THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

Mme REINE ABI KHALIL

le mercredi 7 décembre 2022

Titre :

Caractérisation du labneh Ambaris, un lait fermenté libanais, et exploration des communautés microbiennes impliquées dans sa réalisation

---

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeur(s) de Thèse :

MME HÉLÈNE EUTAMENE

M. RABIH EL RAMMOUZ

Rapporteurs :

MME MIREILLE KALLASSY, UNIVERSITE ST JOSEPH DE BEYROUTH

Membre(s) du jury :

MME NATHALIE DESMASURES, UNIVERSITE DE CAEN, Président

M. FRÉDÉRIC ZAKHIA, Université Sainte-Famille, Membre

MME FRANÇOISE IRLINGER, AGROPARISTECH, Membre

MME HÉLÈNE EUTAMENE, EI PURPAN, Membre

MME HÉLÈNE TORMO, EI PURPAN, Membre

M. PIERRE ABI NAKHOUL, UNIVERSITE LIBANAISE, Membre

M. RABIH EL RAMMOUZ, UNIVERSITE LIBANAISE, Membre

Dédicaces

À mes parents, pour vos sacrifices et vos prières
durant toutes ces années

À ma sœur, ma meilleure amie et ma force

À mon frère, ma source d'inspiration et de persévérance

À Joseph, pour ton soutien continu malgré nos distances

À mon Liban

« Nous moissonnerons au temps convenable, si nous ne nous relâchons pas. »
Galates 6:9

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à la Faculté d'Agronomie de l'Université Libanaise au Liban et l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan à Toulouse dans le cadre d'une cotutelle entre les deux établissements. Je remercie Prof. Samir MEDAWAR, Prof. Nadine NASSIF et Mr. Frédéric VIOLLEAU pour m'avoir fait confiance et donné l'opportunité de mener à bien ce projet.
Je remercie Campus France et l'Université Libanaise pour m'avoir accordé une bourse pour faire cette thèse. Je remercie particulièrement Mr. Farid SAADOUN, mon conseiller qui s'est bien occupé de mes séjours, m'a accompagnée et encouragée sans cesse durant ces 3 ans de thèse.

Je tiens aussi à vivement remercier Mme Nathalie DESMASURES et Mme Mireille KALLASSY d'avoir accepté de juger ces travaux. Je remercie également Mme Françoise IRLINGER et M. Frédéric ZAKHIA pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Je commence d'abord par remercier mon équipe d'encadrement au Liban, mes professeurs qui m'ont également accompagnée durant mon parcours d'ingénieur agroalimentaire à la faculté d'Agronomie. Rabih EL RAMMOUZ, mon directeur de thèse, merci pour votre confiance en acceptant d'encadrer ce travail, ainsi que pour votre soutien, vos conseils précieux et vos gentils mots durant les moments les plus difficiles. MERCI BEAUCOUP!!

Pierre ABI NAKHOUL, mon co-directeur de thèse, je tiens à vivement vous remercier pour avoir cru en moi et de m'avoir proposé de mener cette thèse avec vous. Merci de m'avoir encouragée et soutenue sans cesse tout au long du travail. Vous avez tout fait pour que ce projet réussisse bien et que je me sente bien à l'aise. Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance. MERCI DU FOND DE MON CŒUR.

Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude à Marie-José AYOUB, qui a su être présente pour moi tout au long de ces trois ans. Merci pour votre grande implication dans les travaux de cette thèse, et votre contribution au bon déroulement de ce travail depuis le début. Je vous remercie fortement pour votre compassion et vos encouragements qui m'ont accompagnée tout au long du chemin. Je suis chanceuse d'avoir été encadrée par une personne brillante comme vous. Malgré les nombreuses tâches quotidiennes que vous avez, vous étiez impliquées au maximum dans mes travaux, et ceci mêmes à des heures très tard le soir (je garderai toujours en tête vos mails reçus à 3h et 4h du matin). Vous m'inspirez et me donnez l'espoir qu'une femme chercheuse au Liban peut réussir à avoir une belle famille et être totalement impliquée dans le monde de la recherche. MERCI DU FOND DE MON CŒUR.

Remerciements

Je tiens à remercier mon équipe d'encadrement à Purpan. Ma directrice de thèse Hélène EUTAMÈNE et ma co-directrice Hélène TORMO, je vous remercie pour tout. Je vous remercie d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue durant les bons et les moments de doute, pour vos encouragements et votre patience.

Hélène EUTAMÈNE, merci d'avoir été tellement gentille avec moi. Tu n'as jamais cessé de me motiver, de m'encourager et de m'écouter. Je n'oublierai jamais notre dîner « rituel » qu'on faisait chaque année chez toi à la fin de mes séjours en France. J'espère qu'on aura d'autres chances de travailler ensemble. MERCI DU FOND DE MON CŒUR.

Hélène TORMO, je me rappelle de ma première arrivée à Toulouse (j'avais perdu mes valises), j'étais déprimée. Tu m'as accueillie chez toi avec un bon cœur. Durant mes séjours en France, je ne me suis jamais sentie étrangère ou seule grâce à ta présence et à ta bienveillance. Je suis tellement fière et chanceuse d'avoir été encadrée, scientifiquement et humainement, par toi. J'ai tellement de souvenirs de nous deux, et je n'oublierai aucun. Je me suis faite pas juste une co-directrice de thèse à Toulouse mais une belle amie. MERCI DU FOND DE MON CŒUR.

Christel COUDERC, tu m'as beaucoup aidée dans mes planifications et mes travaux de laboratoire, tu as ton empreinte sur tout ce que j'ai fait durant cette thèse. Je n'arriverai jamais à écrire assez de mots pour exprimer tout ce que j'aimerais te dire…Tu es la plus belle personne que j'ai rencontrée de toute ma vie. Ton cœur et ta bonté sont exceptionnels. Tu me disais qu'on est des « âmes sœurs » et tu as complètement raison. Je ne me suis jamais entendu aussi bien avec quelqu'un !!! Je suis tellement chanceuse de t'avoir rencontrée et honorée d'avoir connu ta très belle famille. On a tellement de beaux souvenirs ensemble, des moments exceptionnels et uniques que je garderai toujours avec moi. MERCI MA BELLE CHRISTEL.

Sophie YVON, merci pour tes encouragements continus et pour tes précieux conseils. Tu as été ma source de motivation, une amie à qui je me confiais et me défoulais. Je garderai toujours un souvenir de nos tours en « golfette » à l'école pour un peu se détendre et ta fameuse phrase NO STRESS !! MERCI DU FOND DE MON CŒUR.

Loubnah BELAHCEN, et Gwenaëlle JARD, j'aimerais aussi beaucoup vous remercier pour m'avoir encadrée, pour avoir été toujours prêtes à me donner de votre temps à tout moment.

J'adresse cette phrase de remerciement à tous les membres de mes 2 équipes d'encadrement: MERCI pour vos qualités professionnelles et humaines, votre bonté et générosité.

Remerciements

Je souhaite remercier Abirami, Marie-Aurore et Grégory des amis et collègues que j'étais chanceuse d'avoir connu. Merci beaucoup pour votre écoute et vos encouragements.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé à la réussite des travaux aux laboratoires : Ghassan ABD EL MENHEM, Samia HARFOUCHE, Marwa RAMMAL, Coralie BRETON et Flor SAISSET.

Je remercie énormément Angélique et Etienne, les stagiaires en Master 2 qui m'ont accompagnée durant mes travaux de thèse à Purpan. Avec chacun de vous deux, j'ai passé de beaux moments et j'en garderai des souvenirs pour toujours. Merci les amis.

J'adresse également toute ma gratitude à l'équipe de l'INRAE Institut Agro Montpellier: Delphine SICARD, Frédéric BIGEY, Sylvain SANTONI et Lucas VON GASTROW, pour m'avoir accompagnée durant mon travail de recherche et apprise beaucoup de choses. Un spécial MERCI à toi Delphine de m'avoir accueillie chez toi durant mon séjour à Montpellier. J'étais très contente de rencontrer ta belle famille !! Ce sont des souvenirs qui resteront avec moi toute ma vie.

Je remercie aussi Marie-Line DAVERAN-MINGOT, Catherine BEAL, Céline DELBÈS et Pierre RENAULT, les membres de mon comité de thèse, pour leur nombreux conseils très appréciés durant ce travail.

Je remercie tous les producteurs de labneh Ambaris avec qui j'ai travaillé. Sans vous ce travail n'aura jamais vu le jour. Une mention spéciale à Abla MAJED, la productrice que j'ai eu la chance de travailler avec. Tu m'as supportée tout au long de ma thèse, tu étais prête à m'ouvrir les portes de ton usine gentiment très tôt le matin ou même très tard le soir. On avait une relation spéciale qui dépassait le cadre scientifique. Merci beaucoup pour tout, tu as un très beau cœur et une conscience très rare de nos jours.

Maintenant, place aux remerciements sur le plan personnel

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, pour toutes les opportunités qu'il m'a données et les personnes qu'il a mis sur mon chemin toutes ces années. Merci pour m'avoir donné la force de continuer ce projet ainsi que le soutien et le courage pour dépasser toutes les difficultés.
Je désire fortement remercier de tout mon cœur mes très chères amies, Choghag et Elana. Vous avez facilité mon séjour en France et m'avez donné l'impression d'être entourée de ma famille. Merci beaucoup !!

Je tiens à remercier aussi mes amies Zeina (ma meilleure amie depuis plus de 20 ans !!) et Vera. Vous êtes irremplaçables. Merci pour tout le soutien que vous m'avez donné et vos gentils mots d'encouragement depuis toujours.

