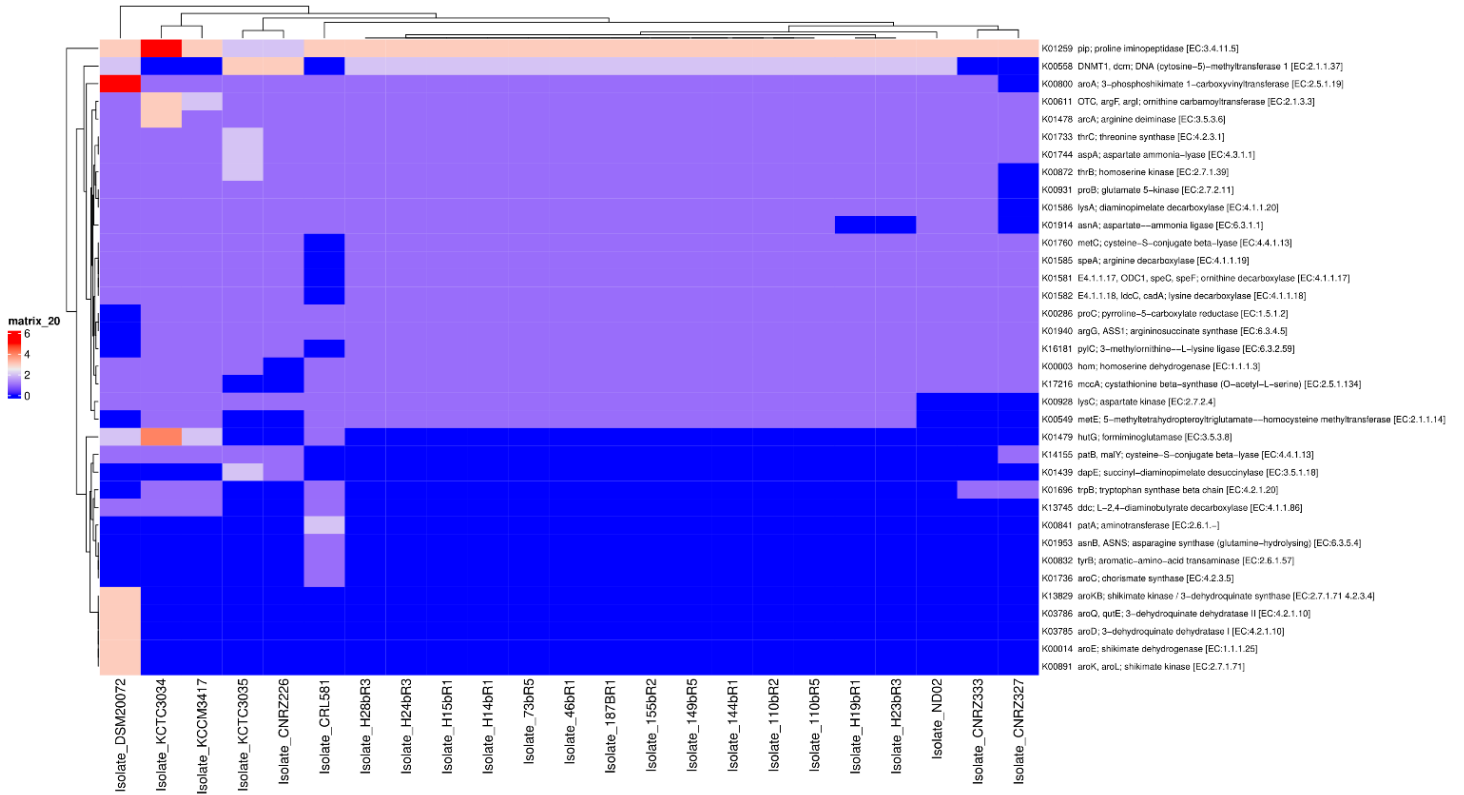


Figure S2 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the Membrane transport KEGG pathway.



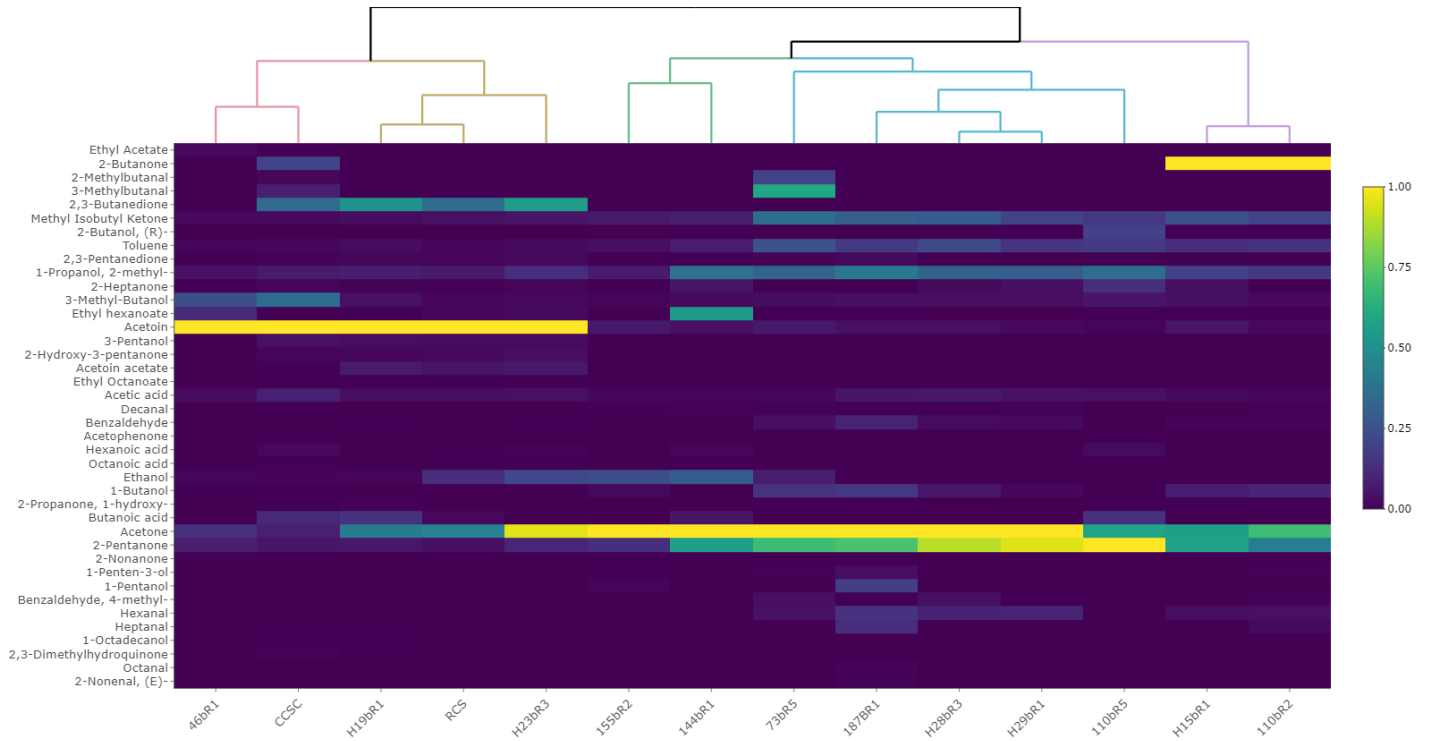
Diversité de souches sauvages de *L. delbrueckii*

Figure S3 Heatmap representing the lowest level of the KEGG pathway database (gene ko level) for the amino acid metabolism KEGG pathway.



Diversité de souches sauvages de *L. delbrueckii*

Figure S4 Hierarchical clustering associated with heatmap of volatile metabolite profiles from MCC samples fermented by different *L. delbrueckii* ssp. *lactis* strains. Each square in the heatmap expresses normalized volatile peak area (means of three replicates) respective to the color range.



V - Sélection et assemblages de souches d'intérêt

V.1. Valorisation de la diversité des souches sauvages

V.1.A. Stratégie expérimentale et principaux résultats

Dans les chapitres précédents, des souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* et *Streptococcus thermophilus*, ont été isolées de laits collectés sur la zone de production AOP Saint-Nectaire. Parmi ces souches, certaines présentaient des activités acidifiantes intéressantes et produisaient des composés aromatiques volatils contribuant aux saveurs des fromages.

Bien que les BL possèdent le statut *Qualified Presumption of Safety* (QPS) dispensé par l'EFSA, leur utilisation saine doit être assurée. Les souches présentant les meilleures caractéristiques technologiques ont été sélectionnées pour évaluer leurs caractéristiques de sûreté, incluant la résistance aux antibiotiques acquise et la présence de facteurs de virulence. Les résultats indiquaient que plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* étaient potentiellement porteuses d'éléments à l'origine de résistance aux antibiotiques. Ces souches ont donc été écartées lors de la sélection pour les assemblages. Néanmoins, les facteurs identifiés dans le génome des souches ne présentaient pas de risque de pathogénicité, et ne risquaient pas d'atteindre à la santé suite à la consommation de ces microorganismes.

L'impact d'une association par paires de souches de *Streptococcus thermophilus* sur les cinétiques d'acidification a été évalué dans des caillés modèles produits à l'échelle laboratoire, selon le protocole de fabrication de Saint-Nectaire. Le suivi d'acidification à 6h et à 24h de fermentation indiquait que plusieurs couples avaient un impact négatif sur l'abaissement de pH, en comparaison avec les fermentations réalisées avec les souches uniques. Aucun prophage dit « intact » n'avait été identifié dans le génome des souches. En revanche, l'induction de prophages éventuels par ajout de mitomycine C en phase exponentielle avait abouti à une chute de densité optique lors du suivi de croissance d'une des souches. Les souches présentant un impact négatif n'étaient donc pas lysogènes, sauf éventuellement pour une souche qui mérite plus d'investigations. Les associations de souches de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* n'avaient pas impacté les activités acidifiantes et protéolytiques et les caractéristiques de croissance des souches.

Les souches possédant les caractéristiques technologiques intéressantes, ne présentant pas de problèmes de sûreté associés aux antibio-résistances, et n'impactant pas les caractéristiques de fermentation en assemblages avaient été sélectionnées. Les assemblages avaient été établis principalement selon des critères de diversité en utilisant les données des chapitres précédents. Quatre assemblages constitués chacun de deux souches de *Streptococcus thermophilus* et une souche de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* avaient été testés en fabrications fromagères expérimentales sur un modèle type Saint-Nectaire. Un suivi d'acidification sur 24 h avait été étudié sur cinq laits crus provenant de différentes fermes, en comparaison avec un ferment commercial très utilisé par les producteurs. Deux assemblages présentaient un abaissement de pH statistiquement identique au ferment de référence.

Sélection et assemblages de souches d'intérêt

Ces données seront complétées par des essais en transformation fermière, avec un suivi de marqueurs types de fabrication et d'affinage. Des analyses physico-chimiques (pH, matière sèche, matière grasse, taux protéique, teneur en humidité), microbiologiques (suivi et impact sur les populations microbiennes des fromages) et sensorielles (analyses sensorielles) seront effectuées sur les fromages en cours de fabrication et d'affinage pour confirmer l'utilisation des ferments autochtones proposés.

Ce chapitre associé aux deux précédentes études propose une méthode complète de développement de ferments autochtones, prenant en compte les caractéristiques technologiques, mais également génomique pour optimiser les étapes de sélection et d'assemblage de souches, et permettre le déploiement à plus large échelle et pour d'autres technologies fromagères.

V.2. Article 3 - Safety assessment and microbial interactions of wild lactic acid bacteria strains: toward the development of an autochthonous starter culture for Saint-Nectaire cheese production

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un troisième article " Safety assessment and microbial interactions of wild lactic acid bacteria strains : toward the development of an autochthonous starter culture for Saint-Nectaire cheese production " qui sera complété avec les essais en transformation fermière avant d'être soumis à "MDPI - Foods".

ARTICLE

Safety assessment and microbial interactions of wild lactic acid bacteria strains: toward the development of an autochthonous starter culture for Saint-Nectaire cheese production

Anna Grizon^{a, b}, Sebastien Theil^a, Cecile Callon^a, Sandra Helinck^b, Pascal Bonnarme^b, Christophe Chassard^a

^a UMR545 Fromage, INRAE, VetAgro Sup, Université Clermont Auvergne, Aurillac, France

^b Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, UMR SayFood, Palaiseau, France

Abstract

Twelve strains of *Streptococcus thermophilus* and six strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* isolated from the Saint-Nectaire PDO area, were screened for their safety aspects and several technological properties. A search for antimicrobials resistance genes (ARGs) associated with a phenotypic resistance evaluation were carried out, as well as virulence factors screening. Technological characterization included the effects of interactions of strains on growth abilities, acidifying and proteolytic activities. An ARG against tetracycline (*tetS*) was detected in the genome of one *Streptococcus thermophilus*, but this strain did not exhibit phenotypic resistance against tetracycline. In contrast, two *Lb. delbrueckii* strains were found resistant to gentamicin using phenotypic method, but ARGs were not detected in these genomes. A high prevalence of phenotypic resistance against kanamycin was reported, without detection of ARG in the genomes. Also, no harmful virulence factors were identified in any of the strains. The identification of interactions between *Streptococcus thermophilus* pair of strains showed that only three associations had a negative effect on acidification during the manufacture of model cheese curd. Pairwise associations between *Lactobacillus delbrueckii* and *S. thermophilus* did not affect growth abilities, pH values or proteolytic activities. Finally, four consortia consisting of two *S. thermophilus* and one *L. delbrueckii* strains were tested in experimental cheese production, and two of them were selected based on their acidification potential for further investigation in large-scale cheese-making.

Keywords

Autochthonous starter, Lactic acid bacteria, Safety assessment, Interactions, Cheese production

Abbreviations

ARG, Antimicrobials Resistance Genes; EFSA, European Food Safety Authority; QPS, Qualified Presumption of Safety; PDO, Protected Designation of Origin; MCC, Model Cheese Curd; VFDB, Virulence Factor Database; MIC, Minimal Inhibitory Concentrations

1. Introduction

Saint-Nectaire, a cheese produced from cow's milk, is a pressed, uncooked variety that has been awarded by the PDO (Protected Designation of Origin) label since 1955. Its production adheres to stringent guidelines, with its designated area spanning only 1800 km². This area, centered around the Puy de Dôme and Cantal departments (France), ranks as one of the smallest PDO regions in Europe. Despite its limited appellation area, Saint-Nectaire has rapidly become one of France's most rapidly expanding farmhouse cheese PDOs. Saint-Nectaire cheese production embodies a rich heritage of French gastronomy, representing a timeless tradition of artisanal craftsmanship passed down through generations in the Auvergne region (Le Gall, 2021). The manufacturing of the coagulum relies on the combined effects of lactic acid bacteria (LAB) and rennet. Saint-Nectaire cheese is exclusively manufactured using commercial starter cultures, mainly composed of thermophilic *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* LAB. Such starter cultures are therefore widely-distributed, are part of the manufacturing of various fermented dairy products and hence not specific to the Saint-Nectaire production area.

In the dairy sector, the repeated use of the same commercial starters to produce many different products contributes to a standardization of their qualities. This homogenization erases the product specificities, which should be distinguished by their unique manufacturing process and specific geographical origin. The use of autochthonous starter cultures in the artisanal cheese-making process can foster the link between the product and the terroir, enabling the specific typicity of each variety to be rediscovered and promoting regional food autonomy. An autochthonous starter culture is either a single microbial strain or a combination of strains that are well adapted to the specific technological process. These strains are isolated and

selected directly from the original product (raw milk or cheese) within its production area. When chosen with precision, the utilization of starter cultures in cheesemaking facilitates the control of desired acidity levels over time, while also enhancing the typical and specific organoleptic characteristics of the cheeses (Corbo et al. 2017; Munekata et al. 2023; Couderc et al. 2022).