Elizabeth, je te remercie de tout mon cœur. Tu étais toujours à l'écoute !!

J'ai également une pensée pour Pamela, mon amie que j'ai rencontrée au cours de ma thèse, qui m'a précieusement aidée, me supportait râler pas mal de temps et m'encourageait. Un grand Merci !!

Maman, ma force, mon inspiration, ma principale source d'encouragement. Tu es la personne la plus forte et la plus courageuse que je connais. Merci de m'avoir passé tes valeurs. Je suis devenue la personne que je suis grâce à toi maman. Merci pour tes prières, merci de m'avoir donné confiance dans les moments les plus difficiles. MERCI HABIBE.

Papa, ma main droite, mon gardien. Je te dois toute ma thèse. Je n'oublierai jamais nos longs trajets ensemble pour récupérer TOUS les échantillons de labneh. Tu m'as toujours accompagnée, aidée et encouragée sans jamais te plaindre. MERCI BABA.

Almaza, ma meilleure amie, la gardienne de mes secrets, la personne avec qui je partage tout. Le jour qu'on attendait est arrivé, et ta grande sœur est enfin docteur !! C'est à toi maintenant dans quelques jours ;) Ma très chère petite sœur, je ne te remercierai jamais assez. Ta présence dans ma vie est un vrai miracle. Tu me donnes le courage et la force pour continuer et ne jamais lâcher. MERCI MAZ.

Fakher, mon grand frère, mon chouchou. Tu ne pourras pas lire ces quelques lignes mais j'aimerai te dire que tu as toujours été ma source d'inspiration et de persévérance. Sois sûre que ta « nana » restera toujours à tes côtés. MERCI YA SHATIR.

Joseph, mon chéri, ma source de motivation. Je suis tellement chanceuse que la vie t'as mis sur mon chemin. Tu es une personne magnifique, ton cœur et ton âme sont extraordinaires. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, d'avoir toujours cru en moi même quand je m'en doutais. Merci de m'avoir supportée pendant mes moments les plus difficiles. Tu es mon ange gardien. MERCI HABIBE.

Résumé

Le labneh Ambaris est un lait fermenté libanais traditionnellement fabriqué avec du lait cru de chèvre dans des jarres spécifiques en terre cuite. Il est largement apprécié des consommateurs et représente une source de revenue non négligeable pour les producteurs. Nos modes de vie et l'industrialisation des procédés de fabrication questionnent sur le devenir des microorganismes endogènes qui structurent ce produit, patrimoine immatériel du Liban. Le premier objectif de cette thèse, menée dans des conditions réelles de fabrication, était de caractériser le labneh Ambaris en mettant l'accent sur les écosystèmes microbiens impliqués dans sa réalisation. Ainsi, une cartographie de ce lait fermenté, tant sur le plan physicochimique et microbiologique que sur le plan sensoriel a été établie. Les approches multidisciplinaires utilisées et notamment la « Next Generation Sequencing » nous ont fourni une vision globale du labneh Ambaris se présentant sous la forme d'un écosystème microbien complexe dont la biodiversité dépend des exploitations. Ce lait fermenté égoutté est acide (pH moyen de 3,4) et une matière sèche moyenne de 35%. Les espèces bactériennes et fongiques dominantes identifiées sont *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* ainsi que *Geotrichum candidum* et *Pichia kudriavzevii*. Après construction d'un lexique sensoriel, le labneh Ambaris a été décrit comme ayant un goût acide accompagné d'une odeur et d'une saveur de chèvre. Par comparaison des profils microbiens des produits issus des laits crus et des laits pasteurisés, il semblerait que le lait ne soit pas le seul facteur déterminant de la diversité microbienne (ou du moins pas directement), suggérant des rôles de la flore résidente chez le producteur. Dans la troisième partie de cette thèse, les résultats ont confirmé que les espèces cœur identifiées s'installent précocement dans le produit et y persistent jusqu'à la fin de la maturation avec des abondances variables selon le stade de fermentation. Ils ont aussi suggéré qu'au démarrage de la fermentation, l'éventuelle contribution des flores résiduelles de la jarre, agissant comme starter, serait une piste à explorer. Par la suite, les flores semblent s'équilibrer de façon à évoluer similairement et indépendamment du contenant/ de l'âge du contenant.

Les résultats de cette thèse constituent un point de départ et méritent d'être poursuivis pour mieux comprendre les rôles fonctionnels des espèces majoritaires, des facteurs biotiques et abiotiques qui régissent la biodiversité microbienne de ce produit, dans l'objectif de protéger et de valoriser le labneh Ambaris, et *in fine* de lui donner une place au sein de l'économie nationale et mondiale.

Mots clefs: savoir-faire, patrimoine libanais, lait fermenté, évolution microbienne, analyse sensorielle, metabarcoding, flores indigènes

Abstract

Labneh Ambaris is a Lebanese fermented milk product traditionally made with raw goat's milk in specific earthenware jars. It is widely appreciated by consumers and represents a significant source of income for the producers. Our lifestyles and the industrialization of manufacturing processes raise questions about the future of the indigenous microorganisms that structure this product, intangible heritage of Lebanon. The first objective of this thesis, conducted under real production conditions, was to characterize labneh Ambaris by focusing on the microbial ecosystems involved in its production. Thus, in the first place, a map of this fermented milk was established on physicochemical, microbiological and sensory levels. The multidisciplinary approaches used and in particular the "Next Generation Sequencing" provided a global vision of labneh Ambaris representing a complex microbial ecosystem whose biodiversity depends on the producers' facilities. The bacterial and fungal dominant species identified were *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lactococcus lactis* as well as *Geotrichum candidum* and *Pichia kudriavzevii*. This concentrated fermented milk is acidic with an average pH of 3.4 and an average dry matter of 35%. After developing a sensory lexicon, labneh Ambaris was described as having an acidic taste accompanied by the smell and flavor of goat. From a sanitary point of view, this product is mostly free of pathogens. In the second part of this thesis, we showed that milk was not a determining factor in the microbial diversity of labneh Ambaris, rather suggesting possible roles of the resident flora at the producer, whether the milk used is pasteurized or raw. In the third part of this thesis, our results confirmed that the dominant species identified settle early in the product and persist until the end of maturation with variable abundances depending on the stage of fermentation. They also suggested that at the start of fermentation, the possible contribution of residual flora from the old jar, acting as a starter, would be interesting to explore. As the fermentation goes on, the microbial ecosystems seem to evolve similarly and independently of the container / the age of the container.

The results of this thesis constitute a starting point and deserve to be carried on to better understand the functional roles of the dominant species, in addition to the biotic and abiotic factors that govern the microbial biodiversity of this product, with the aim of protecting and enhancing it, and ultimately to give it a place in the national and global economy.

Keywords: know-how, lebanese heritage, fermented milk, microbial evolution, sensory analysis, metabarcoding, indigenous flora.

Communications scientifiques

Publications

Microbial communities and main features of labneh Ambaris, a traditional Lebanese fermented goat's milk product.

Reine Abi Khalil, Sophie Yvon, Christel Couderc, Loubnah Belahcen, Gwenaelle Jard, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Hélène Tormo*, Marie-José Ayoub*.
Publié dans *« Journal of Dairy Science ».* DOI: 10.3168/jds.2022-22275

Artisanal household milk pasteurization is not a determining factor in structuring the microbial communities of labneh Ambaris: a pilot study.

Reine Abi Khalil, Christel Couderc, Sophie Yvon, Gwenaelle Jard, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Hélène Tormo*, and Marie-José Ayoub*.
Publié dans *"Foods".* DOI: 10.3390/foods11233874

Microbial dynamics during labneh Ambaris production in earthenware jars.

Reine Abi Khalil, Christel Couderc, Sophie Yvon, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Marie-José Ayoub* and Hélène Tormo*.
Article scientifique soumis dans *« International Journal of Food Microbiology ».*

Traditional fermented milks of Eastern Mediterranean countries: a cultural heritage to preserve.

Reine Abi Khalil, Sophie Yvon, Christel Couderc, Gwenaelle Jard, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Marie-José Ayoub*, Hélène Tormo*.

Revue bibliographique soumise dans *« Food Reviews International ».*

Communication orale

Identification des communautés bactériennes du labneh Ambaris, un produit laitier traditionnel Libanais.
Reine Abi Khalil, Sophie Yvon, Christel Couderc, Loubnah Belahcen, Gwenaelle Jard, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Marie-José Ayoub & Hélène Tormo.
Présenté au *23ème colloque du club des bactéries lactiques, Rennes, 8 Juin 2022*.

Communications affichées

Caractérisation globale de l'Ambaris, produit fermenté traditionnel Libanais, sur les plans microbiologique, physico- chimique et sensoriel.
Reine Abi Khalil, Sophie Yvon, Loubnah Belahcen, Christel Couderc, Gwenaelle Jard, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Marie-José Ayoub, Hélène Tormo.
Poster, 16ème congrès national de la Société Française de Microbiologie, Nantes, 22-24 Septembre 2021.

Vulgarisation scientifique

L'ambaris : Produit du terroir, raconte-moi ton histoire.
Article disponible sur Franceagro3, 5 Mai 2021:
https://www.franceagro3.org/fr/lambaris-produit-du-terroir-raconte-moi-ton-histoire.