For the selection and development of autochthonous starter cultures, the microbial strains must be suitably adapted to the technological conditions employed in cheesemaking, and capable of enhancing the fermentation process. Moreover, ensuring the safety of these strains for their use in food production is crucial, even though the European Food Safety Authority (EFSA) has awarded Qualified Presumption of Safety (QPS) status to most LAB species (Ricci et al. 2017). The objective of this study was to develop starter cultures to restore typical character of Saint-Nectaire cheese, promote sustainability of its production and of the food sovereignty in the production chain. For this, the safety aspects of autochthonous *S. thermophilus* and *L. delbrueckii subsp. lactis* strains isolated from the Saint-Nectaire cheese PDO area and the performance of a selection of strains used as starters for the production of Saint-Nectaire cheese were investigated.

Material and methods

Strains and culture conditions

Bacterial strains were isolated from raw milk produced in PDO Saint-Nectaire farms as described previously (Grizon et al. 2023; 2024). *Streptococcus thermophilus* strains (Table 1) were grown at 42°C in M17 broth (Biokar, Allonne, France) and *Lactobacillus delbrueckii spp. lactis* strains (Table 1) were grown at 42°C in MRS broth (Biokar, Allonne, France).

Selection of strains

Through the screening of autochthonous LAB from Saint-Nectaire PDO cheese (Grizon et al. 2023; 2024), twelve *Streptococcus thermophilus* strains were selected for the present study mainly based on their fast and high acidifying profiles, and six *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* were selected based on their volatile compounds production and their genetic characteristics.

Safety assessment of strains

Safety aspects of strains were first studied based on genomic analysis. Genomes were previously sequenced by Grizon et al. (2023; 2024) and are publicly available on European Bioinformatics Institute under accession listed in Table 1. The acquired antibiotic resistance genes were identified using ResFinder v.4.1 (Bortolaia et al. 2020). Genes encoding bacterial virulence were analyzed using

Virulence Factor Database (VFDB) (Chen et al. 2005).

On the other hand, Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were measured using the ETEST strip method (bioMérieux, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions: LAB cells grown until the stationary phase were suspended in M17 or MRS medium. The cell suspension soaked in a sterile cotton swab was streaked with a plate rotation 60 degrees three times on the M17 or MRS agar medium. After drying the surface of plate, ETEST strip were applied to the agar medium, followed by incubation at 42 °C until cell growth was observed on the control agar plate (24h). The experiment was repeated two times, and the average value was recorded. The nine antibiotics tested were ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol.

Table 1 Strains analyzed in this study and genomes accession numbers

Species	Strain	Isolation farm	EBI accession number
<i>S. thermophilus</i>	M134	/	GCA_950101985
<i>S. thermophilus</i>	19M1a	19	GCA_950101965
<i>S. thermophilus</i>	H11bM2	11	GCA_950102055
<i>S. thermophilus</i>	H26M3c	26	GCA_950102005
<i>S. thermophilus</i>	H23bM1	23	GCA_950101975
<i>S. thermophilus</i>	26bM1	26	GCA_950102035
<i>S. thermophilus</i>	H26bM2	26	GCA_950102015
<i>S. thermophilus</i>	H11M1a	11	GCA_950102095
<i>S. thermophilus</i>	26bM3	26	GCA_950101995
<i>S. thermophilus</i>	H20bM1	20	GCA_950101925
<i>S. thermophilus</i>	H11bM1	11	GCA_950102085
<i>S. thermophilus</i>	29bM2	29	GCA_950102105
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	H19BR1	19	GCA_963920365
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	H23BR3	23	GCA_963920345
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	46BR1	46	GCA_963920395
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	H15BR1	15	GCA_963920275
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	155BR2	155	GCA_963920285
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i>	73BR5	73	GCA_963920405

Interactions between strains

Cross-interactions between *Streptococcus thermophilus* strains, and *Streptococcus thermophilus* – *Lactobacillus delbrueckii* strains were studied in model cheese curds (MCC) samples. MCC were prepared according to Grizon et al. (2023). Co-cultures of two *Streptococcus thermophilus* were inoculated at 3.10^6 cfu.mL⁻¹ each strain. Co-cultures of one *Streptococcus thermophilus* and one *Lactobacillus delbrueckii* strains were inoculated at 6.10^6 cfu.mL⁻¹ and 3.10^4 cfu.mL⁻¹, respectively. Interactions between *Streptococcus thermophilus* strains were studied analyzing their acidifying characteristics, as previously described (Grizon et al. 2023). *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* interactions were studied determining their growth, acidifying and proteolytic characteristics, as previously described (Grizon et al. 2023). All the characteristics of the consortia were compared to single strains characteristics.

Detection of prophages and induction assay

For the detection, evaluation of completeness (rating prophages as intact, questionable and incomplete) in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* genomes, the “Phage search tool enhanced release” (PHASTER) software was used (Arndt et al. 2016).

For induction assay, strains were grown at 42°C in 150 µl of M17 or MRS broth to an OD_{600nm} of 0.20. A second culture was used as control and mitomycin C was added at 0.5 µg.mL⁻¹ to the first culture. The two cultures were then left at 42 °C without shaking and the OD_{600nm} was measured with spectrometer SAFAS FLX-Xenius® (SAFAS, M every 10 min for 24 h.

Experimental cheese production

Starters were prepared in reconstituted skimmed milk. Notably, 10 mL of 120 g.L⁻¹ sterilized skimmed milk (LACTALIS Ingredients, Bourgbarré, France) was inoculated with isolates at 1% v/v and maintained in

a water bath at 42°C until coagulation. Milk batches for cheese production were inoculated at 6.10^6 cfu.mL⁻¹ with *Streptococcus thermophilus* (3.10^6 cfu.mL⁻¹ each strain of *Streptococcus thermophilus*) and 3.10^4 cfu.mL⁻¹ of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* for cheeses made with autochthonous starter cultures. Cheeses made with commercial starter were inoculated with 1% previously coagulated milk with CHOOZIT™ MY 800 LYO 5 DCU (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*; DANISCO, Denmark).

For cheese manufacture, the raw milk was collected in the morning and immediately transported to the INRAE experimental dairy plant at Aurillac (Cantal, France). Each vat containing 5 kg of milk heated to 33°C were inoculated with a thermophilic starter culture MY800 or autochthonous starter previously selected (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) and 2 mL of a 520 mg active rennet. The clotting time was 45 min, after which the curd was cut for 3 min, and stirred for 6 min. The curd was separated by using a mould of 210 mm diameter. The resulting curd was then placed into a mould of 130 mm diameter to shape and pressed under 1.2 bars for around ten minutes. Each cheese was then salted on the surface (13 g NaCl a side) and pressed for 7 h under 2.4 bars. Cheeses were then maintained at 20°C and 80% relative humidity for 24 hours. Each starter was tested five times in five milks from five different dairies. pH measurement was realized in the core of cheeses using a WTW pH 526 pH meter with a LOT406-M6-DXK electrode (Mettler-Toledo S.A, Viroflay, France).

Statistical analysis

Statistical analysis of data was performed using the R V 4.3.3 software. The results are reported as means ± standard deviation. The normality of the data was checked using a Shapiro–Wilk test ($p < 0.05$). The test rejected the hypothesis H_0 of normality as the p value

was ≤ 0.05 , Normal distribution was confirmed and therefore a ANOVA test and post-hoc comparison (Tukey's test) were used to compare autochthonous starters to commercial starter. Differences between the mean values were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Determination of acquired antimicrobial resistance

Most of LAB used in starter cultures employed in food applications are typically exempt from comprehensive safety assessments. This exemption is due to their status under the qualified presumption of safety (QPS) (Ricci et al. 2017). However, it is still crucial to monitor several safety aspects for these strains. One key aspect of safety assessment is ensuring the absence of acquired resistance to antibiotics that are clinically significant. This monitoring is essential to maintain the safety and efficacy of these bacteria in food applications. A careful screening of LAB for transferable antimicrobial resistance has to be investigated, as they can potentially serve as a source of antimicrobial resistance genes (Daniali et al. 2020). Bacterial strains containing antibiotic resistance genes should be avoided in human food production (Ricci et al. 2017).

ResFinder tool v.4.1 (Bortolaia et al. 2020) was used to detect genes conferring antibiotic resistance in the genome of the 17 strains, and none were detected, except for *S. thermophilus* H11bM1 in which a tetracyclin-resistant gene *tet(S)* was found. The phenotypic resistance were also determined. The microbiological breakpoint aims to identify bacterial strains harboring phenotypic resistance determinants that could potentially be transferred (Olsson-Liljequist et al. 1997). In this study, the ETEST method was utilized to evaluate the minimal inhibitory concentrations (MICs) of the nine antibiotics recommended by EFSA for all the strains. The obtained MICs for the analyzed antibiotics are presented in Table 2. Strains with a MIC equal to or

higher than the EFSA cut-off values were considered resistant. In this sense, all tested strains were found to be susceptible to ampicillin, vancomycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracyclin and chloramphenicol. Analysis of MICs values also indicated that isolates H15BR1 and 155BR2 showed a resistance phenotype to gentamicin. Gentamicin resistance stands out as one of the most thoroughly documented intrinsic resistance mechanisms within *Lactobacillus* species (Campedelli et al. 2018; de Jesus et al. 2022). Although one dilution deviation of the MIC has been reported to be within the intra-laboratory reproducibility range, in this study, these two strains were discarded for the development of the starter culture for safe reasons (Flórez and Mayo 2017; Huys et al. 2010).

High resistance to kanamycin was observed for both *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* isolates. These results are in accordance with Tavsanli et al. (2021) and Li et al. (2019) who showed a high prevalence of resistance toward kanamycin in *S. thermophilus* strains (53,80% and 100%, respectively). Shani et al. (2021) and Guo et al. (2023) reported 46.1% and 25%, respectively, of kanamycin-resistant strains among *L. delbrueckii* screened, without detection of ARGs. The former proposed an adaptation of the cut-offs values reported by EFSA for *L. delbrueckii* species, since they are actually defined for the entire group of homofermentative lactobacilli.

Interestingly, the H11bM1 strain showed a sensitive phenotype against tetracycline, despite that an ARG *tet(S)* was detected in its genome. Several genes for tetracycline resistance have been identified in *Streptococcus thermophilus* strains, including *tet(S)*, *tet(M)*, *tet(L)* and *tet(A)* (Wang et al. 2012; Ge et al. 2007; van Hoek et al. 2008; Rizzotti et al. 2009; Arioli et al. 2014). In some studies, the only presence of *tet(S)* gene in *S. thermophilus* genome was associated with phenotypic resistance, while in other studies, several genes-associated with phenotypic resistance

Sélection et assemblages de souches d'intérêt

Table 2 MICs values for nine antibiotics. R, Resistant; S, Sensitive

Strain	Ampicillin	vancomycin	Gentamycin	kanamicin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracyclin	chloranphenicol
<i>Streptococcus thermophilus</i> strains									
M134	0,016 (S)	0,25 (S)	1 (S)	16 (S)	8 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,19 (S)	1,5 (S)
19M1a	0,032 (S)	0,25 (S)	4 (S)	256 (R)	12 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	1,5 (S)
H11bM2	0,047 (S)	0,25 (S)	3 (S)	48 (S)	12 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	1,5 (S)
H26M3c	0,016 (S)	0,25 (S)	2 (S)	256 (R)	12 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,19 (S)	1,5 (S)
H23bM1	0,032 (S)	0,19 (S)	3 (S)	256 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	2 (S)
26bM1	0,094 (S)	0,25 (S)	3 (S)	96 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	2 (S)
H26bM2	0,064 (S)	0,25 (S)	4 (S)	256 (R)	12 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	1 (S)
H11M1a	0,016 (S)	0,19 (S)	2 (S)	256 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,5 (S)	1,5 (S)
26bM3	0,032 (S)	0,38 (S)	4 (S)	256 (R)	12 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,125 (S)	1,5 (S)
H20bM1	0,064 (S)	0,38 (S)	3 (S)	256 (R)	12 (S)	0,032 (S)	0,016 (S)	0,125 (S)	1 (S)
H11bM1	0,064 (S)	0,38 (S)	4 (S)	256 (R)	12 (S)	0,032 (S)	0,016 (S)	0,25 (S)	1,5 (S)
29bM2	0,032 (S)	0,25 (S)	2 (S)	256 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,016 (S)	0,38 (S)	1,5 (S)
Cutt-off	2	4	32	64	64	1	1	4	4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> strains									
H19bR1	0,016 (S)	0,38 (S)	8 (S)	256 (R)	8 (S)	0,023 (S)	0,047 (S)	0,25 (S)	1,5 (S)
H23bR3	0,032 (S)	0,5 (S)	8 (S)	256 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,023 (S)	0,125 (S)	1,5 (S)
46bR1	0,032 (S)	0,5 (S)	8 (S)	256 (R)	8 (S)	0,023 (S)	0,023 (S)	0,125 (S)	1,5 (S)
H15bR1	0,016 (S)	0,5 (S)	16 (R)	256 (R)	8 (S)	0,023 (S)	0,023 (S)	0,125 (S)	1 (S)
155bR2	0,023 (S)	0,5 (S)	16 (R)	256 (R)	8 (S)	0,016 (S)	0,023 (S)	0,25 (S)	1 (S)
73bR5	0,016 (S)	0,5 (S)	8 (S)	256 (R)	8 (S)	0,023 (S)	0,023 (S)	0,125 (S)	1,5 (S)
Cutt-off	1	2	16	16	16	2	2	4	4

were identified (Flórez and Mayo 2017; Rizzotti et al. 2009). To ensure the safety of the autochthonous starter culture, this strain will not be used in the composition of the latter.

Identification of virulence factors

Virulence factors (VFs) are genes that enhance the potential of bacteria to cause disease. This means the pathogenicity of bacteria is closely linked to their VFs, that can be categorized into two types: those that directly influence disease processes, and those that play an indirect role in pathogenesis (Guan et al. 2021). Therefore, in LAB, it is crucial to assess genes that are highly homologous to those encoding VFs, due to the potential safety risks they pose. The genomic sequences of all strains of *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* were analyzed for potential virulence genes using VFDB. There were 14 hits in total (Table 3). All 14 genes are commonly found in many bacteria, and are genes involved in indirect virulence. These potential virulence factors coded only basic cellular functional proteins. Most of these genes are associated with the biosynthesis of

exopolysaccharides, an important feature of LAB for their use as starter cultures as EPS affects the texture of cheeses (Cui et al. 2017; Che et al. 2019). Adhesion-related genes, while potentially pathogenic in certain bacteria, may not pose a threat in *S. thermophilus* and *L. delbrueckii*, known for their safe use in food production. These genes are probably more related to the strains ability to survive and colonize the gastrointestinal tract rather than causing disease (Hols et al. 2005; Tang et al. 2023; Ishikawa et al. 2022). Genes related to polysaccharide production are commonly found in many bacteria and other probiotic strains and are considered virulent only in Group B *Streptococcus* (Li et al. 2021). Accordingly, though many genes correlated with virulence factors were found in the strains, we can not consider them as really harmful.

Interactions between strains

Mixed-strain culture fermentation is an effective approach to obtain the desired product characteristics and to reduce fermentation time in most food fermentation processes. In many studies,

Sélection et assemblages de souches d'intérêt

the development of starters only relies on the abiotic interactions of the strains with the substrate.

However, studying the microbe-microbe interactions appears essential to obtain

Table 3 Virulence factors identified in *Streptococcus thermophilus* (St) and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* (Ld) genomes.

VFDB hits	St / Ld	Role	Reference
hasC – UDP-glucose pyrophosphorylase	12 / 0	Exopolysaccharide biosynthesis	(Degeest and De Vuyst 2000)
tufA – Elongation factor Tu	12 / 6	Cell adhesion	(Harvey et al. 2019)
cpsI – UDP-galactopyranose mutase	10 / 6	Exopolysaccharide biosynthesis	(Kim et al. 2021)
glf - UDP-galactopyranose mutase	7 / 0	Exopolysaccharide biosynthesis	(Kim et al. 2021)
galE - UDP-glucose 4-epimerase	12 / 0	Exopolysaccharide biosynthesis	(Padmanabhan et al. 2020)
clpP - ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	9 / 6	Proteolysis	(Boulay et al. 2021)
fbp54 - fibronectin-binding protein	12 / 0	Cell adhesion	(Chaffanel et al. 2018)
pavA - fibronectin-binding protein	12 / 0	Cell adhesion	(Chaffanel et al. 2018)
wbtL - glucose-1-phosphate thymidyltransferase	9 / 6	Exopolysaccharide biosynthesis	(Hu et al. 2020)
ureG - urease accessory protein	8 / 0	Ureolytic activity	(Mora et al. 2004)
mf2 - deoxyribonuclease, phage associated	4 / 0	Cell adhesion	(Zheng et al. 2017)
cpsD - CpsD autokinase	3 / 0	Polysaccharide production	(Hols et al. 2005)
cpsB - CpsB phosphatase	4 / 0	Polysaccharide production	(Minic et al. 2007)
cps4B - capsular polysaccharide biosynthesis protein	3 / 0	Polysaccharide production	(Minic et al. 2007)

desired characteristics (Smid and Lacroix. 2013). In this study, the 12 *Streptococcus thermophilus* strains were tested for pairwise interactions, leading to 66 combinations of two strains. A comparison of the pH drop at 6 hours and 24 hours in MCC samples fermented with pure strains and with paired-associated strains was made. The results indicated that, in most cases, there were no significant differences in the acidification process when using the most acidifying strain compared to the paired-assembled strains (data not shown). This observation suggests that no negative interactions occur when these strains were grown together or the interaction did not affect the acidification rate. However, three specific combinations (A1: H11M1a-26bM3, A2: 29bM2-H20bM1, and A3: 29bM2-H26bM2) exhibited a lower pH drop at both time intervals compared to

individual strains, as shown in Table 4. This suggests a negative interaction in these pairings, adversely affecting the fermentation process. Consequently, these strains are unsuitable for developing starter cultures. This study cannot determine the type of interactions between strains. Further research is needed to fully understand the underlying mechanisms of these interactions (Mayo et al. 2021; Ivey et al. 2013).

An important source of negative interaction between strains is a phage release after spontaneous prophage induction in lysogenic strains. However, PHASTER software did not identify “intact” prophage in the genomes of all strains studied here (Arndt et al. 2016). A mitomycin C treatment was applied to the 12 *S. thermophilus* strains to induce potential

Sélection et assemblages de souches d'intérêt

prophages even if none were detected in their genomes. A drop in OD was detected for the strain 26bM3 after mitomycin treatment. Since the lytic spectrum of the potential phage induced was not determined, this strain was excluded from the selection process.

The results indicates that the microbial dynamics in model cheese curd (MCC) appear to be generally unaffected by the presence of multiple strains of

Streptococcus thermophilus, except for three specific combinations. This observation is significant for the development of starter cultures with desirable characteristics. The ability of mixed cultures to function effectively without negative interactions is essential, especially considering that such combinations are often used in starter cultures to enhance resistance against phage attacks. This information is crucial to optimize the

Table 4 Negative interactions between *Streptococcus thermophilus* strains. ST1, first single *S. thermophilus* strain; ST2, second single *S. thermophilus* strain. A1: H11M1a-26bM3, A2: 29bM2-H20bM1, and A3: 29bM2-H26bM2

	ΔpH 6h			ΔpH 24h		
	ST 1	ST2	ST1 + ST2	ST1	ST2	ST1 + ST2
A1	1.27 ± 0.058 ^b	1.43 ± 0.058 ^a	0.63 ± 0.058 ^c	1.73 ± 0.058 ^b	1.60 ± 0.00 ^a	0.83 ± 0.058 ^c
A2	1.30 ± 0.000 ^a	1.23 ± 0.058 ^a	0.9 ± 0.000 ^b	1.87 ± 0.058 ^a	1.63 ± 0.058 ^a	1.13 ± 0.153 ^b
A3	1.30 ± 0.000 ^a	1.20 ± 0.000 ^{ab}	1.03 ± 0.153 ^b	1.87 ± 0.058 ^a	1.63 ± 0.058 ^b	1.30 ± 0.100 ^c

a-b, mean values without a common superscript in each rows are significantly different ($p < 0.05$) according to the Tukey's test.

composition of starter cultures, where the strategic use of mixed cultures plays a crucial role. Interactions between associations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* were also studied. For this, a comparison of the (i) growth kinetic, (ii) acidifying activity, (ii) proteolytic activities in MCC samples fermented with pure strains and with paired-associated strains was made. The results indicated that there were no significant differences in all of the criteria when using single strains compared to the paired-strains (data not shown). This observation suggests a neutral interaction between strains of the two species. A well-documented interaction between *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* is the proto-cooperation, leading to accelerated acidification (Markakiou et al. 2020; Sieuwerts et al. 2010). Interactions between *L. delbrueckii* subsp. *lactis* and *S. thermophilus* are less documented, although Charlet et al. (2009) observed a positive effect of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* on *Streptococcus thermophilus* growth in hard-cooked cheese production. Although positive interactions has not been observed between the SN-strains of the two species, no incompatibilities were identified, that is essential for starter culture development. One

“Intact” prophage was detected using PHASTER software in each genome of the 6 *L. delbrueckii* studied. However, no negative interaction were identified between any of the *Streptococcus thermophilus* and *Lb. delbrueckii* spp. *lactis* couples. Furthermore, no drop in OD were detected for the *Lb. delbrueckii* strains after mitomycin treatment. Further investigation is in progress to determine whether these prophages are non-inducible by increasing the amount of mitomycin C.

Selection of strains for starters

Choosing an appropriate combination of strains for a cheese starter culture is essential to ensure an optimal fermentation process, obtain the desired technological characteristics and guarantee product safety. Following a safety assessment, one *Streptococcus thermophilus* strain (H11bM1), and two *L. delbrueckii* strains (H15bR1 and 155bR1) were deemed unsuitable for use as a starter due to the presence of an antibiotic resistance gene, or phenotypic resistance. Likewise, six *S. thermophilus* strains were excluded from selection due to their adverse effects on the fermentation process, until further characterization of these interactions. The

designed consortia must contain at least two strains of *Streptococcus thermophilus* to ensure acidification and avoid phages attack (Mahony et al. 2016). The remaining 6 *S. thermophilus* strains were combined in pairs according to two criteria: (i) strains should all be from different clusters based on core- and pan-genomic analyses and (ii) strains should be isolated from different farms (Grizon et al. 2023). Twelve

combinations met these criteria. Four associations were selected and were associated with H19bR1 and/or H23bR3 *L. delbrueckii* strains for experimental characterization in cheese production (Table 5). From these associations, two consisted of medium and highly acidifying strains, one consisted of two medium acidifying strains and one consisted of two high acidifying strains.

Table 5 Consortia designed for starter culture development

Association ID	<i>S. thermophilus</i> strain 1	<i>S. thermophilus</i> strain 2	<i>L. delbrueckii</i> strain
SC1	M134	19M1a	H19bR1
SC2	19M1a	26bM1	H19bR1
SC3	H23bM1	H11bM2	H23bR3
SC4	H23bM1	H26M3c	H23bR3

Validation of acidifying properties of designed starter in experimental cheeses

The acidification effects of our custom autochthonous starter were studied in experimental raw milk cheeses production over around 24h, and these effects were compared to those of the industrial starter MY800, commonly used in Saint-Nectaire cheese production. Significant differences in the pH levels at the salting stage and at the end of the manufacturing process were observed, depending on the starter culture used ($p < 0.05$; Table 6). The pH levels for SC2, SC3, and the industrial starter were

statistically similar ($p < 0.05$) throughout all manufacturing stages, aligning with the required pH range for Saint-Nectaire cheeses. However, the pH levels for SC1 and SC4 were statistically higher ($P < 0.05$) at both the salting stage and the end of production, although differences were slight. The quality of Saint-Nectaire cheese produced using the SC2 and SC3 autochthonous starters matched the high standards of cheese produced with the industrial starter, and will be further tested in large-scale cheese production in Saint-Nectaire area dairies.

Table 6 pH values during cheese manufacturing with 4 autochthonous starters and one commercial starter

	Inoculation	Renneting	Salting	End
SC1	6.62 ± 0.056 ^a	6.55 ± 0.018 ^a	6.14 ± 0.072 ^a	5.49 ± 0.018 ^a
SC2	6.62 ± 0.056 ^a	6.53 ± 0.016 ^a	5.98 ± 0.040 ^c	5.41 ± 0.029 ^b
SC3	6.62 ± 0.056 ^a	6.53 ± 0.019 ^a	5.99 ± 0.049 ^{bc}	5.40 ± 0.042 ^b
SC4	6.62 ± 0.056 ^a	6.54 ± 0.021 ^a	6.09 ± 0.053 ^{ab}	5.48 ± 0.028 ^a
T	6.62 ± 0.056 ^a	6.53 ± 0.025 ^a	6.01 ± 0.036 ^{bc}	5.40 ± 0.011 ^b
p-value	ns	ns	***	***

^{a-b}Means in a column sharing common superscripts are similar as tested by Tukey test ($P < 0.05$); *** $p < 0.001$

Conclusion

Two autochthonous starters (SC2 and SC3), comprising 2 *Streptococcus thermophilus* strains and 1 *Lactobacillus delbrueckii* strain in each starter, were chosen for their technological attributes and safety aspects. They were successfully utilized to consistently produce Saint-Nectaire cheese, yielding

pH results comparable to those achieved with an industrial starter. To be used instead of an industrial starter, further investigations are needed in large-scale production. Cheese productions are underway, up to a four-week ripening period. The physico-chemical (pH, proteolysis, dry matter, fat content), microbiological and sensory characteristics of the cheeses will be studied in cheeses made with SC2 and

Sélection et assemblages de souches d'intérêt

SC3 starters, in comparison with batches produced using commercial starter. More complex combinations will also be studied.

References

- Arioli, S.;** Guglielmetti, S.; Amalfitano, S.; Viti, C.; Marchi, E.; Decorosi, F.; Giovannetti, L.; Mora, D. Characterization of tetA-like Gene Encoding for a Major Facilitator Superfamily Efflux Pump in *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2014, 355, 61–70, doi:10.1111/1574-6968.12449.
- Arndt, D.;** Grant, J.R.; Marcu, A.; Sajed, T.; Pon, A.; Liang, Y.; Wishart, D.S. PHASTER: A Better, Faster Version of the PHAST Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, W16–W21, doi:10.1093/nar/gkw387.
- Bortolaia, V.;** Kaas, R.S.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesoe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.F.; et al. ResFinder 4.0 for Predictions of Phenotypes from Genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020, 75, 3491–3500, doi:10.1093/jac/dkaa345.
- Boulay, M.;** Metton, C.; Mézange, C.; Oliveira Correia, L.; Meylheuc, T.; Monnet, V.; Gardan, R.; Juillard, V. Three Distinct Proteases Are Responsible for Overall Cell Surface Proteolysis in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021, 87, e0129221, doi:10.1128/AEM.01292-21.
- Campebelli, I.;** Mathur, H.; Salvetti, E.; Clarke, S.; Rea, M.C.; Torriani, S.; Ross, R.P.; Hill, C.; O'Toole, P.W. Genus-Wide Assessment of Antibiotic Resistance in *Lactobacillus spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 85, e01738-18, doi:10.1128/AEM.01738-18.
- Chaffanel, F.;** Charron-Bourgoin, F.; Soligot, C.; Kebouchi, M.; Bertin, S.; Payot, S.; Le Roux, Y.; Leblond-Bourget, N. Surface Proteins Involved in the Adhesion of *Streptococcus salivarius* to Human Intestinal Epithelial Cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102, 2851–2865, doi:10.1007/s00253-018-8794-y.
- Che, H.;** Zhang, H.; Tian, Y.; Lai, P.F.H.; Xia, Y.; Wang, S.; Ai, L. Exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* as Stabilizer in Fermented Dairy: Binding Kinetics and Interactions with Casein of Milk. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019, 140, 1018–1025, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.08.146.
- Chen, L.;** Yang, J.; Yu, J.; Yao, Z.; Sun, L.; Shen, Y.; Jin, Q. VFDB: A Reference Database for Bacterial Virulence Factors. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, D325–D328, doi:10.1093/nar/gki008.
- Corbo, M.R.;** Racioppo, A.; Monacis, N.; Speranza, B. Commercial Starters or Autochthonous Strains? That Is the Question. In *Starter Cultures in Food Production*; John Wiley & Sons, Ltd, 2017; pp. 174–198 ISBN 978-1-118-93379-4.
- Couderc, C.;** Laroute, V.; Coddeville, M.; Caillaud, M.-A.; Jard, G.; Raynaud, C.; Coccagn-Bousquet, M.; Tormo, H.; Daveran-Mingot, M.-L. Harnessing Diversity of *Lactococcus lactis* from Raw Goat Milk: Design of an Indigenous Starter for the Production of Rocamadour, a French PDO Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2022, 379, 109837, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109837.
- Cui, Y.;** Jiang, X.; Hao, M.; Qu, X.; Hu, T. New Advances in Exopolysaccharides Production of *Streptococcus thermophilus*. *Arch. Microbiol.* 2017, 199, 799–809, doi:10.1007/s00203-017-1366-1.
- Daniali, M.;** Nikfar, S.; Abdollahi, M. Antibiotic Resistance Propagation through Probiotics. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2020, 16, 1207–1215, doi:10.1080/17425255.2020.1825682.
- de Jesus, L.C.L.;** de Jesus Sousa, T.; Coelho-Rocha, N.D.; Profeta, R.; Barroso, F.A.L.; Drumond, M.M.; Mancha-Agresti, P.; Ferreira, Ê.; Brenig, B.; Aburjaile, F.F.; et al. Safety Evaluation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CIDCA 133: A Health-Promoting Bacteria. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 2022, 14, 816–829, doi:10.1007/s12602-021-09826-z.
- Degeest, B.;** De Vuyst, L. Correlation of Activities of the Enzymes α -Phosphoglucomutase, UDP-Galactose 4-Epimerase, and UDP-Glucose Pyrophosphorylase with Exopolysaccharide Biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 3519–3527.
- Flórez, A.B.;** Mayo, B. Antibiotic Resistance-Susceptibility Profiles of *Streptococcus thermophilus* Isolated from Raw Milk and Genome Analysis of the Genetic Basis of Acquired Resistances. *Front. Microbiol.* 2017, 8.
- Ge, B.;** Jiang, P.; Han, F.; Saleh, N.K.; Dhiman, N.; Fedorko, D.P.; Nelson, N.A.; Meng, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Lactic Acid Bacteria from Retail Fermented Foods. *J. Food Prot.* 2007, 70, 2606–2612, doi:10.4315/0362-028X-70.11.2606.