Sommaire

Remerciements 1

Résumé 6

Abstract 7

Communications scientifiques.....9

Sommaire.....12

Liste des illustrations 14

Liste des tableaux.....16

Abréviations 17

Introduction générale 19

Etude bibliographique 24

Chapitre I : Les laits fermentés traditionnels de la Méditerranée orientale 25
I.1 Les laits fermentés traditionnels, un héritage culturel à conserver.....25
I.2 Les laits fermentés traditionnels du Liban 54
I.2.1 Le labneh Ambaris : un lait fermenté par des microorganismes endogènes ...55

Chapitre II – Les communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes 62
II.1 La diversité microbienne des laits fermentés par des microorganismes endogènes 64
II.2 Les intérêts des communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes pour l'Homme 68
II.3 Les origines des communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes 69
II.3.1 Les laits crus 69
II.3.2 Les ferments naturels 72
II.3.3 Les matériaux et l'environnement laitier 73
II.4 La sélection des microorganismes par les paramètres physicochimiques des laits fermentés par des microorganismes endogènes.....75
II.4.1 L'acidité.....76
II.4.2 Le taux de sel.....76
II.4.3 L'activité de l'eau 77
II.5 Les interactions microbiennes au cœur de la structuration des communautés 78

II.6 Les méthodes de détection et d'identification des communautés microbiennes 79
II.6.1 Les méthodes culture-dépendantes 81
II.6.1.1 Identification par méthodes biochimiques et spectrales 81
II.6.1.2 Identification par méthodes de biologie moléculaire 82
II.6.2 Les méthodes culture-indépendantes : les approches –omiques.....84
II.7 Etude de la diversité microbienne au sein d'un écosystème.....87
II.7.1 Les indices de diversité α 87
II.7.2 Les indices de diversité β 89

Objectifs et démarche expérimentale 91

Résultats 93

Résultat I.....94

Résultat II 124

Résultat III.....138

Discussion généraleet perspectives.....181

Conclusion générale.....205

Références 208

Annexes.....232

Liste des illustrations

Figure 1. Carte du Liban montrant les dénominations du produit selon les régions. 55

Figure 2. Procédé de fabrication du labneh Ambaris.....57

Figure 3. Certaines étapes du procédé de fabrication du labneh Ambaris. 58

Figure 4. Les contenants, autre que la terre cuite, utilisés par certains producteurs pour la fabrication du labneh Ambaris. 59

Figure 5. Procédés de fabrication du kéfir de lait, du labneh Ambaris et du fromage à coagulation lactique. 61

Figure 6. Organisation écologique des microorganismes et leurs communautés. 63

Figure 7. Gerle utilisée pour la production du fromage AOP Salers. 74

Figure 8. Schématisation des sources potentielles des microorganismes endogènes dans les laits fermentés traditionnels. 75

Figure 9. Processus et mécanisme de formation des grains de kéfir tibétain. 79

Figure 10. Organigramme des méthodes culture-dépendantes et indépendantes utilisées pour identifier les espèces microbiennes dans les produits laitiers. 80

Figure 11. Indices de diversité alpha α et beta β au sein des échantillons de produits laitiers. 87

Figure 12. Démarche expérimentale générale pour répondre aux objectifs de la thèse. 92

Figure 13. Etapes du procédé concernées en lien avec les chapitres I, II et III des résultats. 92

Figure 14. Carte du Liban montrant les régions desquelles les échantillons en fin de fermentation de la campagne de 2020 ont été collectés. Les 17 producteurs sont référés sur la carte par des points rouges. 95

Figure 15. Carte du Liban montrant les régions desquelles les échantillons en cours de fermentation de la campagne de 2020 ont été collectés. Les 12 producteurs (6 laits crus et 6 laits pasteurisés) sont référés sur la carte par des points jaunes. 125

Figure 16. Le producteur sélectionné pour la campagne d'échantillonnage de 2021 chez lequel nous avons comparé les suivis de fermentation dans deux jarres, une nouvelle et une utilisée. 139

Figure 17. Caractéristiques communes et différences spécifiques rencontrées sur les 20 échantillons de labneh Ambaris collectés chez 17 producteurs. 184

Figure 18. Evolution des communautés bactériennes dans le labneh Ambaris et les échantillons de lactosérum prélevés le même jour lors de la production à partir de 2 jarres en terre cuite, une ancienne et une neuve par séquençage de la région V3-V4 de l'ADNr 16S. 194

Figure 19. Evolution des communautés fongiques dans le labneh Ambaris et les échantillons de lactosérum prélevés le même jour lors de la production à partir de 2 jarres en terre cuite, une ancienne et une neuve par séquençage de la région ITS2. 195

Figure 20. Analyse des communautés microbiennes par metabarcoding A) bactériennes et B) fongiques dans 13 échantillons de labneh Ambaris collectés chez le même producteur. Répartition des 10 espèces les plus dominantes. 198

Liste des tableaux

Tableau 1. Diversité microbienne des kéfirs de lait artisanaux et industriels de différents pays d'origine. 66

Tableau 2. Intervalles des compositions biochimiques des laits de différentes espèces par 100g de lait.....70

Abréviations

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

AFNOR: Association Française de Normalisation

AOP: Appellation d'Origine Protégée

API: Analytical Profile Index

ARNr: Acide Ribonucléique ribosomal

ASV: Amplicon Sequence Variants

ATP: AdénosineTriphosPhate

BL: Bactéries lactiques

CO_2: Dioxyde de carbone

DADA2: Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2

EPS: Exopolysaccharides

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA: Food and Drug Administration

FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution

GRAS: Generally Regarded As Safe

ISO: International Organization for Standardization

ITS: Internal Transcribed Spacer

MAG: Metagenome-Assembled Genomes

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

NGS: Next Generation Sequencing

NSLAB: Non-Starter Lactic Acid Bacteria

OTU: Operational Taxonomic Unit

PCR: Polymerase Chain Reaction

PP : Pivot Profile

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SFAS : Société Française d'Analyse Sensorielle

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction générale

Les aliments fermentés constituent depuis l'antiquité une partie importante de l'alimentation humaine (Tamang *et al.*, 2020). La fermentation est l'une des méthodes les plus anciennes et les moins coûteuses utilisées pour la conservation des produits (Kabak and Dobson, 2011; Chandan, 2013; Tamang *et al.*, 2020). Brièvement, il s'agit de la transformation enzymatique des matières premières par des microorganismes. Ces derniers produisent notamment des acides organiques, abaissant de ce fait le pH de la matrice. En plus de contribuer à la sécurité sanitaire des aliments, la fermentation a de nombreux rôles tels que le changement de la texture et de la saveur de la matière première, ainsi que l'amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments (Abou-Zeid, 2016).

Les produits laitiers fermentés traditionnels sont élaborés à partir d'un savoir-faire ancestral transmis de génération en génération (Alichanidis and Polychroniadou, 2008). Au-delà de constituer des ressources économiques aux populations locales, ces produits dont la fabrication témoigne de l'histoire et de l'identité des populations, possèdent une forte valeur culturelle (Duteurtre, 2009). Leurs caractéristiques uniques sont le résultat de plusieurs facteurs combinés tels que les pâturages, les races, les méthodes et ustensiles de production, et, surtout, les communautés microbiennes qui les colonisent (Coulon *et al.*, 2004; Montel *et al.*, 2014). Parmi ces produits, on distingue un produit laitier fermenté traditionnel faisant partie du patrimoine immatériel libanais: le labneh Ambaris. Ce produit est fabriqué à partir de lait cru de chèvre et de gros sel dans des jarres en terre cuite. Les habitudes alimentaires et les attentes des consommateurs vis-à-vis des produits laitiers évoluent, avec une forte demande actuelle pour des produits ayant une qualité sanitaire irréprochable. Cette évolution amène à quelques changements dans le procédé de fabrication, notamment le remplacement des jarres en terre cuite par des contenants en plastique ou en acier inoxydable et l'utilisation de lait pasteurisé à la place du lait cru. Certaines études portant sur le labneh Ambaris ont été publiées ou sont en cours de publication. Elles ont principalement étudié les caractéristiques physicochimiques du produit et sa qualité sanitaire (Serhan and Mattar, 2013; Tabet *et al.*, 2019; Dimassi *et al.*, 2020a; Ayoub *et al.*, 2022), l'influence du contenant sur ses propriétés physicochimiques (Tabet *et al.*, 2019; Dimassi *et al.*, 2020b) ou encore ses populations fongiques (Ayoub *et al.*, 2022) ainsi que les propriétés probiotiques de certaines espèces de *Lactobacillus*

isolées du labneh Ambaris (Abiad *et al.*, 2022). Cependant aucune étude n'a fait l'objet d'une approche approfondie sur le produit en utilisant des méthodes culture-indépendantes pour les analyses microbiologiques ou n'a exploré ses propriétés sensorielles.

Dans ce contexte, cette thèse vise à caractériser le labneh Ambaris à la fois sur les plans physicochimique, sensoriel et microbiologique, en mettant l'accent sur les communautés microbiennes qui le constituent, en combinant méthodes culture- dépendantes et culture-indépendantes. Elle est le fruit d'une collaboration entre le département « Sciences de l'agroalimentaire et de la nutrition » de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan et les départements « Sciences et technologies alimentaires » et « Production animale » de l'Université Libanaise - Faculté d'Agronomie. Elle constitue un premier pas vers la conservation, la valorisation et la protection d'un patrimoine culinaire libanais. Nous avons visé dans un premier temps à établir une cartographie générale d'échantillons de labneh Ambaris collectés en fin de maturation, sur les plans physicochimique, microbiologique et sensoriel. Dans la deuxième partie, nos travaux de thèse se sont centrés sur l'exploration de l'impact éventuel que pourraient avoir les nouvelles pratiques de fabrication, particulièrement la pasteurisation du lait, sur les communautés microbiennes du produit. Finalement la troisième partie a consisté à étudier l'évolution et l'implantation des communautés microbiennes (bactéries et levures/moisissures) lors de la fabrication du produit. L'impact probable du remplacement de la jarre utilisée couramment par le producteur par une nouvelle jarre, notamment la flore résiduelle, sur les communautés microbiennes du labneh Ambaris a également été exploré.