- Grizon, A.;** Theil, S.; Callon, C.; Gerber, P.; Helinck, S.; Dugat-Bony, E.; Bonnarme, P.; Chassard, C. Genetic and Technological Diversity of *Streptococcus thermophilus* Isolated from the Saint-Nectaire PDO Cheese-Producing Area. *Front. Microbiol.* 2023, 14.
- Grizon, A.;** Theil, S.; Helinck, S.; Gerber, P.; Bonnarme, P.; Chassard, C. Genomic Characterization of Wild *Lactobacillus delbrueckii* Strains Reveals Low Diversity but Strong Typicity. *Microorganisms* 2024, 12, 512, doi:10.3390/microorganisms12030512.
- Guan, Y.;** Cui, Y.; Qu, X.; Jing, K. Safety and Robustness Aspects Analysis of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LDB-C1 Based on the Genome Analysis and Biological Tests. *Arch. Microbiol.* 2021, 203, 3955–3964, doi:10.1007/s00203-021-02383-7.
- Guo, L.;** Xu, W.-L.; Li, C.-D.; Wang, F.-C.; Guo, Y.-S.; Ya, M. Determination of the Microbial Community of Traditional Mongolian Cheese by Using Culture-Dependent and Independent Methods. *Food Sci. Nutr.* 2023, 11, 828–837, doi:10.1002/fsn3.3117.
- Harvey, K.L.;** Jarocki, V.M.; Charles, I.G.; Djordjevic, S.P. The Diverse Functional Roles of Elongation Factor Tu (EF-Tu) in Microbial Pathogenesis. *Front. Microbiol.* 2019, 10.
- Hols, P.;** Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond-Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.; Dusko Ehrlich, S.; et al. New Insights in the Molecular Biology and Physiology of *Streptococcus thermophilus* Revealed by Comparative Genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29, 435–463, doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.008.
- Hu, T.;** Cui, Y.; Zhang, Y.; Qu, X.; Zhao, C. Genome Analysis and Physiological Characterization of Four *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. *Front. Microbiol.* 2020, 11.
- Huys, G.;** D'Haene, K.; Cnockaert, M.; Tosi, L.; Danielsen, M.; Flórez, A.B.; Mättö, J.; Axelsson, L.; Korhonen, J.; Mayrhofer, S.; et al. Intra- and Interlaboratory Performances of Two Commercial Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Bifidobacteria and Nonenterococcal Lactic Acid Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54, 2567–2574, doi:10.1128/AAC.00407-10.
- Ishikawa, H.;** Kuno, Y.; Kohda, C.; Sasaki, H.; Nagashima, R.; Iyoda, M. Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1 Prevent Influenza Virus Infection and Attenuate Secondary Bacterial Infection Risk. *Lett. Appl. Microbiol.* 2022, 74, 632–639, doi:10.1111/lam.13649.
- Ivey, M.;** Massel, M.; Phister, T.G. Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2013, 4, 141–162, doi:10.1146/annurev-food-022811-101219.
- Kim, M.-S.;** Min, B.; Kim, I.; Kwon, Y.-J.; Park, S.-Y.; Kim, B.-Y.; Kim, B.-K.; Park, S.S. Complete Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis of *Streptococcus thermophilus* CKDB027, a Promising Probiotic Bacterial Strain. *Food Suppl. Biomater. Health* 2021, 1, doi:10.52361/fsbh.2021.1.e28.
- Le Gall, P.** Gouverner La Qualité Des Productions Fromagères En Auvergne : Approche Systémique Des Appellations d'Origine, de l'après-Guerre à Nos Jours. These de doctorat, Lyon, 2021.
- Li, X.;** Fields, F.R.; Ho, M.; Marshall-Hudson, A.; Gross, R.; Casser, M.E.; Naito, M. Safety Assessment of *Streptococcus salivarius* DB-B5 as a Probiotic Candidate for Oral Health. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 2021, 153, 112277, doi:10.1016/j.fct.2021.112277.
- Li, Y.;** Li, L.; Kromann, S.; Chen, M.; Shi, L.; Meng, H. Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* Spp. and *Streptococcus thermophilus* Isolated from Chinese Fermented Milk Products. *Foodborne Pathog. Dis.* 2019, 16, 221–228, doi:10.1089/fpd.2018.2516.
- Mahony, J.;** McDonnell, B.; Casey, E.; van Sinderen, D. Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2016, 7, 267–285, doi:10.1146/annurev-food-041715-033322.
- Markakiou, S.;** Gaspar, P.; Johansen, E.; Zeidan, A.A.; Neves, A.R. Harnessing the Metabolic Potential of *Streptococcus thermophilus* for New Biotechnological Applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020, 61, 142–152, doi:10.1016/j.copbio.2019.12.019.
- Mayo, B.;** Rodríguez, J.; Vázquez, L.; Flórez, A.B. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety.

- Foods 2021, 10, 602, doi:10.3390/foods10030602.
- Minic, Z.;** Marie, C.; Delorme, C.; Faurie, J.-M.; Mercier, G.; Ehrlich, D.; Renault, P. Control of EpsE, the Phosphoglycosyltransferase Initiating Exopolysaccharide Synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD Tyrosine Kinase. *J. Bacteriol.* 2007, 189, 1351–1357, doi:10.1128/jb.01122-06.
- Mora, D.;** Maguin, E.; Masiero, M.; Parini, C.; Ricci, G.; Manachini, P.L.; Daffonchio, D. Characterization of Urease Genes Cluster of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 96, 209–219, doi:10.1046/j.1365-2672.2003.02148.x.
- Munekata, P.E.S.;** Chaves-Lopez, C.; Fernandez-Lopez, J.; Viuda-Martos, M.; Sayas-Barbera, M.E.; Perez-Alvarez, J.A.; Lorenzo, J.M. Autochthonous Starter Cultures in Cheese Production – A Review. *Food Rev. Int.* 2023, 39, 5886–5904, doi:10.1080/87559129.2022.2097691.
- Olsson-Liljequist, B.;** Larsson, P.; Walder, M.; Miörner, H. Antimicrobial Susceptibility Testing in Sweden. III. Methodology for Susceptibility Testing. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 1997, 105, 13–23.
- Padmanabhan, A.;** Tong, Y.; Wu, Q.; Lo, C.; Shah, N.P. Proteomic Analysis Reveals Potential Factors Associated with Enhanced EPS Production in *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Sci. Rep.* 2020, 10, 807, doi:10.1038/s41598-020-57665-9.
- Ricci, A.;** Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.; Girones, R.; Koutsoumanis, K.; Lindqvist, R.; Norrung, B.; Robertson, L.; et al. Update of the List of QPS-Recommended Biological Agents Intentionally Added to Food or Feed as Notified to EFSA 6: Suitability of Taxonomic Units Notified to EFSA until March 2017. *EFSA J.* 2017, 15, 4884, doi:10.2903/j.efsa.2017.4884.
- Rizzotti, L.;** La Gioia, F.; Dellaglio, F.; Torriani, S. Characterization of Tetracycline-Resistant *Streptococcus thermophilus* Isolates from Italian Soft Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 4224–4229, doi:10.1128/AEM.01380-08.
- Shani, N.;** Oberhaensli, S.; Berthoud, H.; Schmidt, R.S.; Bachmann, H.-P. Antimicrobial Susceptibility of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* from Milk Products and Other Habitats. *Foods Basel Switz.* 2021, 10, 3145, doi:10.3390/foods10123145.
- Sieuwerths, S.;** Molenaar, D.; van Hijum, S.A.F.T.; Beerthuyzen, M.; Stevens, M.J.A.; Janssen, P.W.M.; Ingham, C.J.; de Bok, F.A.M.; de Vos, W.M.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 7775–7784, doi:10.1128/AEM.01122-10.
- Smid, E.J.;** Lacroix, C. Microbe–Microbe Interactions in Mixed Culture Food Fermentations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013, 24, 148–154, doi:10.1016/j.copbio.2012.11.007.
- Tang, J.;** Peng, X.; Liu, D.; Xu, Y.; Liang, M.; Xiong, J.; Wu, J. Assessment of the Safety and Probiotic Properties of *Lactobacillus delbrueckii* DMLD-H1 Based on Comprehensive Genomic and Phenotypic Analysis. *LWT* 2023, 184, 115070, doi:10.1016/j.lwt.2023.115070.
- Tavsanli, H.;** Elal Mus, T.; Cetinkaya, F.; Ayanoglu, E.; Cibik, R. Isolation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from Nature: Technological Characterisation and Antibiotic Resistance. *Czech J. Food Sci.* 2021, 39, 305–311, doi:10.17221/296/2020-CJFS.
- van Hoek, A.;** Margolles, A.; Domig, K.; Korhonen, J.; Zycka-Krzesinska, J.; Bardowski, J.; Danielsen, M.; Huys, G.; Morelli, L.; Aarts, H. Molecular Assessment of Erythromycin and Tetracycline Resistance Genes in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria and Their Relation to the Phenotypic Resistance. *Int. J. Probiotics Prebiotics* 2008, 3, 271–280.
- Wang, H.;** McEntire, J.C.; Zhang, L.; Li, X.; Doyle, M. The Transfer of Antibiotic Resistance from Food to Humans: Facts, Implications and Future Directions. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 2012, 31, 249–260, doi:10.20506/rst.31.1.2117.
- Zheng, W.;** Tan, M.F.; Old, L.A.; Paterson, I.C.; Jakubovics, N.S.; Choo, S.W. Distinct Biological Potential of *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis* Revealed by Comparative Genome Analysis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 2949, doi:10.1038/s41598-017-02399-4.

VI - Discussion générale

La typicité des fromages artisanaux se définit par l'ensemble des caractéristiques organoleptiques distinctives associées à chaque variété (Cardin et al. 2022). L'origine de cette typicité provient d'une combinaison unique de facteurs humains et naturels associés à un terroir spécifique. Les matières premières, les outils, l'environnement de production, les conditions de fabrication et l'origine géographique influencent le caractère typique de chaque fromage artisanal (Picon. 2017). Parmi les facteurs associés à la typicité, l'impact de la diversité microbienne des laits crus et des fromages a été largement démontré (Penland et al. 2021; Delcenserie et al. 2014; Aldrete-Tapia et al. 2014). L'utilisation de ferments commerciaux dans la fabrication de fromages artisanaux est associée à une réduction de la variabilité du microbiote fromager et ainsi, à une uniformisation des produits finaux (Corbo et al. 2017). Utiliser la richesse et l'empreinte microbienne particulière des laits crus et des fromages pour développer des ferments autochtones est un vrai atout pour assurer la reproductibilité des fabrications sans en perdre leur typicité (Silvetti et al. 2017). En outre, le choix des espèces qui composeront le ferment autochtone dépend en priorité des habitudes des producteurs fromagers, afin d'assurer un maintien des pratiques de fabrications. Dans le cas de l'AOP Saint-Nectaire, la fabrication implique exclusivement des ferments commerciaux thermophiles, constitués des espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. Le ferment lactique acidifiant développé dans ce projet s'est donc basé sur une composition identique, et la caractérisation des souches s'est focalisée sur leurs profils acidifiants et leurs activités protéolytiques (marqueur de texture et d'arômes).

VI.1. Isolement et caractérisation de la diversité génétique et fonctionnelle de souches sauvages de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii*

Le développement du ferment a été initié par l'étude de la diversité des souches isolées sur la zone AOP Saint-Nectaire afin d'identifier celles présentant une typicité propre à la zone et possédant les caractéristiques technologiques clés recherchées (Chapitre III et IV). Une forte variabilité génétique et technologique indépendante du lieu d'isolement et/ou de la saison a été observée au sein des souches locales de *Streptococcus thermophilus*. L'origine de la diversité provenait, comme attendu, du contenu en gènes accessoires et de leurs fonctions. En outre, l'ensemble des souches locales possédaient des gènes associés à des fonctions identifiées comme intéressantes dans le cadre de la production fromagère. En effet, les gènes accessoires des différentes souches semblaient impliqués dans le transport et l'utilisation des glucides, lipides, et protéines, dans la résistance aux facteurs de stress environnementaux et/ou dans la résistance aux éléments génétiques étrangers tels que les phages, qui sont autant de caractéristiques potentielles désirées dans le cadre de la production fromagère. La diversité des souches isolées s'est également observée dans leurs profils acidifiants, puisque les différentes souches présentaient des phénotypes acidifiants plus ou moins rapides (abaissement de pH de plus d'une unité en six heures de fermentation), et des activités faiblement, moyennement ou fortement acidifiantes. Certaines souches autochtones présentaient des caractéristiques acidifiantes similaires ou supérieures aux souches

commerciales étudiées, tout en possédant une typicité d'un point de vue génomique (se différenciant des ferments commerciaux sur la base de leur contenu et fonction en gènes accessoires).

L'étude de la diversité des souches locales de *Lactobacillus delbrueckii* a démontré, au contraire, une faible variabilité génétique puisque les souches se différençaient peu entre elles, sur la base des analyses de core-genome et de pan-génome. Les résultats phénotypiques ont également montré peu de variabilité d'activités protéolytiques. Certaines souches se distinguaient toutefois sur leur capacité à produire d'importants composés aromatiques volatils lors des premières 24 heures de culture.

Ces deux premières études ont apporté des réponses pour les premières questions de recherche « **Peut-on isoler et caractériser la diversité génétique et technologique d'espèces de bactéries lactiques sur une petite aire de production fromagère ? La diversité isolée est-elle variable selon la saison d'isolement ? Permet-elle de répondre aux besoins technologiques pour développer de nouveaux ferments ?** ».

Une forte variabilité génétique et fonctionnelle indépendante de la saison d'isolement a été observée au sein des souches locales de *Streptococcus thermophilus*. Au contraire, les souches de *Lactobacillus delbrueckii* isolées présentaient une importante homogénéité tant d'un point de vue génomique que technologique. Dans les deux cas, la première étape a permis l'isolement de souches possédant des caractéristiques technologiques intéressantes et recherchées pour le développement d'un ferment lactique autochtone.

Plusieurs informations ont pu être mises en lien avec les résultats obtenus pour l'espèce *Lactobacillus delbrueckii*. Premièrement, il est important de noter que l'origine géographique et l'évolution génomique des souches semblent être intimement liées chez certaines espèces. Une étude menée par Song et al. (2021) a démontré une très forte influence de l'origine géographique de souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sur leur regroupement phylogénétique. La sous-espèce *L. delbrueckii* subsp. *lactis* a été plus rarement étudiée. Néanmoins, Giraffa et al. (2004) ont reporté une corrélation entre clusters formés par une analyse d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD-PCR) et les sources ou la période d'isolement de souches apparentées à cette sous-espèce. Deuxièmement, la faible variabilité au sein des souches isolées dans ce projet pourrait provenir de la méthode d'isolement, basée sur un seul milieu de culture peu sélectif (MRS) bien qu'il soit utilisé en routine. La faible diversité isolée pourrait également indiquer que *Lactobacillus delbrueckii* n'est pas une espèce clé associée à la typicité des laits et fromages de la zone AOP Saint-Nectaire. Enfin, les souches isolées et caractérisées pourraient provenir d'un ancêtre commun issu d'un ferment commercial à l'origine, et ayant évolué pour s'adapter au terroir Saint-Nectaire.