Le présent manuscrit a été structuré en trois grandes parties. La première, consiste en un état de l'art initié par une revue bibliographique portant sur des produits laitiers fermentés traditionnels de la Méditerranée orientale, produits reflétant le patrimoine culinaire de ces pays et qui représentent un apport économique important pour les pays producteurs. En suivant, plusieurs chapitres viennent recueillir des informations de la littérature en lien avec les objectifs et les résultats de cette thèse. La deuxième partie du manuscrit regroupe l'ensemble des résultats obtenus sous forme de trois articles scientifiques. Le premier article présente une cartographie générale des labneh Ambaris collectés en fin de maturation, sur les plans physicochimique, microbiologique et sensoriel. La deuxième

publication prend la forme d'une short communication, dans laquelle les compositions microbiennes d'échantillons de labneh Ambaris fabriqués à partir de laits crus sont comparées à celles d'échantillons fabriqués à partir de laits pasteurisés, dans le but de mettre en évidence un éventuel effet du traitement thermique sur les communautés microbiennes présentes dans les produits prélevés au même stade de fermentation. Enfin, la troisième publication illustre l'installation et l'évolution des communautés microbiennes (bactéries et levures/moisissures) tout au long du procédé de fabrication du labneh Ambaris élaboré à partir de lait cru dans deux jarres dont l'une n'a jamais été utilisée pour l'élaboration du produit. Enfin, une discussion générale portant sur l'ensemble de ces résultats et permettant de dégager des perspectives sera présentée. Ce manuscrit de thèse s'achèvera par une conclusion générale.

Etude bibliographique

Chapitre I : Les laits fermentés traditionnels de la Méditerranée orientale

I.1 Les laits fermentés traditionnels, un héritage culturel à conserver

Dans les pays de la Méditerranée orientale, les laits fermentés ont toujours constitué une part importante de l'alimentation quotidienne des populations. Les habitants ont depuis toujours cherché à transformer le lait collecté, cette matière première étant facilement périssable. La fermentation est l'une des techniques les moins coûteuses et parmi les plus efficaces pour la conservation des aliments. De nombreux laits fermentés ont été développés de façon artisanale pour subvenir aux besoins des Hommes. À travers ce qui suit, une revue bibliographique portant sur les principaux laits fermentés traditionnels fabriqués dans des pays de la Méditerranée orientale est présentée. Pour les produits sélectionnés, leurs procédés de fabrication artisanaux et typiques sont détaillés, en mettant en relief les ustensiles spécifiques utilisés pour leurs productions. Les caractéristiques physicochimiques, microbiologiques, ainsi que leurs bienfaits sur la santé humaine sont les grandes parties traitées dans cette revue bibliographique.

Traditional fermented milks of Eastern Mediterranean countries: a cultural heritage to preserve

Reine Abi Khalil[a,b,+], Sophie Yvon[b,c,+], Christel Couderc[b], Gwenaelle Jard[b], Rabih El Rammouz[d], Pierre Abi Nakhoul[a], Hélène Eutamène[b,c], Marie-José Ayoub[a,*,+], Hélène Tormo[b,*,+].

[+] These authors contributed equally to this paper

Revue bibliographique soumise dans *« Food Reviews International».*

[a] *Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon;* [b] *Département Sciences de l'agroalimentaire et de la nutrition, Université de Toulouse, INP EI-Purpan, 75 voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse cedex 3, France;* [c] *Toxalim UMR 1331, INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse, Toulouse, France;* [d] *Department of Animal production, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon.*

* Corresponding authors

Hélène Tormo, Département Sciences de l'agroalimentaire et de la nutrition, Université de Toulouse; INP EI-Purpan, 75 voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse cedex 3, France. Email: helene.tormo@purpan.fr.

And

Marie-José Ayoub, Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon. E-mail: mayoub@ul.edu.lb.

Authors' names and emails

Reine Abi Khalil, reineabikhalil94@gmail.com, https://orcid.org/0000-0002-3081-5142
Sophie Yvon, sophie.yvon@purpan.fr, https://orcid.org/0000-0002-0592-2675
Christel Couderc, christel.couderc@purpan.fr, https://orcid.org/0000-0002-6941-6915
Gwenaelle Jard, gwenaelle.jard@purpan.fr, https://orcid.org/0000-0003-0578-2438
Rabih El Rammouz, rabih.elrammouz@ul.edu.lb, https://orcid.org/0000-0002-5833-4543
Pierre Abi Nakhoul, pabinakhoul@ul.edu.lb, https://orcid.org/0000-0002-0457-9000
Hélène Eutamène, helene.eutamene@purpan.fr, https://orcid.org/0000-0002-2983-1938
Marie-José Ayoub, mayoub@ul.edu.lb, https://orcid.org/0000-0002-5511-7180
Hélène Tormo, helene.tormo@purpan.fr, https://orcid.org/0000-0003-2097-8703

Traditional fermented milks of Eastern Mediterranean countries: a cultural heritage to preserve

Fermented milks play an important role in the diet of many populations around the world, particularly those of the Eastern Mediterranean countries, where their consumption contribute to the populations' food security and welfare. Every product has its own manufacturing process, resulting in unique physicochemical, microbiological and sensorycharacteristics. Given the limited information available about these products, it is essential to have a thorough understanding of their production techniques, microbiological and physicochemical characteristics, in order to contribute to their preservation and valorization. In this review, 12 traditional fermented milks from countries that border the Eastern Mediterranean Sea were explored.

Keywords: culinary heritage, microbial composition, food safety, traditional fermented milks.

Introduction

Fermented milks are food products "obtained by fermentation of milk by the action of suitable microorganisms and resulting in reduction of pH with or without coagulation (iso-electric precipitation)"[1]. Their manufacture and consumption date back to more than 10 000 years ago, when the first animals were domesticated by humans[2, 3]. They are made using unique know-how passed on from the previous generations[4]. These products, closely linked to their terroir, have special characteristics as the result of several combined natural and human factors, such as climate, breeds, region's history, production processing methods and utensils, and the surrounding environment[5–7]. The Eastern basin of the Mediterranean Sea is bordered by the following countries and territories: Turkey, Syria, Lebanon, Palestine and Egypt[8, 9]. These countries, located in a vicinal geographical area, share common food practices including the use of basic tools and the combination of both empirical and technological know-how for the production of traditional foods[10, 11]. Fermented milks constitute an important part of the daily diet of theEastern Mediterranean populations. Because of their traditional aspect, consumers consider them as a cultural heritage and see them as artisanal and natural[12]. Fermented milks are mainly produced within rural communities, which represent an important part of the inhabitants of most of the countries reviewed hereafter (Figure 1): 50 to 60% of Egypt's total population, 40 to 50% of Syria's total population, 20 to 30% of Turkey and Palestine'stotal populations, and

10 to 20% of Lebanon's total population[13]. Indeed, the social welfare and food security of these rural populations are still deeply dependent on agricultural and farming activities[14]. The production and trade of such traditional productscreate a demand for raw materials and work force, therefore providing job opportunities for the local communities[15].

Most of the traditional fermented milks are mainly the result of lactose fermentation by lactic acid bacteria (LAB) either present naturally in milk (spontaneous fermentation) or intentionally added to control fermentation usually by "back-slopping" method (a small amount of the previous production is used as an inoculum for the new one)[16]. During acidification, when the isoelectric point of caseins is reached, proteins coagulate and therefore gel networks are formed[17, 18]. The originality and typicality of the resulting products are marked by the interactions between biotic and abiotic factors, highlighted by human skills[19]. As mentioned in Celsus' De Medicina, these products have been used for thousands of years as remedies to treat illnesses because they are believed to have beneficial effects on human health. There is currently very little scientific knowledge on the key characteristics of the majority of traditional fermented milks from the Eastern Mediterranean, and even less about their health implications. In this review, we provide an overview of i) the production processes of the main traditional fermented milks in the previously mentioned countries of the Eastern Mediterranean region, ii) their physicochemical and microbiological characteristics as well as iii) their potential health benefits, their sanitary and safety aspects.

Production processes and physico-chemical properties

The fermented milks presented are various, but have something in common: no enzymatic coagulating agent is added. Instead, they are produced by lactic fermentation. Since milk is coagulated by the action of lactic acid bacteria, all products are acidic with pH values ranging from 2.85 (laban Zeer) to 5.00 (Kishk). Some of them are produced from raw milk such as laban Rayeb, labneh Ambaris, and laban Khad, while for the others, Laban, also called Zabady in Egypt[20] is used as the starting ingredient (Figure 2). Salt is an important common ingredient used in most of these fermented milks with values ranging from no

addition up to 11% according to the production processes (Table 1). Salt has been historically used to inhibit the growth of pathogenic and spoilage microorganisms while promoting the development of beneficial salt-tolerant microorganisms, mostly LAB, which are responsible of the fermentation[21]. According to the Codex Alimentarius[1], fermented milks can be divided into four groups: fermented milks (group A), concentrated fermented milks (group B), drinks based on fermented milks (group C) and flavored fermented milks (group D). Concerning their consumption habits, these fermented milks can be consumed at different stages of the process: fresh (such as Laban), partially or completely drained (such as Labneh, labneh Ambaris and labneh Darf), before or after the drying (Kishk) or maturation (Shanklish). The products in group A are characterized by having liquid or gel textures, since they are obtained only following milk fermentation by microorganisms. Herein the following products can be placed: laban, laban Rayeb and laban Khad, having minimum 86% moisture contents (Table 1)[22]. The milk could be skimmed in laban Rayeb production and the cream could be used to make butter (Figure 2), which explains the low fat content of this product (Table 1). Group B brings together all fermented milks that have a concentration step within their production processes resulting in minimum protein contents of 5.6% [1]. The concentration step could be made by draining the whey as done for most of the products (laban Zeer, labneh Ambaris, labneh Darf, Labneh and Kurut - Figure 2). As for Shanklish, also classified in group B, the Laban is heated until coagulation that will be followed by whey draining. The concentration step can also be realized by boiling until evaporation (Tuzlu yoghurt). The high protein contents of these two products could be explained by the last steps of the production process: maturation at ambient temperature for the Shanklish balls and drying in the sun for Kurut (Table 1, Figure 2). The highest fat contents were recorded for Kurut, most probably linked to the addition of cream to the mixture, which increases the fat content of the final product.

Concerning Ayran, it is the only drink (group C) prepared from a fermented milk where Laban is diluted by mixing with 50% w/w water and some salt, resulting in a relatively thick consistency. The last group D includes the flavored fermented milk Kishk, obtained by mixing Laban with a preparation of wheat grains (Figure 2). It is the driest product among the traditional fermented milks presented (87 to 94 % dry matter). Laban, Labneh and Ayran are made in households and are largely produced at industrial scales to meet

market needs. For the production of commercial Laban, yoghurt starter cultures (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) to standardized pasteurized milk. Laban produced in households is made by usually adding commercial Laban to artisanally pasteurized milk. For the production of Labneh, industries use previously prepared Laban and employ one of these concentration options: the traditional method (that consists of straining in cloth bags for 12 to 18 hours), mechanical separators or ultrafiltration[23]. To our knowledge, the information available in the literature are based on commercial Labneh. As for Ayran, the traditional production process adopted in households (Figure 2) is based on the addition of water and salt to previously prepared Laban. At the industrial scale, Ayran is made by mixing water and salt with previously prepared Laban[24]. Each of these traditional fermented milks has unique sensory characteristics, and the various production processes are closely dependent on specific utensils used (Figure 3). Laban Rayeb, labneh Ambaris and laban Zeer are produced in special earthenware jars (Figure 4). Laban Khad and labneh Darf are both made in goatskins called *Kerbah* and *Darf* respectively.

Microbial communities

Before getting into the details of the products' microbial compositions, it is worth noting that most of the products microbiological compositions available in the literature and presented in this review are based on culture-dependent methods, which require plating and microbial counting on selective and nutritive media. These methods require laborious preparation steps ahead of testing, and permit only the detection of species that are in a viable and cultivable state. Consequently, they only give a snapshot of a product's diversity at a given moment. They may also underestimate the microbial diversity of a given ecosystem. On another hand, culture-independent techniques have gained popularity in recent years for the study of microbial populations. These methods rely on total DNA analysis using high-throughput sequencing (HTS) molecular techniques. The latter provide more detailed information on both common and unusual species, providing a more global picture of the entire microbial community in the studied food matrix[25–27]. However, these methods don't provide information about the state (viable or not) of the detected microorganisms at the time of sampling. Many published studies used these methods to

characterize microbial communities of traditional fermented milks such as: Kefir[28–30], Mabisi[31], and several other dairy products[32]. Out of the 12 products cited in this review, only the microbial communities of labneh Ambaris were recently identified using DNA metabarcoding technique[33, 34] and the fungal communities of labneh Darf[35] using metagenetic approaches.

Bacterial and fungal species

As per the old nomenclature[36], *Lactobacillus* is the dominant bacterial genus within the fermented milks presented in this review (Table 2), and it encompasses a wide diversity of species ranging from 2 bacterial species in Labneh and Kurut to 18 species in laban Rayeb, and from 1 detected fungal species in Labneh to 18 species in labneh Ambaris (Table 2). Out of the 10 products referenced in the literature, *Lactiplantibacillus plantarum* is particularly found in more than half of the products, except for Kurut, Laban, Labneh, and Ayran. *Lactococcus lactis* is present in three products and *Leuconoctoc* spp. in four products (Table 2). As for Tuzlu yoghurt, to our knowledge, no microbiological studies were found within the literature. The microbial composition of laban Khad, was interestingly shown to diverge between winter, when the major microorganisms are mesophilic lactococci, and summer, when thermophilic lactobacilli are mainly present[37]. The non-LAB (lactic acid bacteria) found in Shanklish were mainly pathogens such as *Bacillus pumilus, Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus lentus,* in addition to the non-pathogen *Bacillus amyloliquefaciens*[38]. Interestingly, bacteria described as probiotics such as *L. plantarum, Levilactobacillus brevis,* and *Lacticaseibacillus casei* have been identified in most of the reported fermented milks (Table 2).

Although there is less information available about yeasts, since most studies only focused on LAB, they are also isolated from the fermented milks considered in this review. These yeasts associated with the LAB may play a crucial role as part of the technologically significant fermentative microflora. According to Table 2, *Saccharomyces cerevisiae* was found in half of the products (laban Khad, Labneh, laban Zeer, labneh Ambaris, labneh Darf, Kishk), in addition to isolates of the fungal genera *Debaryomyces, Candida*, *Geotrichum*, *Pichia*, *Saccharomyces,* and *Kluyveromyces* that are typically found in milk

and milk products[39, 40]. Yeasts are known to withstand acidic media, grow and develop in them (Table 1). Yeasts can interact with the fermenting LAB to positively contribute to the fermentation process. They support the growth of LAB through the production of vital growth metabolites like amino acids and vitamins. Some also promote the metabolism of lactose and galactose and they contribute to lipolysis, proteolysis, and various enzymatic degradations, thus enhancing flavor development[39, 41].

Safety and sanitary aspects

Even though fermentation is expected to result in a safe food product for consumption[42], fermented milks could still vehicle the main human pathogens found in raw milk and dairy products such as *Staphylococcus aureus,* enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella sp*., *Salmonella sp*., and *Campylobacter sp*.[43, 44]. These pathogens of concern can be transmitted into dairy products in two ways. The first one is the use of contaminated raw milk where the transfer of pathogenic microorganisms can occur through contact with animal feces (*E.coli*, *Salmonella sp.*, and *Campylobacter sp*.), through contamination from the manipulator or the farm/herd environment (*Listeria monocytogenes*) or due to animal udder infections such as mastitis (*Staphylococcus aureus*). The second way is by cross-contamination of the dairy product during or after production by using contaminated utensils or applying low hygienic practices during handling and storage[45]. In some Eastern Mediterranean developing countries, milking animals is done mostly by hand, which vehicles microorganisms and consumes a lot of time, thus allowing pathogens to profiler in milk. Therefore, the resulting fermented milks are likely to have a relatively high contamination charge [46]. One of the major concerns of public health authorities in the Mediterranean region is *Brucella sp.,* a microorganism transmitted to humans from infected livestock through the consumption of contaminated milk, resulting milk products, or through direct contact with the infected animal [47].

Fermented milks are thought to be protected from pathogens growth, owing to their physicochemical properties (low pH, high salt content) and the diversity and equilibrium of the microbial communities they harbor, in which LAB are dominant. Several studies have demonstrated the ability of LAB to inhibit pathogenic microorganisms [48]. For example, some LAB exhibit antimicrobial activities by producing an important range of

bacteriocins such as nisin, in addition to the secretion of hydrogen peroxide [49, 50].

Even though most of the fermented milks reviewed are mainly produced at household levels under uncontrolled conditions, relatively few pathogens were detected within them. *Staphylococcus aureus* was found in laban Rayeb [51], labneh Ambaris [52], and Shanklish[53]. Fecal coliforms and *Enterobacteriaceae* species were detected in labneh Ambaris and Shanklish [33,34,52–55] but not in laban Zeer[56] or Kurut[57,58]. Not surprisingly, *Enterococcaceae* species have been identified in some of the fermented milks, particularly *Enterococcus faecium*, *E. durans* or *E. faecalis* (Table 2), as usually found in many traditional dairy products. Their presence is an indicator of fecal contamination, since generally most of these species are part of the intestinal microbiota of animals [59, 60]. Although usually regarded as pathogenic microorganisms, *Enterococcus spp.* have been recently presented as having probiotic properties [61, 62]. *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, and *Listeria sp.* were not detected in laban Rayeb [51], nor Shanklish[53], but in labneh Ambaris[34]. Several pathogens were also detected in Kishk samples belonging mainly to *Bacillus* genus, such as *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* [20, 42].

Very little information is available regarding intoxication cases by food pathogens in Eastern Mediterranean countries. This is mostly due to the lack of proper reporting schemes to concerned authorities or laboratory analysis issues. Furthermore, some cases of foodborne illnesses occur at home and are not reported due to citizens' lack of knowledge about the importance of reporting food-related health problems [63]. Since these traditional dairy products are very popular in their respective production regions, local authorities have an important role in spreading awareness and safety measures. Community leaders should work on implementing safety strategies for both large-scale and household-scale producers. The emphasis on proper hygienic practices, especially during the milking process, the use of clean utensils for production, and the extreme importance of reporting cases of serious pathogens among livestock should be encouraged[45, 63] especially that in most Eastern Mediterranean countries, it is a common practice to keep different livestock species close to human habitats, which increases pathogen transmission through direct contact between diseased animals and humans [64]. In addition, the implementation of recognized norms concerning these traditional dairy products would contribute to their protection and conservation as local culinary heritage, all while ensuring adequate

microbiological safety levels. This step, accompanied by awareness campaigns on the national and local levels could help take such products to regional and international trade markets [47].