Récemment, des auteurs ont proposé des méthodes d'analyse intégrant le pan-génome à la méta-génomique qui ont conduit à la découverte d'une importante diversité génomique (Zhong et al. 2021; Zhai et Wei. 2022). De telles stratégies pourraient être appliquées dans le cadre du développement de ferments autochtones en amont de l'isolement, pour répondre aux limites citées précédemment. Ces méthodes permettraient i) de déterminer la diversité inter- et intra-espèce, ii) de déterminer l'impact du lieu d'isolement sur la diversité (en l'associant avec des génomes et méta-génomes publics pour lesquels

des données de lieu sont disponibles) et iii) d'identifier les espèces clés associées à la typicité des fromages à isoler.

Finalement, la diversité observée dépend probablement des espèces de BL typiques constituant les laits et fromages d'une zone. Une étape d'identification en amont de l'isolement apparaît alors essentielle pour sélectionner spécifiquement les espèces clés présentant une forte variabilité génétique et technologique associée à une typicité importante, qui sont les facteurs clés du développement d'un ferment autochtone.

VI.2. Sélection et assemblages de consortia d'intérêt technologique

L'utilisation des bactéries lactiques pour l'alimentation humaine conduit à d'importantes questions concernant la sécurité des consommateurs. Aussi, de plus en plus d'efforts sont voués à s'assurer d'une utilisation saine des souches constituant les ferments lactiques. Parmi les facteurs de risques, la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques dans le microbiote intestinal est une menace importante pour la santé publique (Li et al. 2020). En effet, les microorganismes colonisant le tractus intestinal sont en contact direct avec les bactéries ingérées lors de la consommation de fromage, facilitant le transfert d'éléments génétiques mobiles portant potentiellement des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces résistances peuvent se transmettre *via* les mêmes mécanismes à d'éventuelles bactéries pathogènes (Gueimonde et al. 2013; Peng et al. 2023). De nombreux gènes de résistance ont été identifiés dans différentes espèces de bactéries, permettant désormais l'identification facilitée de souches à risques par séquençage génomique. Les facteurs de virulence sont définis comme des gènes associés au potentiel de certaines bactéries à provoquer des maladies (Guan et al. 2021). L'absence de gènes codant pour des facteurs de virulence au sein des génomes est donc également indispensable pour l'utilisation des souches en tant que ferment lactique.

La seconde partie du projet a intégré l'identification de gènes de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence afin de s'assurer d'une sélection sécurisée des souches pour le développement du ferment lactique. Les facteurs de virulence identifiés par la base de données utilisée étaient associés au métabolisme basique des bactéries lactiques, et n'étaient pas impliqués dans une potentielle pathogénicité directe. Au contraire, ces gènes présentaient, pour la plupart, un intérêt certain dans le cadre d'une fabrication fromagère. L'analyse génétique et phénotypique d'éventuelles résistances aux antibiotiques a abouti à l'identification d'une souche possédant un gène de résistance sans démontrer de résistance phénotypique (H11bM1), et de deux souches possédant des résistances phénotypiques peu distribuées au sein des souches étudiées, mais sans identification de gènes spécifiques dans leurs génomes (H15BR1 et 155BR2). Afin d'éviter un potentiel transfert de résistances, ces souches ont été écartées pour la constitution du ferment autochtone. Une résistance phénotypique a également été observée dans les génomes de l'ensemble des souches *L. delbrueckii* et dans 75 % des souches *S. thermophilus*. La résistance à cet antibiotique est fréquemment identifiée chez ces deux espèces (Tavsanlı

et al. 2021 ; Guo et al. 2023), et n'est donc pas considérée dans le choix des souches pour constituer les ferments.

Les interactions entre les communautés microbiennes sont nombreuses et peuvent être coopératives ou compétitives. En technologie fromagère, les interactions microbiennes sont d'importants facteurs influençant les caractéristiques et la qualité des produits (Blaya et al. 2018; Mayo et al. 2021). Dans le cas d'une mise au point de ferments lactiques, il est important de prendre en compte les interactions entre les souches et de déterminer la nature positive ou négative de ces interactions en évaluant leur impact sur les caractéristiques des productions. Certains auteurs ont rapporté des inhibitions croisées de souches d'une même espèce lors d'un développement de ferments autochtones (Tidona et al. 2020; Couderc et al. 2022). Ces inhibitions peuvent provenir de substances métaboliques ou composés antimicrobiens produits par l'une des composantes du consortium, mais peuvent également être le résultat d'une induction spontanée de prophages provenant d'une souche lysogène (O'Connor et al. 2020; Rodriguez-Valera et al. 2009). A l'inverse, de nombreuses interactions positives et corrélées à d'importantes caractéristiques fonctionnelles ont pu être mises en évidence entre certaines espèces. Particulièrement, la protocoopération entre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a été largement décrite. Le métabolisme de chacune de ces bactéries aboutit à un échange de métabolites bénéfiques pour les deux espèces, ce qui conduit à une acidification plus importante du lait (Sieuwert et al. 2010).

Dans ce projet, l'impact des interactions croisées entre paires de *Streptococcus thermophilus* a été évalué. Trois paires ont montré des interactions aboutissant à des défauts d'acidification lors des premières 24 heures de fermentation, alors qu'aucune souche ne semblait lysogène. En revanche, les différentes cocultures entre les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii* n'ont pas influencé l'acidification ou la protéolyse. Ces résultats ont permis de sélectionner les souches non-compétitives pour la production du ferment.

Quatre ferments autochtones ont ensuite été constitués, rassemblant chacun deux souches de *S. thermophilus* et une souche de *L. delbrueckii*. Deux des quatre ferments présentaient un profil acidifiant identique au ferment de référence, avec des pH dans la plage de valeurs attendues pour la production de Saint-Nectaire. Ces deux ferments ont été finalement sélectionnés pour des essais en fabrications fromagères fermières (Table 5).

Table 5 Ferments autochtones sélectionnés pour les essais fermiers

Ferment autochtone	<i>S. thermophilus</i> 1	<i>S. thermophilus</i> 2	<i>L. delbrueckii</i>
SC2	19M1a	26bM1	H19bR1
SC3	H23bM1	H11bM2	H23bR3

Ensemble, les trois différentes études ont apporté des réponses pour la deuxième question de recherche « **Comment développer une approche pour sélectionner et assembler des consortia microbiens d'intérêt technologique en fabrication fromagère ?** ». L'approche utilisée dans ce projet consistait à

évaluer la diversité intra-espèce disponible sur l'aire géographique délimitée par le cahier des charges de l'AOP Saint-Nectaire. Les données ont apporté des indications sur la typicité des souches, et sur la variabilité importante qui peut être valorisée au sein d'un ferment autochtone. En couplant ces données avec une analyse de l'utilisation sécurisée des souches ainsi que l'impact des interactions sur une matrice proche du fromage, une sélection rationnelle des souches a pu être effectuée. **La sélection** des souches s'est focalisée sur les caractéristiques technologiques intéressantes des différentes souches, leur utilisation saine pour l'alimentation humaine et leur capacité à croître en assemblage sans impacter la fermentation alors que **les assemblages** ont pris en compte la diversité des souches, puisque des critères ont été établis sur la base des données génomiques pour constituer les consortia.

Dans le projet présenté dans cette thèse, uniquement des ferments simples ont été assemblés (trois souches de deux espèces différentes). Afin d'optimiser l'impact d'un ferment autochtone sur la typicité des fromages, il serait intéressant de constituer des assemblages complexes, en utilisant la diversité totale isolée. En d'autres termes, un critère supplémentaire pourrait être intégré pour constituer un ferment rassemblant le plus de souches possibles possédant les caractéristiques de sélection citées dans l'article 3, sans se limiter à l'utilisation de quelques souches seulement. Les ferments autochtones ainsi développés présenteraient l'avantage d'enrichir la typicité des produits locaux en valorisant les ressources microbiennes locales par l'utilisation de la diversité spécifique d'un terroir. L'utilisation d'une diversité importante en complément de rotations, réduit la sensibilité des ferments lactiques envers les phages (Romero et al. 2020). En constituant plusieurs assemblages rassemblant les différents critères précédemment définis, la robustesse des ferments contre les attaques phagiques pourrait être significativement améliorée.

Les méthodes de développement de ferments autochtones actuelles reposent principalement sur les interactions abiotiques, entre les microorganismes et la matrice. Or, les interactions biotiques entre les différentes composantes des ferments peuvent impacter significativement les caractéristiques des fromages (ex : saveurs, texture, aspect) (Mayo et al. 2021). L'étude de ces interactions peut s'appuyer sur les principes de l'ingénierie écologique ascendante, qui tient compte des interactions biotiques au sein des consortia (Lawson et al. 2019). En utilisant ces méthodes, les interactions au sein d'écosystèmes microbiens peuvent être prédites en utilisant des outils de reconstruction de réseaux métaboliques à partir de génomes (Belcour et al. 2020). Les interactions peuvent ensuite être étudiées *in caseo* en utilisant différents outils de multi-omiques. Récemment, des auteurs ont utilisé des outils génomiques, de modélisation métabolique à l'échelle du génome, de métabolomique et de méta-transcriptomique, et ont mis en évidence des interactions positives entre des souches de *S. thermophilus* et *Lactococcus* constituant un ferment, dans le cadre d'une production de Cheddar (Melkonian et al. 2023). L'utilisation des principes de l'ingénierie écologique ascendante pour cette étude a permis de mettre en évidence que l'activité protéolytique de l'espèce *S. thermophilus* profitait à la croissance de *Lactococcus*, stimulait la production *de novo* de nucléotides et impactait les caractéristiques sensorielles des fromages. Les interactions ont été identifiées comme souches-dépendantes, soulignant le rôle crucial des interactions

Discussion générale

microbiennes coopératives ou compétitives sur le profil aromatique des fromages, et appuyant l'importance d'identifier et de caractériser les interactions pour le développement d'un ferment.

VI.3. Identification des étapes clés pour le développement des ferments autochtones

L'ensemble des chapitres présentés dans cette thèse ont permis de mettre en place une démarche permettant le développement de ferments autochtones, et d'apporter des réponses à la troisième question de recherche « **Comment définir des clés susceptibles de généraliser la démarche pour le développement de ferments lactiques autochtones ?** ». La démarche globale proposée par ce projet est schématisée dans la Figure 8.

Une collaboration entre les professionnels fromagers et les scientifiques paraît indispensable dans le cadre d'une telle démarche. Une identification des habitudes de production et des besoins spécifiques pour les fabrications est primordiale dans les premières étapes pour orienter l'isolement et les critères de sélection des souches autochtones. Il convient alors de déterminer les fonctions technologiques que doivent remplir les ferments à développer, afin d'orienter les analyses de sélection et de cribler les fonctions métaboliques cibles des souches isolées.

Dans ce projet, le choix a été fait de constituer le ferment autochtone sur la base des compositions de ferments commerciaux utilisés couramment en production de Saint-Nectaire, à savoir les espèces thermophiles *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii*. Ces espèces ont été définies après avoir interrogé les producteurs fromagers, afin de s'approcher au plus près des habitudes de fabrications quotidiennes. Cependant, le Saint-Nectaire est un fromage à pâte pressée non cuite, dont les températures utilisées au cours de la fabrication n'excèdent pas 33 °C. L'usage de souches mésophiles semblerait donc plus adapté, mais n'est pas bien accepté par les producteurs. A la suite du développement du ferment basé sur les espèces définies dans ce projet, plusieurs ouvertures sont envisageables. Le ferment constitué des deux espèces *S. thermophilus* et *L. delbrueckii* pourrait être enrichi en intégrant des espèces lactiques secondaires (NSLAB). De nombreux auteurs ont utilisé des espèces mésophiles hétérofermentaires dans la composition de ferments autochtones, et ont rapporté un effet positif sur la protéolyse, la lipolyse, la production de composés aromatiques volatils et sur les caractéristiques organoleptiques des fromages (Araújo-Rodrigues et al. 2023; Ruvalcaba-Gómez et al. 2022; Cuffia et al. 2020; González 2012; Settanni et Moschetti. 2010). Lors de la campagne d'isolement, des souches de *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus* et *Lacticaseibacillus rhamnosus* ont été isolées de laits provenant de la zone AOP Saint-Nectaire. Ces espèces font partie de la catégorie des flores lactiques secondaires et peuvent contribuer au développement de saveurs typiques de nombreux fromages (Settanni et Moschetti. 2010). Ces souches pourraient donc être caractérisées et éventuellement intégrées dans la composition d'un ferment autochtone pour la production de fromage Saint-Nectaire. Une seconde ouverture envisageable serait le remplacement des espèces thermophiles par des ferments lactiques mésophiles constitués de souches de *Lactococcus lactis*, également isolées de la zone AOP. En revanche, au moment de la rédaction de ce manuscrit, les échanges avec les producteurs indiquent qu'ils ne seraient pas prêts à remplacer les ferments thermophiles par des mésophiles. Un travail important de confiance doit donc s'établir à l'aide des ferments autochtones qui leur seront

proposés, afin de les amener à substituer graduellement les souches thermophiles par des souches mésophiles, mieux adaptées à la production de fromages Saint-Nectaire.

Les démarches de sélection et d'assemblages sont détaillées dans le paragraphe précédent. Actuellement, de nombreuses études portant sur le développement de ferments autochtones focalisent leur recherche sur une caractérisation phénotypique des souches isolées. Une caractérisation technologique des souches demeure indispensable pour répondre aux besoins spécifiques des fabrications fromagères. La démarche proposée dans ce manuscrit implique en complément une caractérisation génétique des souches par l'étude de la diversité en utilisant le pan-génome. Comme indiqué précédemment, l'utilisation des outils génomiques pour évaluer la diversité des souches locales permet d'utiliser les bactéries à l'origine de la typicité des produits de terroir. Ainsi, les ferments développés remplissent les fonctions désirées telles qu'identifiées en amont, mais participent également au maintien de la diversité microbienne locale et de la typicité des produits régionaux.

Les assemblages constitués doivent ensuite passer par une étape de validation *in caseo* en fromagerie expérimentale et/ou fermière. Les principaux indicateurs de fabrication et d'affinage sont suivis et comparés à des fromages fabriqués selon les méthodes habituelles (ferment commercial ou naturel). Ces indicateurs peuvent inclure un suivi de pH et de protéolyse, associés à des analyses de texture. L'impact des ferments autochtones sur la diversité microbienne des fromages peut également être étudié au cœur et à la surface des fromages. Des tests sensoriels et aromatiques peuvent également compléter la validation des ferments autochtones. A ce stade, il s'agit de confirmer s'il convient de transférer les solutions microbiologiques développées sur le terrain en productions fromagères.

La validation en fabrications fermières des ferments développés dans ce projet n'est pas présentée dans ce manuscrit, car les fromages sont en cours de fabrication et d'analyse. Les ferments autochtones seront comparés aux ferments commerciaux prioritairement sur leur capacité d'acidification (suivi de pH), leur impact sur la texture (suivi rhéologique par évaluation de la force), sur la diversité microbienne à cœur et en surface des fromages (méthodes culture-dépendantes et métabarcoding), sur la couleur des fromages (colorimétrie), sur la production de composés aromatiques volatils (GC-MS) et sur les caractéristiques sensorielles des fromages (profils sensoriels).