Food and health applications

Nutritional composition

Milk has been used for human consumption ever since animals were domesticated [2]. Its basic constituents, which are proteins, fats, lactose, minerals, and vitamins (B5 and B12) make it a rich source of nutrients [65, 66]. It also contains immunoglobulins, hormones, growth factors, bioactive peptides and enzymes. Therefore, milk and its fermented dairy products play a key role in human nutrition especially in developing countries rural areas, being a rich source of macro and micronutrients. Fermented milks nutrient content is largely determined by the composition of the milk used, which in turn is influenced by a number of factors such as animal breed and age, lactation stage, season, flock location, feed, and milking intervals [7, 67].

Fermented milks can be considered as the best calcium-containing dietary source, because of their high content and absorbance rate by the digestive system. A 180g serving of plain yogurt provides the human body with 250 mg of calcium knowing that the nutritional recommendation for the population is approximately 1000 mg in adults per day [68, 69]. The activity of LAB during milk fermentation can result in modifications to the nutritional composition of milk that are favorable to the consumer. For instance, some LAB's proteolytic abilities might cause the release of free amino acids during fermentation [70].

Gille et al. [71] published a review of 25 meta-analyses studying the associations between the consumption of fermented dairy products (yogurts, cheeses, and fermented milks) and no communicable diseases in order to better understand the links between fermented foods and health. The nine analyses examining the links between the consumption of fermented milks and the risk of cancer did not show any harmful or beneficial effects. Then, 16 meta-analyses were considered to determine associations between the consumption of fermented dairy products and cardio metabolic diseases and highlighted a positive impact of the

consumption of fermented milk product on the risk of type 2 diabetes. This could be explained by the improvement of lipid profiles thanks to probiotic bacteria, by the microbial synthesis of vitamins, such as menaquinone (vitamin K2) or by the increase in the bioavailability of amino acids and insulinotropic peptides which could improve the insulin sensitivity [71].

Fermented milks as a source of probiotics

Traditional fermented milks are known to harbor a rich and diverse microbiota, composed mainly of LAB and yeasts, as described in Table 2. When ingested as living, some microorganisms considered as probiotic strains can provide health benefits [72, 73]. These strains ferment and break down indigestible foods into nutrients that the host can digest. several products are synthetized like branched-chain fatty acids, amines, organic acids, etc., that act as energy sources and exert anti-inflammatory properties[74]. Interestingly, fermented milks are the main source of probiotics in the human diet, especially lactobacilli bacterial species, or fungal species such as *Kluyveromyces marxianus* [75–77]. For example, *L. plantarum* strains (found in a majority of the products described in this review) are being investigated for their beneficial properties and being used in clinical interventions, notably for digestive pathologies [78]. Indeed, several *in vitro* and *in vivo* studies showed that food- associated *L. plantarum* demonstrate good adaptation and adhesion ability in the gastrointestinal tract, and exert antimicrobial, antioxidative, antigenotoxic, anti- inflammatory, and immunomodulatory properties [78].

Lacticaseibacillus rhamnosus, another species detected in several fermented milks reviewed here (Table 2), is capable to adhere to the intestinal mucosa [79]. Marianelli et al. [80] revealed that a strain of *L. rhamnosus* is able to suppress *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 1344 *in vitro*, demonstrating the probiotic's efficacy against this pathogen. Besides, in clinical studies, *L. rhamnosus* has been shown to prevent and help treat gastrointestinal infections and diarrhea in children [81, 82]. This strain also contributed to the reduction of diarrhea episodes duration and of nosocomial gastrointestinal infections risk [83]. Furthermore, *L. rhamnosus* reduces the frequency and the intensity of abdominal pain-related disorders in patients with irritable bowel syndrome [81]. Interestingly, despite its broad industrial and medical uses, *Kluyveromyces marxianus*,

a yeast species found within the fermented milks we reviewed (Table 2), is not yet recognized as a probiotic microorganism, although Homayouni-Rad et al. [84] recently proposed it. To our knowledge, few information is available in the literature concerning probiotic properties specifically related to the reviewed traditional fermented milks. Only a recent study by Abiad et al. [85] on presumptive lactobacilli isolated from labneh Ambaris, showed that out of 30 strains, 12 showed potential probiotic properties, including the abilityto withstand acid and bile as well as angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities.

Fermented milks as a source of prebiotics

Prebiotics are defined as "a selectively fermented ingredient that allows specific changes both in the composition and/or activity of the gastrointestinal microbiota, which confer benefits upon host wellbeing and health" [86]. These molecules are usually non-digestible oligosaccharides that must resist gastric acids hydrolysis. Prebiotics affect the microbiota already present in the human gut, especially bifidobacteria and lactobacilli species. They are normally fermented by these pre-installed microorganisms and activate or encourage their proliferation [76,86]. Galacto-oligosaccharides (GOS) are compounds found in fermented products. They are produced by the action of glycoside hydrolase enzymes such as β-galactosidase, using lactose as a substrate, the main sugar present in milk. These enzymes are produced by many bacteria such as *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus thermophilus*, and *Lactobacillus acidophilus*. Some fungi can also produce glycoside hydrolases such as *Kluveromyces lactis*, found in some of the fermented milks herein reviewed. GOS are well-known prebiotics since they affect the activities and composition of the intestinal microbiota.

Today, the research about functional foods has progressed significantly, with new emerging concepts, such as paraprobiotics, postbiotics and psychobiotics. These refer to the non-viable microorganisms or their metabolites that are able to provide physiological health benefits to the consumers or therapeutic actions related to probiotics by producing neurochemical factors like GABA, Norépinephrine, Serotonin, Dopamine or Acetylcholin[87]. They can be naturally found in several fermented foods or be extracted in situ from producer strains belonging to bacterial and fungal species, mainly strains of the

Lactobacillus genus found dominantly in the reviewed fermented milks, as well as *Streptococcus*, and *Saccharomyces* [87].

Conclusions

Many traditional dairy products in the Eastern Mediterranean countries, and particularly fermented milks, are produced by the action of lactic acid bacteria and fungi using unique expertise passed on from previous generations. Some of them are common to several countries where they are prepared and consumed, whereas others are specific to only one. These artisanal foods are popular and well appreciated within their production regions. They are a heritage that should be preserved and protected. Very little scientific information is available on these traditional fermented milks in the literature. Studies and research should be encouraged by governments, public institutions, and local authorities, to increase knowledge concerning the microbial populations, as well as concerning their roles in fermentation, flavor development and contribution to the sanitary qualities of these products. If adequate policies are applied and knowledge concerning these products, now mainly confined to their producing regions, is increased, they have the potential to benefit from huge media exposure and publicity, therefore introducing them to other countries and creating new opportunities for international markets and trades, noting that many rural populations are deeply dependent on farming activities and such local productions.

Funding details

This work was partially funded by a grant from the Lebanese University.

Disclosures statements

The authors report there are no competing interests to declare.

References

[1] Codex Alimentarius. Standard for Fermented Milks, CXS 243-2003, 2018.

[2] Robinson, R.; Tamime, A. Y. Types of Fermented Milks. In *Fermented Milks*; 2007; pp 1–10. DOI: 10.1002/9780470995501.ch1.

[3] Mayo, B.; Ammor, M.; Delgado, S.; Alegría, Á. Fermented Milk Products. In *Fermented Foods and Beverages of the World*; Tamang, J., Kailasapathy, K., Eds.;

CRC Press, 2010; pp 263–288. DOI: 10.1201/EBK1420094954-c9.

[4] Alichanidis, E.; Polychroniadou, A. Characteristics of Major Traditional Regional Cheese Varieties of East-Mediterranean Countries: A Review. *Dairy Sci. Technol.*, **2008**, *88* (4–5), 495–510. DOI: 10.1051/dst:2008023.

[5] Aurier, P.; Fort, F.; Sirieix, L. Exploring Terroir Product Meanings for the Consumer. *Anthropol. Food*, **2005**, No. 4. DOI: 10.4000/aof.187.

[6] Lenglet, F. Influence of Terroir Products Meaning on Consumer's Expectations and Likings. *Food Qual. Prefer.*, **2014**, *32*, 264–270. DOI: 10.1016/j.foodqual.2013.09.003.

[7] Montel, M.-C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D. A.; Desmasures, 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.

[8] Katsanevakis, S.; Tsiamis, K.; Ioannou, G.; Michailidis, N.; Zenetos, A. Inventory of Alien Marine Species of Cyprus (2009). *Mediterr. Mar. Sci.*, **2009**, *10*, 109–133. DOI: 10.12681/mms.113.

[9] Ibrahim, O.; Mohamed, B.; Nagy, H. Spatial Variability and Trends of Marine Heat Waves in the Eastern Mediterranean Sea over 39 Years. *J. Mar. Sci. Eng.*, **2021**, *9* (6), 643. DOI: 10.3390/jmse9060643.

[10] Sundseth, K.; Wegefelt, S. *Natura 2000 in the Mediterranean Region*; Office for Official Publ. of the Europ. Communities: Luxembourg, 2009. DOI: 10.2779/77695.

[11] Al-Kandari, D.; Jukes, D. J. A Situation Analysis of the Food Control Systems in Arab Gulf Cooperation Council (GCC) Countries. *Food Control*, **2009**, *20* (12), 1112–1118. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.02.012.

[12] Guerrero, L.; Guàrdia, M. D.; Xicola, J.; Verbeke, W.; Vanhonacker, F.; Zakowska-Biemans, S.; Sajdakowska, M.; Sulmont-Rossé, C.; Issanchou, S.; Contel, M.; et al. Consumer-Driven Definition of Traditional Food Products and Innovation in Traditional Foods. A Qualitative Cross-Cultural Study. *Appetite*, **2009**, *52* (2), 345–354. DOI: 10.1016/j.appet.2008.11.008.

[13] United Nations Department of Economic and Social Affairs. *World Social Report 2021 Reconsidering Rural Development*; **2021**; p 174.

[14] Alqaisi, O.; Ndambi, O. A.; Uddin, M. M.; Hemme, T. Current Situation and the Development of the Dairy Industry in Jordan, Saudi Arabia, and Syria. *Trop. Anim. Health Prod.*, **2010**, *42* (6), 1063–1071. DOI: 10.1007/s11250-010-9553-y.

[15] Tamang, J. P.; Cotter, P. D.; Endo, A.; Han, N. S.; Kort, R.; Liu, S. Q.; Mayo, B.; Westerik, N.; Hutkins, R. Fermented Foods in a Global Age: East Meets West. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2020**, *19* (1), 184–217. DOI: 10.1111/1541-4337.12520.

[16] Kim, D.-H.; Jeong, D.; Song, K.-Y.; Seo, K.-H. Comparison of Traditional and Backslopping Methods for Kefir Fermentation Based on Physicochemical and

Microbiological Characteristics. *LWT*, **2018**, *97*, 503–507. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.07.023.

[17] Titapiccolo, G. I.; Corredig, M.; Alexander, M. Acid Coagulation Behavior of Homogenized Milk: Effect of Interacting and Non-Interacting Droplets Observed by Rheology and Diffusing Wave Spectroscopy. *Dairy Sci. Technol.*, **2011**, *91* (2), 185–201. DOI: 10.1007/s13594-011-0010-0.

[18] Lucey, J. Acid Coagulation of Milk; 2016; pp 309–328. DOI: 10.1007/978-1-4939-2800-2_12.

[19] Østerlie, M.; Wicklund, T. Chapter 2 - Food, Nutrition, and Health in Norway (Including Svalbard). In *Nutritional and Health Aspects of Food in Nordic Countries*; Andersen, V., Bar, E., Wirtanen, G., Eds.; Nutritional&Health Aspect-Traditional&Ethnic Food; Academic Press, **2018**; pp 33–71. DOI: 10.1016/B978-0-12-809416-7.00002-0.

[20] El-Gendy, S. M. Fermented Foods of Egypt and the Middle East. *J. Food Prot.*, **1983**, *46* (4), 358–367. DOI: 10.4315/0362-028X-46.4.358.

[21] Henney, J. E.; Taylor, C. L.; Boon, C. S. *Preservation and Physical Property Roles of Sodium in Foods*; National Academies Press (US), 2010.

[22] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Gateway to dairy production and products https://www.fao.org/dairy-production-products/products/milk-composition/en/ (accessed Sep 9, 2022).

[23] Nsabimana, C.; Jiang, B.; Kossah, R. Manufacturing, Properties and Shelf Life of Labneh: A Review. *Int. J. Dairy Technol.*, **2005**, *58* (3), 129–137. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2005.00205.x.

[24] Baruzzi, F.; Quintieri, L.; Caputo, L.; Cocconcelli, P.; Borcakli, M.; Owczarek, L.; Jasińska, U. T.; Skąpska, S.; Morea, M. Improvement of Ayran Quality by the Selection of Autochthonous Microbial Cultures. *Food Microbiol.*, **2016**, *60*, 92–103. DOI: 10.1016/j.fm.2016.07.001.

[25] 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.

[26] Yeluri Jonnala, Bhagya. R.; McSweeney, P. L. H.; Sheehan, J. J.; Cotter, P. D. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Front. Microbiol.*, **2018**, *9*.

[27] Zago, M.; Bardelli, T.; Rossetti, L.; Nazzicari, N.; Carminati, D.; Galli, A.; Giraffa, G. Evaluation of Bacterial Communities of Grana Padano Cheese by DNA Metabarcoding and DNA Fingerprinting Analysis. *Food Microbiol.*, **2021**, *93*, 103613. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103613.

[28] de Almeida Brasiel, P. G.; Dutra Medeiros, J.; Barbosa Ferreira Machado, A.; Schuchter Ferreira, M.; Gouveia Peluzio, M. do C.; Potente Dutra Luquetti, S. C.

Microbial Community Dynamics of Fermented Kefir Beverages Changes over Time. *Int. J. Dairy Technol.*, **2021**, *74* (2), 324–331. DOI: 10.1111/1471-0307.12759.

[29] Kazou, M.; Grafakou, A.; Tsakalidou, E.; Georgalaki, M. Zooming Into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses. *Front. Microbiol.*, **2021**, *12*.

[30] Korsak, N.; Taminiau, B.; Leclercq, M.; Nezer, C.; Crevecoeur, S.; Ferauche, C.; Detry, E.; Delcenserie, V.; Daube, G. Short Communication: Evaluation of the Microbiota of Kefir Samples Using Metagenetic Analysis Targeting the 16S and 26S Ribosomal DNA Fragments. *J. Dairy Sci.*, **2015**, *98* (6), 3684–3689. DOI: 10.3168/jds.2014-9065.

[31] Groenenboom, A. E.; Shindano, J.; Cheepa, N.; Smid, E. J.; Schoustra, S. E. Microbial Population Dynamics during Traditional Production of Mabisi, a Spontaneous Fermented Milk Product from Zambia: A Field Trial. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2020**, *36* (12), 184. DOI: 10.1007/s11274-020-02957-5.

[32] de Melo Pereira, G. V.; de Carvalho Neto, D. P.; Maske, B. L.; De Dea Lindner, J.; Vale, A. S.; Favero, G. R.; Viesser, J.; de Carvalho, J. C.; Góes-Neto, A.; Soccol, C. R. An Updated Review on Bacterial Community Composition of Traditional Fermented Milk Products: What next-Generation Sequencing Has Revealed so Far? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2022**, *62* (7), 1870–1889. DOI: 10.1080/10408398.2020.1848787.

[33] Abi Khalil, R.; Couderc, C.; Yvon, S.; Jard, G.; Sicard, D.; Bigey, F.; El Rammouz, R.; Abi Nakhoul, P.; Eutamène, H.; Tormo, H.; et al. Artisanal Household Milk Pasteurization Is Not a Determining Factor in Structuring the Microbial Communities of Labneh Ambaris: A Pilot Study. *Foods*, **2022**, *11* (23), 3874. DOI: 10.3390/foods11233874.

[34] Abi Khalil, R.; Yvon, S.; Couderc, C.; Belahcen, L.; Jard, G.; Sicard, D.; Bigey, F.; Rammouz, R. E.; Nakhoul, P. A.; Eutamène, H.; et al. Microbial Communities and Main Features of Labneh Ambaris, a Traditional Lebanese Fermented Goat Milk Product. *J. Dairy Sci.*, **2022**, *106* (2). DOI: 10.3168/jds.2022-22275.

[35] Bechara, P.; Kothe, Cl.; Renault, P.; Ayoub, MJ.; Abi Nakhoul, P. Fungal Diversity of Fermented Darf Products from Lebanon by Cultural and Metagenetic Approaches. **Unpublished data**.

[36] Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C. M. A. P.; Harris, H. M. B.; Mattarelli, P.; O'Toole, P. W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; et al. A Taxonomic Note on the Genus *Lactobacillus*: Description of 23 Novel Genera, Emended Description of the Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and Union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2020**, *70* (4), 2782–2858. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.

[37] ElAttar, A.; Shehata, E.; Awad, S.; Nawar, M. *Physico-Chemical Properties of Homemade and Market Egyptian Laban Zeer and Kishk Samples*; 2015.

[38] Esen, Y.; Çetin, B. Bacterial and Yeast Microbial Diversity of the Ripened Traditional Middle East Surk Cheese. *Int. Dairy J.*, **2021**, *117*, 105004. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105004.

[39] 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* (5), 664–698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.

[40] Fröhlich-Wyder, M.-T.; Arias-Roth, E.; Jakob, E. Cheese Yeasts. *Yeast*, **2019**, *36* (3), 129–141. DOI: 10.1002/yea.3368.

[41] Fleet, G. H. Yeasts in Dairy Products. *J. Appl. Bacteriol.*, **1990**, *68* (3), 199–211. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x.

[42] Abou-Zeid, N. A. Review of Egyptian Cereal-Based Fermented Product (Kishk). **2016**, *4* (4), 10.

[43] Verraes, C.; Vlaemynck, G.; Van Weyenberg, S.; De Zutter, L.; Daube, G.; Sindic, M.; Uyttendaele, M.; Herman, L. A Review of the Microbiological Hazards of Dairy Products Made from Raw Milk. *Int. Dairy J.*, **2015**, *50*, 32–44. DOI: 10.1016/j.idairyj.2015.05.011.

[44] Paramithiotis, S.; Drosinos, E. H.; Skandamis, P. N. Food Recalls and Warnings Due to the Presence of Foodborne Pathogens—a Focus on Fresh Fruits, Vegetables, Dairy and Eggs. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2017**, *18*, 71–75. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.11.007.