Le projet présenté dans ce manuscrit consistait à **développer une méthode de sélection et d'assemblage de ferments autochtones pour un déploiement rapide et adapté à de nombreuses variétés fromagères**. Afin de proposer une démarche accessible, l'ensemble des outils d'analyses génomiques associés à l'étude du pan-génome sont aisément disponibles en ligne. Les outils sont détaillés dans les sections Matériel et méthodes des articles 2 et 3 et l'analyse des données générées par ces outils est entièrement réalisable sur le programme statistique et scientifique R. Le script utilisé a été publié pour permettre une reproduction de la démarche (Article 2).

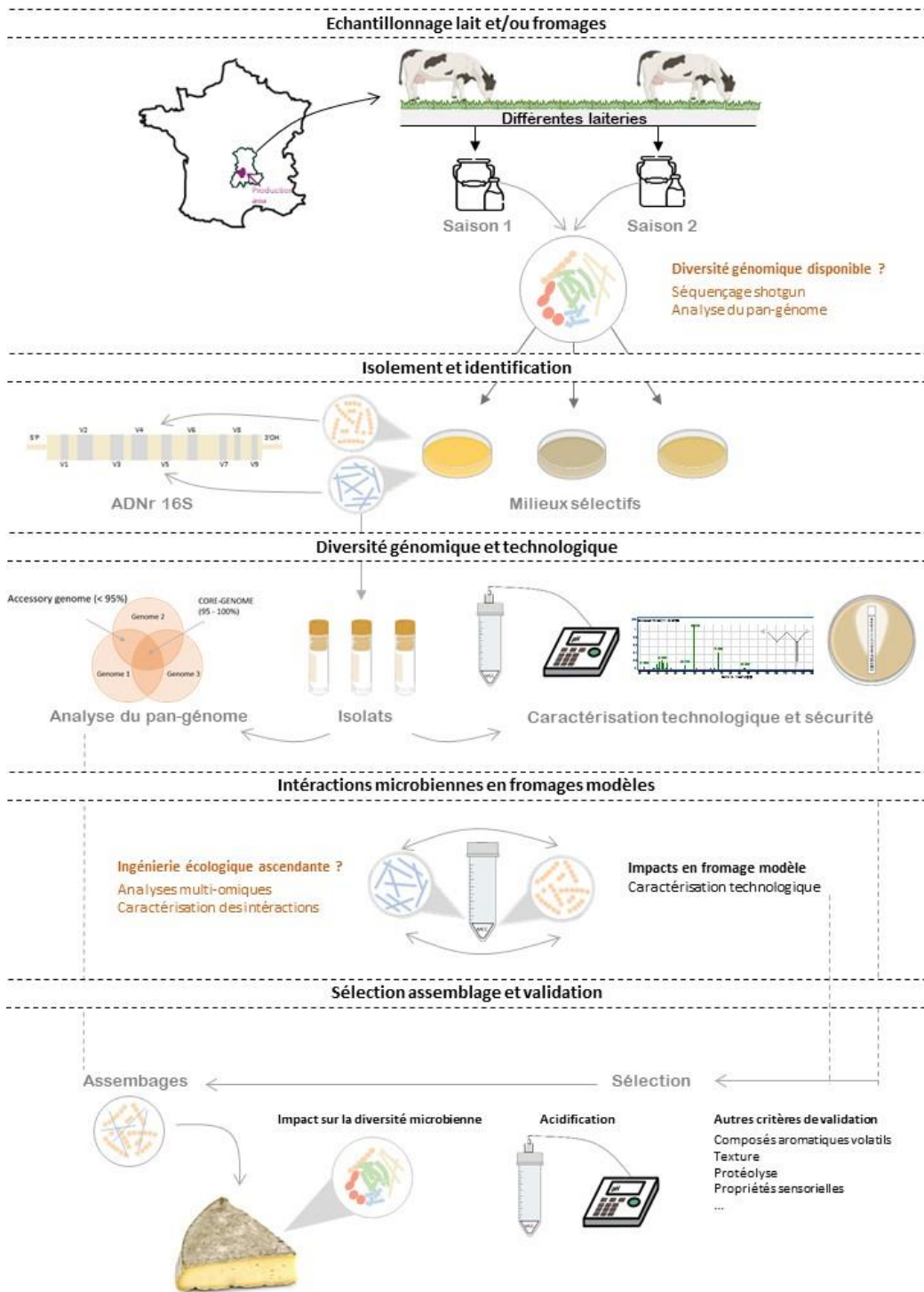


Figure 8 Démarche globale de développement de ferments autochtones proposée dans ce projet.

VII - Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'établir une démarche de sélection et d'assemblage de microorganismes d'intérêt technologique pour constituer des ferments autochtones complexes et représentatifs de la typicité spécifique des terroirs. Les recherches ont intégré des études de caractérisation technologique et de diversité génomique au sein d'une espèce bactérienne ciblée. Cette double approche s'est montrée efficace pour sélectionner et assembler des souches et des espèces possédant des caractéristiques technologiques complémentaires. La démarche établie dans ce projet apporte également la possibilité de complexifier la composition d'un ferment en prenant en compte la diversité génomique au sein d'une espèce pour favoriser la robustesse phagique, mais également accentuer la typicité associée aux aires de production.

L'étude de la diversité microbienne des laits et fromages de la zone de production en amont de l'isolement d'espèce spécifiques pourrait permettre de densifier l'approche, en identifiant les espèces clés représentatives de la typicité d'une zone de production, voire d'une ferme. Ainsi, une question supplémentaire pourrait s'ajouter à ce projet : « **Quels microorganismes sont présents dans l'écosystème spécifique d'une zone de production ?** ». Une première approche pour répondre à cette question pourrait être l'utilisation de la métagénomique shotgun associée à l'étude du pan-génome des espèces dominantes identifiées, en amont de la campagne d'isolement. Une seconde approche portant sur l'utilisation des principes de la culturomique, pourrait combiner l'étape d'isolement des microorganismes, et l'étude de la diversité microbienne au sens large. La culturomique permet la caractérisation des communautés microbiennes d'une matrice en utilisant des méthodes de culture avancées à haut débit. Cette technique s'appuie sur l'utilisation de multiples milieux de culture spécifiques et des techniques de culture sélective et/ou d'enrichissement, ce qui permet l'isolement de microorganismes cultivables représentatifs de la diversité des communautés microbiennes d'une matrice. L'utilisation d'une telle approche apporterait donc les réponses à la question formulée, tout en permettant de constituer une collection de souches qui pourrait être valorisée par le développement de ferments autochtones.

L'étude des interactions entre les composantes des ferments assemblés, et leur impact lors d'une transformation fromagère pourrait être réalisée en utilisant des méthodes multi-omiques. Cette approche permettrait d'enrichir la composition des consortia tout en vérifiant qu'il n'y ait pas de compétition nuisible durant la production. Par conséquent, une interrogation supplémentaire pourrait être intégrée à ce projet : « **Comment les interactions microbiennes au sein d'un ferment impactent le processus de fabrication fromagère ?** ». L'utilisation de la génomique associée à la reconstruction de réseaux métaboliques, permettrait d'identifier les espèces (voire les souches) clés d'un écosystème en ce qui concerne la coopération métabolique. Ces outils permettraient ainsi de sélectionner les microorganismes à assembler. Ensuite, l'utilisation de la méta-transcriptomique pourrait mettre en évidence les mécanismes d'interactions entre les souches constituant les ferments, et la métabolomique donnerait une idée de leur impact lors d'une transformation fromagère.

En combinant la méthode proposée par cette thèse et les perspectives identifiées ci-dessus, il serait possible de généraliser une méthode de sélection et d'assemblage de microorganismes pour constituer

Conclusion générale et perspectives

des ferments complexes représentatifs de la diversité des terroirs, possédant les caractéristiques technologiques ciblées et possédant une forte résistance phagique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agudelo**, R.A.; Gauthier, S.F.; Pouliot, Y.; Marin, J.; Savoie, L. Kinetics of Peptide Fraction Release during in Vitro Digestion of Casein. *J. Sci. Food Agric.* 2004, 84, 325–332, doi:10.1002/jsfa.1662.
- Aldrete-Tapia**, A.; Escobar-Ramírez, M.C.; Tamplin, M.L.; Hernández-Iturriaga, M. High-Throughput Sequencing of Microbial Communities in Poro Cheese, an Artisanal Mexican Cheese. *Food Microbiol.* 2014, 44, 136–141, doi:10.1016/j.fm.2014.05.022.
- Alexandraki**, V.; Kazou, M.; Blom, J.; Pot, B.; Papadimitriou, K.; Tsakalidou, E. Comparative Genomics of *Streptococcus thermophilus* Support Important Traits Concerning the Evolution, Biology and Technological Properties of the Species. *Front. Microbiol.* 2019, 10.
- Almena-Aliste**, M.; Mietton, B. Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiol. Spectr.* 2014, 2, CM-0003–2012, doi:10.1128/microbiolspec.CM-0003-2012.
- Araújo-Rodrigues**, H.; Martins, A.P.L.; Tavaría, F.K.; Dias, J.; Santos, M.T.; Alvarenga, N.; Pintado, M.E. Impact of LAB from Serpa PDO Cheese in Cheese Models: Towards the Development of an Autochthonous Starter Culture. *Foods* 2023, 12, 701, doi:10.3390/foods12040701.
- Arrêté Du 15 Février 2017** Relatif à l'appellation d'origine Protégée « Saint-Nectaire »;
- Belcour**, A.; Frioux, C.; Aite, M.; Bretaudeau, A.; Hildebrand, F.; Siegel, A. Metage2Metabo, Microbiota-Scale Metabolic Complementarity for the Identification of Key Species. *eLife* 2020, 9, e61968, doi:10.7554/eLife.61968.
- Beresford**, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L.; Cogan, T.M. Recent Advances in Cheese Microbiology. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 259–274, doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Beresford**, T.P.; Fitzsimons, N.A.; Brennan, N.L.; Cogan, T.M. Recent Advances in Cheese Microbiology. *Int. Dairy J.* 2001, 11, 259–274, doi:10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Beuviel**, E.; Berthaud, K.; Cegarra, S.; Dasen, A.; Pochet, S.; Buchin, S.; Duboz, G. Ripening and Quality of Swiss-Type Cheese Made from Raw, Pasteurized or Microfiltered Milk. *Int. Dairy J.* 1997, 7, 311–323, doi:10.1016/S0958-6946(97)00015-0.
- Bintsis**, T. Yeasts in Different Types of Cheese. *AIMS Microbiol.* 2021, 7, 447–470, doi:10.3934/microbiol.2021027.
- Bintsis**, T.; Papademas, P. The Evolution of Fermented Milks, from Artisanal to Industrial Products: A Critical Review. *Fermentation* 2022, 8, 679, doi:10.3390/fermentation8120679.
- Björkroth**, J.; Dicks, L.M.T.; Endo, A.; H.Holzappel, W. The Genus *Leuconostoc*. In *Lactic Acid Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp. 391–404 ISBN 978-1-118-65525-2.
- Blaya**, J.; Barzideh, Z.; LaPointe, G. Symposium Review: Interaction of Starter Cultures and Nonstarter Lactic Acid Bacteria in the Cheese Environment1. *J. Dairy Sci.* 2018, 101, 3611–3629, doi:10.3168/jds.2017-13345.
- Blaya**, J.; Barzideh, Z.; LaPointe, G. Symposium Review: Interaction of Starter Cultures and Nonstarter Lactic Acid Bacteria in the Cheese Environment1. *J. Dairy Sci.* 2018, 101, 3611–3629, doi:10.3168/jds.2017-13345.
- Bolotin**, A.; Quinquis, B.; Renault, P.; Sorokin, A.; Ehrlich, S.D.; Kulakauskas, S.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Mazur, M.; Pusch, G.D.; et al. Complete Sequence and Comparative Genome Analysis of the Dairy Bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 2004, 22, 1554–1558, doi:10.1038/nbt1034.

Références bibliographiques

- Brasca**, M.; Hogenboom, J.A.; Morandi, S.; Rosi, V.; D’Incecco, P.; Silveti, T.; Pellegrino, L. Proteolytic Activity and Production of γ -Aminobutyric Acid by *Streptococcus thermophilus* Cultivated in Microfiltered Pasteurized Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 8604–8614, doi:10.1021/acs.jafc.6b03403.
- Broadbent**, J.R.; Barnes, M.; Brennand, C.; Strickland, M.; Houck, K.; Johnson, M.E.; Steele, J.L. Contribution of Lactococcus Lactis Cell Envelope Proteinase Specificity to Peptide Accumulation and Bitterness in Reduced-Fat Cheddar Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 1778–1785, doi:10.1128/AEM.68.4.1778-1785.2002.
- Brown**, L.; Villegas, J.M.; Elean, M.; Fadda, S.; Mozzi, F.; Saavedra, L.; Hebert, E.M. YebC, a Putative Transcriptional Factor Involved in the Regulation of the Proteolytic System of Lactobacillus. *Sci. Rep.* 2017, 7, 8579, doi:10.1038/s41598-017-09124-1.
- Carafa**, I.; Stocco, G.; Franceschi, P.; Summer, A.; Tuohy, K.M.; Bittante, G.; Franciosi, E. Evaluation of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter and Non-Starter Cultures for the Production of Traditional Mountain Cheese. *Food Res. Int.* 2019, 115, 209–218, doi:10.1016/j.foodres.2018.08.069.
- Cardin**, M.; Cardazzo, B.; Mounier, J.; Novelli, E.; Coton, M.; Coton, E. Authenticity and Typicity of Traditional Cheeses: A Review on Geographical Origin Authentication Methods. *Foods* 2022, 11, 3379, doi:10.3390/foods11213379.
- Carminati**, D.; Giraffa, G.; Zago, M.; Marcó, M.B.; Guglielmotti, D.; Binetti, A.; Reinheimer, J. Lactic Acid Bacteria for Dairy Fermentations. In *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp. 191–208 ISBN 978-1-118-86838-6.
- Chapot-Chartier**, M.-P.; Kulakauskas, S. Cell Wall Structure and Function in Lactic Acid Bacteria. *Microb. Cell Factories* 2014, 13, S9, doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Chen**, Y.-S.; Christensen, J.E.; Broadbent, J.R.; Steele, J.L. Identification and Characterization of Lactobacillus Helveticus PepO2, an Endopeptidase with Post-Proline Specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 1276–1282, doi:10.1128/AEM.69.2.1276-1282.2003.
- Chen**, Y.-S.; Steele, J.L. Genetic Characterization and Physiological Role of Endopeptidase O from Lactobacillus Helveticus CNRZ32. *Appl. Environ. Microbiol.* 1998, 64, 3411–3415.
- CNIEL**, Chiffres clés des fromages au lait cru - 2022 Available online: <https://presse.filiere-laitiere.fr/photos/chiffres-cles-des-fromages-au-lait-cru-2022-35ed-ef05e.html> (accessed on 16 January 2024).
- Christensen**, J.E.; Steele, J.L. Impaired Growth Rates in Milk of Lactobacillus Helveticus Peptidase Mutants Can Be Overcome by Use of Amino Acid Supplements. *J. Bacteriol.* 2003, 185, 3297–3306, doi:10.1128/JB.185.11.3297-3306.2003.
- Cocolin**, L.; Ercolini, D. Zooming into Food-Associated Microbial Consortia: A ‘Cultural’ Evolution. *Curr. Opin. Food Sci.* 2015, 2, 43–50, doi:10.1016/j.cofs.2015.01.003.
- Collins**, Y.F.; McSweeney, P.L.H.; Wilkinson, M.G. Lipolysis and Free Fatty Acid Catabolism in Cheese: A Review of Current Knowledge. *Int. Dairy J.* 2003, 13, 841–866, doi:10.1016/S0958-6946(03)00109-2.

- Corbo**, M.R.; Racioppo, A.; Monacis, N.; Speranza, B. Commercial Starters or Autochthonous Strains? That Is the Question. In *Starter Cultures in Food Production*; John Wiley & Sons, Ltd, 2017; pp. 174–198 ISBN 978-1-118-93379-4.
- Couderc**, C.; Laroute, V.; Coddeville, M.; Caillaud, M.-A.; Jard, G.; Raynaud, C.; Coccagn-Bousquet, M.; Tormo, H.; Daveran-Mingot, M.-L. Harnessing Diversity of *Lactococcus Lactis* from Raw Goat Milk: Design of an Indigenous Starter for the Production of Rocamadour, a French PDO Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2022, 379, 109837, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109837.
- Cuffia**, F.; Bergamini, C.V.; Hynes, É.R.; Wolf, I.V.; Perotti, M.C. Evaluation of Autochthonous Cultures to Improve the Cheese Flavor: A Case Study in Hard Cheese Model. *Food Sci. Technol. Int. Cienc. Tecnol. Los Aliment. Int.* 2020, 26, 173–184, doi:10.1177/1082013219881512.
- Dalby**, A. *Cheese: A Global History*; 2009;
- de Vin**, F.; Rådström, P.; Herman, L.; De Vuyst, L. Molecular and Biochemical Analysis of the Galactose Phenotype of Dairy *Streptococcus thermophilus* Strains Reveals Four Different Fermentation Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 3659–3667, doi:10.1128/AEM.71.7.3659-3667.2005.
- Décret N°2007-628** Du 27 Avril 2007 Relatif Aux Fromages et Spécialités Fromagères - Légifrance Available online: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/LEGITEXT000006056036> (accessed on 16 January 2024).
- Delcenserie**, V.; Taminiau, B.; Delhalle, L.; Nezer, C.; Doyen, P.; Crevecoeur, S.; Roussey, D.; Korsak, N.; Daube, G. Microbiota Characterization of a Belgian Protected Designation of Origin Cheese, Herve Cheese, Using Metagenomic Analysis. *J. Dairy Sci.* 2014, 97, 6046–6056, doi:10.3168/jds.2014-8225.
- Delorme**, C.; Bartholini, C.; Bolotine, A.; Ehrlich, S.D.; Renault, P. Emergence of a Cell Wall Protease in the *Streptococcus thermophilus* Population. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 451–460, doi:10.1128/AEM.01018-09.
- Doeven**, M.K.; Kok, J.; Poolman, B. Specificity and Selectivity Determinants of Peptide Transport in *Lactococcus Lactis* and Other Microorganisms. *Mol. Microbiol.* 2005, 57, 640–649, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04698.x.
- Donnelly**, C.W. From Pasteur to Probiotics: A Historical Overview of Cheese and Microbes. *Microbiol. Spectr.* 2013, 1, doi:10.1128/microbiolspec.CM-0001-12.
- El Kafsi**, H.; Binesse, J.; Loux, V.; Buratti, J.; Boudebouze, S.; Dervyn, R.; Kennedy, S.; Galleron, N.; Quinquis, B.; Batto, J.-M.; et al. *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* and *ssp. bulgaricus*: A Chronicle of Evolution in Action. *BMC Genomics* 2014, 15, 407, doi:10.1186/1471-2164-15-407.
- Elean**, M.; Albarracin, L.; Villena, J.; Kitazawa, H.; Saavedra, L.; Hebert, E.M. In Silico Comparative Genomic Analysis Revealed a Highly Conserved Proteolytic System in *Lactobacillus delbrueckii*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 11309, doi:10.3390/ijms241411309.
- Fang**, G.; Konings, W.N.; Poolman, B. Kinetics and Substrate Specificity of Membrane-Reconstituted Peptide Transporter DtpT of *Lactococcus Lactis*. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 2530–2535, doi:10.1128/jb.182.9.2530-2535.2000.
- Farkye**, N.Y.; Fox, P.F. Objective Indices of Cheese Ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 1990, 1, 37–40, doi:10.1016/0924-2244(90)90028-W.

- Fernandez-Espla**, M.D.; Garault, P.; Monnet, V.; Rul, F. *Streptococcus thermophilus* Cell Wall-Anchored Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 4772–4778.
- Fernandez-Espla**, M.D.; Garault, P.; Monnet, V.; Rul, F. *Streptococcus thermophilus* Cell Wall-Anchored Proteinase: Release, Purification, and Biochemical and Genetic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 4772–4778, doi:10.1128/AEM.66.11.4772-4778.2000.
- Feurer**, C.; Irlinger, F.; Spinnler, H.E.; Glaser, P.; Vallaeys, T. Assessment of the Rind Microbial Diversity in a Farmhouse-Produced vs a Pasteurized Industrially Produced Soft Red-Smear Cheese Using Both Cultivation and rDNA-Based Methods. *J. Appl. Microbiol.* 2004, 97, 546–556, doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02333.x.
- Foucaud**, C.; Poolman, B. Lactose Transport System of *Streptococcus thermophilus*. Functional Reconstitution of the Protein and Characterization of the Kinetic Mechanism of Transport. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 22087–22094, doi:10.1016/S0021-9258(18)41639-0.
- Fox**, P.F. Proteolysis During Cheese Manufacture and Ripening¹. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 1379–1400, doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8.
- Fox**, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; McSweeney, P.L.H. *Fundamentals of Cheese Science*; Springer US: Boston, MA, 2017; ISBN 978-1-4899-7679-6.
- Fox**, P.F.; McSweeney, P.L.H. Chapter 1 - Cheese: An Overview. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 5–21 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Fox**, P.F.; Uniacke-Lowe, T.; McSweeney, P.L.H.; O’Mahony, J.A. *Dairy Chemistry and Biochemistry*; Springer International Publishing: Cham, 2015; ISBN 978-3-319-14891-5.
- Frétin**, M. Construction de La Qualité Sensorielle Des Fromages de Type Cantal : Rôle Des Interactions Entre Les Communautés Microbiennes et La Composition de La Matière Grasse Laitière Des Fromages. These de doctorat, Clermont-Ferrand 2, 2016.
- Fricker**, M.; Skånseng, B.; Rudi, K.; Stessl, B.; Ehling-Schulz, M. Shift from Farm to Dairy Tank Milk Microbiota Revealed by a Polyphasic Approach Is Independent from Geographical Origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 145 Suppl 1, S24-30, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.025.
- Fröhlich-Wyder**, M.-T.; Arias-Roth, E.; Jakob, E. Cheese Yeasts. *Yeast* 2019, 36, 129–141, doi:10.1002/yea.3368.
- Galia**, W.; Perrin, C.; Genay, M.; Dary, A. Variability and Molecular Typing of *Streptococcus thermophilus* Strains Displaying Different Proteolytic and Acidifying Properties. *Int. Dairy J.* 2009, 19, 89–95, doi:10.1016/j.idairyj.2008.08.004.
- Ganesan**, B.; Weimer, B.C. Chapter 19 - Amino Acid Catabolism and Its Relationship to Cheese Flavor Outcomes. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 483–516 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Garault**, P.; Bars, D.L.; Besset, C.; Monnet, V. Three Oligopeptide-Binding Proteins Are Involved in the Oligopeptide Transport of *Streptococcus thermophilus**. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 32–39, doi:10.1074/jbc.M107002200.

- Gasser, C.;** Garault, P.; Chervaux, C.; Monnet, V.; Faurie, J.-M.; Rul, F. Co-Utilization of Saccharides in Mixtures: Moving toward a New Understanding of Carbon Metabolism in *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiol.* 2022, 107, 104080, doi:10.1016/j.fm.2022.104080.
- Gatti, M.;** Bottari, B.; Lazzi, C.; Neviani, E.; Mucchetti, G. Invited Review: Microbial Evolution in Raw-Milk, Long-Ripened Cheeses Produced Using Undefined Natural Whey Starters. *J. Dairy Sci.* 2014, 97, 573–591, doi:10.3168/jds.2013-7187.
- Genay, M.;** Sadat, L.; Gagnaire, V.; Lortal, S. prtH2, Not prtH, Is the Ubiquitous Cell Wall Proteinase Gene in *Lactobacillus helveticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75, 3238–3249, doi:10.1128/AEM.02395-08.
- Giaretta, S.;** Treu, L.; Vendramin, V.; da Silva Duarte, V.; Tarrah, A.; Campanaro, S.; Corich, V.; Giacomini, A. Comparative Transcriptomic Analysis of *Streptococcus thermophilus* TH1436 and TH1477 Showing Different Capability in the Use of Galactose. *Front. Microbiol.* 2018, 9.
- Gilbert, C.;** Atlan, D.; Blanc, B.; Portailer, R.; Germond, J.E.; Lapierre, L.; Mollet, B. A New Cell Surface Proteinase: Sequencing and Analysis of the prtB Gene from *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 1996, 178, 3059–3065, doi:10.1128/jb.178.11.3059-3065.1996.
- Giraffa, G.;** Andrighetto, C.; Antonello, C.; Gatti, M.; Lazzi, C.; Marazzan, G.; Lombardi, A.; Neviani, E. Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* Strains of Dairy Origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, 129–139, doi:10.1016/S0168-1605(03)00368-4.
- Gobbetti, M.;** De Angelis, M.; Di Cagno, R.; Mancini, L.; Fox, P.F. Pros and Cons for Using Non-Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) as Secondary/Adjunct Starters for Cheese Ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 2015, 45, 167–178, doi:10.1016/j.tifs.2015.07.016.
- González, L.;** Zárate, V. Influence of an Autochthonous Starter Culture and a Commercial Starter on the Characteristics of Tenerife Pasteurised Goats' Milk Cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 2012.
- Gross, M.** On the Origins of Cheese. *Curr. Biol.* 2018, 28, R1171–R1173, doi:10.1016/j.cub.2018.10.008.
- Grossiord, B.;** Vaughan, E.E.; Luesink, E.; de Vos, W.M. Genetics of Galactose Utilisation via the Leloir Pathway in Lactic Acid Bacteria. *Le Lait* 1998, 78, 77–84.
- Guan, Y.;** Cui, Y.; Qu, X.; Jing, K. Safety and Robustness Aspects Analysis of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LDB-C1 Based on the Genome Analysis and Biological Tests. *Arch. Microbiol.* 2021, 203, 3955–3964, doi:10.1007/s00203-021-02383-7.
- Guédon, E.;** Renault, P.; Ehrlich, S.D.; Delorme, C. Transcriptional Pattern of Genes Coding for the Proteolytic System of *Lactococcus lactis* and Evidence for Coordinated Regulation of Key Enzymes by Peptide Supply. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 3614–3622, doi:10.1128/jb.183.12.3614-3622.2001.
- Gueimonde, M.;** Sánchez, B.; de los Reyes-Gavilán, C.G.; Margolles, A. Antibiotic Resistance in Probiotic Bacteria. *Front. Microbiol.* 2013, 4.
- Hebert, E.M.;** Raya, R.R.; Brown, L.; Font de Valdez, G.; Savoy de Giori, G.; Taranto, M.P. Genome Sequence of the Cheese-Starter Strain *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CRL 581. *Genome Announc.* 2013, 1, 10.1128/genomea.00602-13, doi:10.1128/genomea.00602-13.

- Holck**, A.; Næs, H. Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Encoding the Cell-Envelope-Associated Proteinase from *Lactobacillus Paracasei* Subsp. *Paracasei* NCDO 151. *Microbiology* 1992, 138, 1353–1364, doi:10.1099/00221287-138-7-1353.
- Hols**, P.; Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond-Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.; Dusko Ehrlich, S.; et al. New Insights in the Molecular Biology and Physiology of *Streptococcus thermophilus* Revealed by Comparative Genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29, 435–463, doi:10.1016/j.fmre.2005.04.008.
- Hutkins**, R.W.; Morris, H.A. Carbohydrate Metabolism by *Streptococcus Thermophilus*: A Review. *J. Food Prot.* 1987, 50, 876–884, doi:10.4315/0362-028X-50.10.876.
- Iskandar**, C.F.; Cailliez-Grimal, C.; Borges, F.; Revol-Junelles, A.-M. Review of Lactose and Galactose Metabolism in Lactic Acid Bacteria Dedicated to Expert Genomic Annotation. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, 88, 121–132, doi:10.1016/j.tifs.2019.03.020.
- Jameh**, N.; Galia, W.; Awussi, A.A.; Roux, E.; Genay, M.; Perrin, C.; Dary-Mourot, A. Characterization of a New Peptide Transport System in *Streptococcus thermophilus*. *Food Res. Int.* 2016, 86, 34–45, doi:10.1016/j.foodres.2016.04.039.
- Jaros**, D.; Rohm, H. Chapter 3 - Rennets: Applied Aspects. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 53–67 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Johnson**, M.E. Mesophilic and Thermophilic Cultures Used in Traditional Cheesemaking. In *Cheese and Microbes*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp. 73–94 ISBN 978-1-68367-103-9.
- Kandler**, O. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1983, 49, 209–224, doi:10.1007/BF00399499.
- Kelleher**, P.; Murphy, J.; Mahony, J.; van Sinderen, D. Next-Generation Sequencing as an Approach to Dairy Starter Selection. *Dairy Sci. Technol.* 2015, 95, 545–568, doi:10.1007/s13594-015-0227-4.
- Khattab**, A.R.; Guirguis, H.A.; Tawfik, S.M.; Farag, M.A. Cheese Ripening: A Review on Modern Technologies towards Flavor Enhancement, Process Acceleration and Improved Quality Assessment. *Trends Food Sci. Technol.* 2019, 88, 343–360, doi:10.1016/j.tifs.2019.03.009.
- Kunji**, E.R.S.; Mierau, I.; Hagting, A.; Poolman, B.; Konings, W.N. The Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996, 70, 187–221, doi:10.1007/BF00395933.
- L'ÉCONOMIE LAITIÈRE EN CHIFFRES** - ÉDITION 2021 Available online: <https://www.calameo.com/read/002230051d871528dacec> (accessed on 16 January 2024).
- Lawson**, C.E.; Harcombe, W.R.; Hatzenpichler, R.; Lindemann, S.R.; Löffler, F.E.; O'Malley, M.A.; García Martín, H.; Pfleger, B.F.; Raskin, L.; Venturelli, O.S.; et al. Common Principles and Best Practices for Engineering Microbiomes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019, 17, 725–741, doi:10.1038/s41579-019-0255-9.
- Legg**, A.K.; Carr, A.J.; Bennett, R.J.; Johnston, K.A. Chapter 26 - General Aspects of Cheese Technology. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 643–675 ISBN 978-0-12-417012-4.

- Lemieux**, L.; Simard, R.E. Bitter Flavour in Dairy Products. II. A Review of Bitter Peptides from Caseins: Their Formation, Isolation and Identification, Structure Masking and Inhibition. *Le Lait* 1992, 72, 335–385, doi:10.1051/lait:1992426.
- Li**, T.; Teng, D.; Mao, R.; Hao, Y.; Wang, X.; Wang, J. A Critical Review of Antibiotic Resistance in Probiotic Bacteria. *Food Res. Int.* 2020, 136, 109571, doi:10.1016/j.foodres.2020.109571.
- Liu**, M.; Bayjanov, J.R.; Renckens, B.; Nauta, A.; Siezen, R.J. The Proteolytic System of Lactic Acid Bacteria Revisited: A Genomic Comparison. *BMC Genomics* 2010, 11, 36, doi:10.1186/1471-2164-11-36.
- Lucey**, J.A.; Johnson, M.E.; Horne, D.S. Invited Review: Perspectives on the Basis of the Rheology and Texture Properties of Cheese. *J. Dairy Sci.* 2003, 86, 2725–2743, doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73869-7.
- Mayo**, B.; Rodríguez, J.; Vázquez, L.; Flórez, A.B. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods* 2021, 10, 602, doi:10.3390/foods10030602.
- Mayo**, B.; Rodríguez, J.; Vázquez, L.; Flórez, A.B. Microbial Interactions within the Cheese Ecosystem and Their Application to Improve Quality and Safety. *Foods* 2021, 10, 602, doi:10.3390/foods10030602.
- McSweeney**, P.L.H. Biochemistry of Cheese Ripening. *Int. J. Dairy Technol.* 2004, 57, 127–144, doi:10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x.
- McSweeney**, P.L.H.; Fox, P.F.; Ciocia, F. Chapter 16 - Metabolism of Residual Lactose and of Lactate and Citrate. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 411–421 ISBN 978-0-12-417012-4.
- McSweeney**, P.L.H.; Sousa, M.J. Biochemical Pathways for the Production of Flavour Compounds in Cheeses during Ripening: A Review. *Le Lait* 2000, 80, 293–324, doi:10.1051/lait:2000127.
- Melkonian**, C.; Zorrilla, F.; Kjærboelling, I.; Blasche, S.; Machado, D.; Junge, M.; Sørensen, K.I.; Andersen, L.T.; Patil, K.R.; Zeidan, A.A. Microbial Interactions Shape Cheese Flavour Formation. *Nat. Commun.* 2023, 14, 8348, doi:10.1038/s41467-023-41059-2.
- Mills**, S.; Ross, R.P.; Coffey, A. Lactic Acid Bacteria | *Lactococcus Lactis*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*; Fuquay, J.W., Ed.; Academic Press: San Diego, 2011; pp. 132–137 ISBN 978-0-12-374407-4.
- Montel**, M.-C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmaures, N.; Berthier, F. Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota with Associated Benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 177, 136–154, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.
- O'Connor**, P.M.; Kuniyoshi, T.M.; Oliveira, R.P.; Hill, C.; Ross, R.P.; Cotter, P.D. Antimicrobials for Food and Feed; a Bacteriocin Perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2020, 61, 160–167, doi:10.1016/j.copbio.2019.12.023.
- Parente**, E.; Cogan, T.M.; Powell, I.B. Chapter 8 - Starter Cultures: General Aspects. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 201–226 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Pastar**, I.; Tonic, I.; Golic, N.; Kojic, M.; van Kranenburg, R.; Kleerebezem, M.; Topisirovic, L.; Jovanovic, G. Identification and Genetic Characterization of a Novel Proteinase, PrtR, from the Human Isolate *Lactobacillus Rhamnosus* BGT10. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5802–5811, doi:10.1128/AEM.69.10.5802-5811.2003.

- Pavunc**, A.; Novak, J.; Kos, B.; Uroić, K.; Blažić, M.; Šušković, J. Characterization and Application of Autochthonous Starter Cultures for Fresh Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* 2012, 50, 141.
- Pederson**, J.A.; Mileski, G.J.; Weimer, B.C.; Steele, J.L. Genetic Characterization of a Cell Envelope-Associated Proteinase from *Lactobacillus Helveticus* CNRZ32. *J. Bacteriol.* 1999, 181, 4592–4597, doi:10.1128/jb.181.15.4592-4597.1999.
- Peng**, X.; Ed-Dra, A.; Yue, M. Whole Genome Sequencing for the Risk Assessment of Probiotic Lactic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2023, 63, 11244–11262, doi:10.1080/10408398.2022.2087174.
- Penland**, M.; Falentin, H.; Parayre, S.; Pawtowski, A.; Maillard, M.-B.; Thierry, A.; Mounier, J.; Coton, M.; Deutsch, S.-M. Linking Pélardon Artisanal Goat Cheese Microbial Communities to Aroma Compounds during Cheese-Making and Ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 2021, 345, 109130, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130.
- Picon**, A. Cheese Microbial Ecology and Safety. In *Global Cheesemaking Technology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2017; pp. 71–99 ISBN 978-1-119-04616-5.
- Poolman**, B.; Royer, T.J.; Mainzer, S.E.; Schmidt, B.F. Lactose Transport System of *Streptococcus thermophilus*: A Hybrid Protein with Homology to the Melibiose Carrier and Enzyme III of Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase Systems. *J. Bacteriol.* 1989, 171, 244–253, doi:10.1128/jb.171.1.244-253.1989.
- Pot**, B.; Felis, G.E.; Bruyne, K.D.; Tsakalidou, E.; Papadimitriou, K.; Leisner, J.; Vandamme, P. The Genus *Lactobacillus*. In *Lactic Acid Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp. 249–353 ISBN 978-1-118-65525-2.
- Prazeres**, A.R.; Carvalho, F.; Rivas, J. Cheese Whey Management: A Review. *J. Environ. Manage.* 2012, 110, 48–68, doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.018.
- Quigley**, L.; O’Sullivan, O.; Stanton, C.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. The Complex Microbiota of Raw Milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 2013, 37, 664–698, doi:10.1111/1574-6976.12030.
- Rasmussen**, T.B.; Danielsen, M.; Valina, O.; Garrigues, C.; Johansen, E.; Pedersen, M.B. *Streptococcus thermophilus* Core Genome: Comparative Genome Hybridization Study of 47 Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 4703–4710, doi:10.1128/AEM.00132-08.
- Ribadeau-Dumas**, B. Maîtrise de l’affinage des fromages de type Camembert. *Le Lait* 1984, 64, 448–468, doi:10.1051/lait:1984643-64435.
- Ritschard**, J.S.; Schuppler, M. The Microbial Diversity on the Surface of Smear-Ripened Cheeses and Its Impact on Cheese Quality and Safety. *Foods* 2024, 13, 214, doi:10.3390/foods13020214.
- Rodríguez**, J.; Requena, T.; Goudédranche, H.; Maubois, J.L.; Juarez, M. Accelerated Ripening of Reduced Fat Semi-Hard Cheese from a Mixture of Cow’s, Goat’s and Ewe’s Ultrafiltrated Milk by Using a Lac- Prt- Strain of Lactococci. *Le Lait* 1996, 76, 513–522, doi:10.1051/lait:1996640.
- Rodríguez-Serrano**, G.M.; Garcia-Garibay, J.M.; Cruz-Guerrero, A.E.; Gomez-Ruiz, L. del C.; Ayala-Nino, A.; Castaneda-Ovando, A.; Gonzalez-Olivares, L.G. Proteolytic System of *Streptococcus thermophilus*. 2018, 28, 1581–1588, doi:10.4014/jmb.1807.07017.

- Rodriguez-Valera**, F.; Martin-Cuadrado, A.-B.; Rodriguez-Brito, B.; Pasić, L.; Thingstad, T.F.; Rohwer, F.; Mira, A. Explaining Microbial Population Genomics through Phage Predation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009, 7, 828–836, doi:10.1038/nrmicro2235.
- Romero**, D.A.; Magill, D.; Millen, A.; Horvath, P.; Fremaux, C. Dairy Lactococcal and Streptococcal Phage-Host Interactions: An Industrial Perspective in an Evolving Phage Landscape. *FEMS Microbiol. Rev.* 2020, 44, 909–932, doi:10.1093/femsre/fuaa048.
- Roux**, E.; Nicolas, A.; Valence, F.; Siekaniec, G.; Chuat, V.; Nicolas, J.; Le Loir, Y.; Guédon, E. The Genomic Basis of the *Streptococcus thermophilus* Health-Promoting Properties. *BMC Genomics* 2022, 23, 210, doi:10.1186/s12864-022-08459-y.
- Ruvalcaba-Gómez**, J.M.; Ruiz-Espinosa, H.; Méndez-Robles, M.D.; Arteaga-Garibay, R.I.; Anaya-Esparza, L.M.; Villagrán, Z.; Delgado-Macuil, R.J. Use of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter Culture of Pasteurized Milk Adobera Cheese. *Fermentation* 2022, 8, 234, doi:10.3390/fermentation8050234.
- Salque**, M.; Bogucki, P.I.; Pyzel, J.; Sobkowiak-Tabaka, I.; Grygiel, R.; Szymt, M.; Evershed, R.P. Earliest Evidence for Cheese Making in the Sixth Millennium BC in Northern Europe. *Nature* 2013, 493, 522–525, doi:10.1038/nature11698.
- Savijoki**, K.; Ingmer, H.; Varmanen, P. Proteolytic Systems of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 71, 394–406, doi:10.1007/s00253-006-0427-1.
- Schleifer**, K.H.; Kraus, J.; Dvorak, C.; Kilpper-Bälz, R.; Collins, M.D.; Fischer, W. Transfer of *Streptococcus Lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* Gen. Nov. Syst. Appl. Microbiol. 1985, 6, 183–195, doi:10.1016/S0723-2020(85)80052-7.
- Settanni**, L.; Moschetti, G. Non-Starter Lactic Acid Bacteria Used to Improve Cheese Quality and Provide Health Benefits. *Food Microbiol.* 2010, 27, 691–697, doi:10.1016/j.fm.2010.05.023.
- Sieuwerds**, S.; Molenaar, D.; van Hijum, S.A.F.T.; Beerthuyzen, M.; Stevens, M.J.A.; Janssen, P.W.M.; Ingham, C.J.; de Bok, F.A.M.; de Vos, W.M.; van Hylckama Vlieg, J.E.T. Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus Bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76, 7775–7784, doi:10.1128/AEM.01122-10.
- Siezen**, R.J. Multi-Domain, Cell-Envelope Proteinases of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, 19–23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands; Konings, W.N., Kuipers, O.P., In 't Veld, J.H.J.H., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1999; pp. 139–155 ISBN 978-94-017-2027-4.
- Silvetti**, T.; Capra, E.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Decimo, M.; Gavazzi, F.; Giannico, R.; De Noni, I.; Brasca, M. Microbial Population Profile during Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter Cheese, Produced with and without Autochthonous Starter Culture. *LWT* 2017, 84, 821–831, doi:10.1016/j.lwt.2017.06.022.
- Silvetti**, T.; Capra, E.; Morandi, S.; Cremonesi, P.; Decimo, M.; Gavazzi, F.; Giannico, R.; De Noni, I.; Brasca, M. Microbial Population Profile during Ripening of Protected Designation of Origin (PDO) Silter Cheese,

Références bibliographiques

- Produced with and without Autochthonous Starter Culture. *LWT* 2017, 84, 821–831, doi:10.1016/j.lwt.2017.06.022.
- Singh**, T.K.; Young, N.D.; Drake, M.; Cadwallader, K.R. Production and Sensory Characterization of a Bitter Peptide from Beta-Casein. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1185–1189, doi:10.1021/jf049058d.
- Smit**, G.; Smit, B.A.; Engels, W.J.M. Flavour Formation by Lactic Acid Bacteria and Biochemical Flavour Profiling of Cheese Products. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29, 591–610, doi:10.1016/j.femsre.2005.04.002.
- Song**, Y.; Zhao, J.; Liu, W.; Li, W.; Sun, Z.; Cui, Y.; Zhang, H. Exploring the Industrial Potential of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* by Population Genomics and Genome-Wide Association Study Analysis. *J. Dairy Sci.* 2021, 104, 4044–4055, doi:10.3168/jds.2020-19467.
- Spinnler**, H.-E. Chapter 36 - Surface Mold-Ripened Cheeses. In *Cheese (Fourth Edition)*; McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P.D., Everett, D.W., Eds.; Academic Press: San Diego, 2017; pp. 911–928 ISBN 978-0-12-417012-4.
- Thierry**, A.; Maillard, M.-B. Production of Cheese Flavour Compounds Derived from Amino Acid Catabolism by *Propionibacterium Freudenreichii*. *Le Lait* 2002, 82, 17–32, doi:10.1051/lait:2001002.
- Tidona**, F.; Francolino, S.; Ghiglietti, R.; Locci, F.; Carminati, D.; Laforce, P.; Giraffa, G. Characterization and Pre-Industrial Validation of *Streptococcus thermophilus* Strains to Be Used as Starter Cultures for Crescenza, an Italian Soft Cheese. *Food Microbiol.* 2020, 92, 103599, doi:10.1016/j.fm.2020.103599.
- Tynkkynen**, S.; Buist, G.; Kunji, E.; Kok, J.; Poolman, B.; Venema, G.; Haandrikman, A. Genetic and Biochemical Characterization of the Oligopeptide Transport System of *Lactococcus Lactis*. *J. Bacteriol.* 1993, 175, 7523–7532, doi:10.1128/jb.175.23.7523-7532.1993.
- Vaillancourt**, K.; Bédard, N.; Bart, C.; Tessier, M.; Robitaille, G.; Turgeon, N.; Frenette, M.; Moineau, S.; Vadeboncoeur, C. Role of galK and galM in Galactose Metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74, 1264–1267, doi:10.1128/AEM.01585-07.
- van den Bogaard**, P.T.C.; Kleerebezem, M.; Kuipers, O.P.; de Vos, W.M. Control of Lactose Transport, β -Galactosidase Activity, and Glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Carbon Catabolite Repression by a Non-Phosphoenolpyruvate-Dependent Phosphotransferase System Sugar. *J. Bacteriol.* 2000, 182, 5982–5989, doi:10.1128/jb.182.21.5982-5989.2000.
- Visser**, S.; Exterkate, F.A.; Slangen, C.J.; de Veer, G.J.C.M. Comparative Study of Action of Cell Wall Proteinases from Various Strains of *Streptococcus Cremoris* on Bovine As1-, β -, and κ -Casein. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986, 52, 1162–1166.
- Walstra**, P.; Walstra, P.; Wouters, J.T.M.; Geurts, T.J. *Dairy Science and Technology*; CRC Press, 2005; ISBN 978-1-4200-2801-0.
- Wouters**, J.T.M.; Ayad, E.H.E.; Hugenholtz, J.; Smit, G. Microbes from Raw Milk for Fermented Dairy Products. *Int. Dairy J.* 2002, 12, 91–109, doi:10.1016/S0958-6946(01)00151-0.
- Xiong**, Z.-Q.; Kong, L.-H.; Meng, H.-L.; Cui, J.-M.; Xia, Y.-J.; Wang, S.-J.; Ai, L.-Z. Comparison of Gal–Lac Operons in Wild-Type Galactose-Positive and -Negative *Streptococcus thermophilus* by Genomics and Transcription Analysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 46, 751–758, doi:10.1007/s10295-019-02145-x.

Références bibliographiques

- Yamamoto, E.;** WATANABE, R.; KOIZUMI, A.; ISHIDA, T.; KIMURA, K. Isolation and Characterization of *Streptococcus thermophilus* Possessing prtS Gene from Raw Milk in Japan. Biosci. Microbiota Food Health 2020, 39, 169–174, doi:10.12938/bmfh.2019-052.
- Zhai, Y.;** Wei, C. Open Pangenome of Lactococcus Lactis Generated by a Combination of Metagenome-Assembled Genomes and Isolate Genomes. Front. Microbiol. 2022, 13.
- Zhong, C.;** Chen, C.; Wang, L.; Ning, K. Integrating Pan-Genome with Metagenome for Microbial Community Profiling. Comput. Struct. Biotechnol. J. 2021, 19, 1458–1466, doi:10.1016/j.csbj.2021.02.021.