[45] Fox, E. M.; Jiang, Y.; Gobius, K. S. Key Pathogenic Bacteria Associated with Dairy Foods: On-Farm Ecology and Products Associated with Foodborne Pathogen Transmission. *Int. Dairy J.*, **2018**, *84*, 28–35. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.03.013.

[46] Gonzales-Barron, U.; Gonçalves-Tenório, A.; Rodrigues, V.; Cadavez, V. Foodborne Pathogens in Raw Milk and Cheese of Sheep and Goat Origin: A Meta-Analysis Approach. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2017**, *18*, 7–13. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.10.002.

[47] Musallam, I. I.; Abo-Shehada, M. N.; Hegazy, Y. M.; Holt, H. R.; Guitian, F. J. Systematic Review of Brucellosis in the Middle East: Disease Frequency in Ruminants and Humans and Risk Factors for Human Infection. *Epidemiol. Infect.*, **2016**, *144* (4), 671–685. DOI: 10.1017/S0950268815002575.

[48] Mashak, Z. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Isolated From Kashk-e Zard and Tarkhineh, Two Iranian Traditional Fermented Foods. *Int. J. Enteric Pathog.*, **2016**, *In Press* (In Press). DOI: 10.17795/ijep34692.

[49] Xing, Z.; Geng, W.; Li, C.; Sun, Y.; Wang, Y. Comparative Genomics of *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 and Related Members of *Lactobacillus spp.* Reveal Adaptations to Dairy and Gut Environments. *Sci. Rep.*, **2017**, *7* (1), 12827. DOI: 10.1038/s41598-017-12916-0.

[50] Ezzatpanah, H. Chapter 2 - Traditional Food and Practices for Health: Iranian Dairy Foods. In *Nutritional and Health Aspects of Food in South Asian Countries*; Prakash, J., Waisundara, V., Prakash, V., Eds.; Nutritional & Health Aspect-

Traditional & Ethnic Food; Academic Press, 2020; pp 275–287. DOI: 10.1016/B978-0-12-820011-7.00030-7.

[51] All, A.; Dardir, H. Hygienic Quality of Local Traditional Fermented Skimmed Milk (Laban Rayb) Sold in Egypt. *World J. Dairy Food Sci.*, **2009**, *4*.

[52] Tabet, E.; Salameh, C.; Nehme, M.; Daher, J.; Hosri, C. *Innovation Aspects of Serdaleh, a Traditional Lebanese Cheese Produced from Raw Extensive Goat's Milk*; 2019.

[53] Serhan, M.; Mattar, J. Characterization of Four Lebanese Artisanal Goat Milk Cheeses: Shankleesh, Darfiyeh, Aricheh and Serdale by Physico-Chemical Microbiological and Sensory Analyses. *J. Food Agric. Environ.*, **2013**, *11*, 97–101.

[54] Dimassi, O.; Iskandarani, Y.; Afram, M.; Akiki, R.; Rached, M. Production and Physicochemical Properties of Labneh Anbaris, a Traditional Fermented Cheese like Product, in Lebanon. *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.*, **2020**, *5*, 509–516. DOI: 10.22161/ijeab.53.3.

[55] Ayoub, M.-J.; Bechara, P.; Habchi, M.; Hosry, R.; Akl, M.; Haj Hassan, S.; Abi Nakhoul, P. Raw Goat's Milk Fermented Anbaris from Lebanon: Insights into the Microbial Dynamics and Chemical Changes Occurring during Artisanal Production, with a Focus on Yeasts. *J. Dairy Res.*, **2022**, 1–9. DOI: 10.1017/S002202992200067X.

[56] Saleh, F. A. Isolation and Identification of Microorganisms and Antibacterial Activity of Laban Zeer, an Egyptian Traditional Fermented Milk Product. *Sci. J. Microbiol.*, **2013**, *2* (2), 31–42.

[57] Kırdar, S. S. A Survey on Microbiological and Biochemical Characteristics of A Traditional Dairy Product Keş in Mediterrean Region. *J. Anim. Vet. Adv. Vol 113330-334*, **2011**, *11*, 330–334. DOI: 10.3923/javaa.2012.330.334.

[58] Atasever, M. A.; Atasever, M. Some quality properties of Kurut, a traditional dairy product in Turkey. *Manas J. Agric. Vet. Life Sci.*, **2018**, *8* (1).

[59] Franz, C. M.; Holzapfel, W. H.; Stiles, M. E. *Enterococci* at the Crossroads of Food Safety? *Int. J. Food Microbiol.*, **1999**, *47* (1–2), 1–24. DOI: 10.1016/s0168-1605(99)00007-0.

[60] Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B. *Lactobacillales* Ord. Nov. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd, 2015; pp 1–1. DOI: 10.1002/9781118960608.obm00058.

[61] Akpinar, A.; Saygili, D.; Yerlikaya, O. Production of Set-Type Yoghurt Using *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* Strains with Probiotic Potential as Starter Adjuncts. *Int. J. Dairy Technol.*, **2020**, *73* (4), 726–736. DOI: 10.1111/1471-0307.12714.

[62] Franz, C. M. A. P.; Huch, M.; Abriouel, H.; Holzapfel, W.; Gálvez, A. *Enterococci* as Probiotics and Their Implications in Food Safety. *Int. J. Food Microbiol.*, **2011**, *151* (2), 125–140. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014.

[63] Nejad, R. B.; Krecek, R. C.; Khalaf, O. H.; Hailat, N.; Arenas-Gamboa, A. M. Brucellosis in the Middle East: Current Situation and a Pathway Forward. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2020**, *14* (5), e0008071. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008071.

[64] Godfroid, J. Brucellosis in Livestock and Wildlife: Zoonotic Diseases without Pandemic Potential in Need of Innovative One Health Approaches. *Arch. Public Health*, **2017**, *75* (1), 34. DOI: 10.1186/s13690-017-0207-7.

[65] O'Sullivan, O.; Cotter, P. D. Chapter 12 - Microbiota of Raw Milk and Raw Milk 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 301–316. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00012-0.

[66] *Milk and Dairy Products in Human Nutrition*; Muehlhoff, E., Bennett, A., MacMahon, D., Food and Agriculture Organization of the United Nations, Eds.; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, 2013.

[67] Teneva-Angelova, T.; Balabanova, T.; Boyanova, P.; Beshkova, D. Traditional Balkan Fermented Milk Products. *Eng. Life Sci.*, **2018**, *18* (11), 807–819. DOI: 10.1002/elsc.201800050.

[68] Rizzoli, R. Dairy Products, Yogurts, and Bone Health. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2014**, *99* (5 Suppl), 1256S-62S. DOI: 10.3945/ajcn.113.073056.

[69] WHO. Vitamin and mineral requirements in human nutrition, 2nd edition https://www.who.int/publications-detail-redirect/9241546123 (accessed Sep 27, 2022).

[70] Pessione, E.; Cirrincione, S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*.

[71] Gille, D.; Schmid, A.; Walther, B.; Vergères, G. Fermented Food and Non-Communicable Chronic Diseases: A Review. *Nutrients*, **2018**, *10* (4), E448. DOI: 10.3390/nu10040448.

[72] Abd El-Salam, M. H. Fermented Milks | Middle Eastern Fermented Milks. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Elsevier, 2011; pp 503–506. DOI: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00185-0.

[73] Seyed Mohammad Bagher. Probiotic *Lactobacillus* Strains from Traditional Iranian Cheeses. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*; Elsevier, 2016; pp 215–225. DOI: 10.1016/B978-0-12-802189-7.00014-9.

[74] Rossi, M.; Amaretti, A.; Raimondi, S. Folate Production by Probiotic Bacteria. *Nutrients*, **2011**, *3* (1), 118–134. DOI: 10.3390/nu3010118.

[75] Tamang, J. P.; Shin, D.-H.; Jung, S.-J.; Chae, S.-W. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00578.

[76] Hasan, N.; Yang, H. Factors Affecting the Composition of the Gut Microbiota, and Its Modulation. *PeerJ*, **2019**, *7*, e7502. DOI: 10.7717/peerj.7502.

[77] Rahbar Saadat, Y.; Yari Khosroushahi, A.; Movassaghpour, A. A.; Talebi, M.; Pourghassem Gargari, B. Modulatory Role of Exopolysaccharides of

Kluyveromyces marxianus and *Pichia kudriavzevii* as Probiotic Yeasts from Dairy Products in Human Colon Cancer Cells. *J. Funct. Foods*, **2020**, *64*, 103675. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103675.

[78] Garcia-Gonzalez, N.; Battista, N.; Prete, R.; Corsetti, A. Health-Promoting Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated from Fermented Foods. *Microorganisms*, **2021**, *9* (2), 349. DOI: 10.3390/microorganisms9020349.

[79] Vélez, M. P.; De Keersmaecker, S. C. J.; Vanderleyden, J. Adherence Factors of *Lactobacillus* in the Human Gastrointestinal Tract. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2007**, *276* (2), 140–148. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x.

[80] Marianelli, C.; Cifani, N.; Pasquali, P. Evaluation of Antimicrobial Activity of Probiotic Bacteria against *Salmonella enterica* subsp. e*nterica* Serovar Typhimurium 1344 in a Common Medium under Different Environmental Conditions. *Res. Microbiol.*, **2010**, *161* (8), 673–680. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.06.007.

[81] Horvath, A.; Dziechciarz, P.; Szajewska, H. Meta-Analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for Abdominal Pain-Related Functional Gastrointestinal Disorders in Childhood. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **2011**, *33* (12), 1302–1310. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2011.04665.x.

[82] Mathipa-Mdakane, M. G.; Thantsha, M. S. *Lacticaseibacillus rhamnosus*: A Suitable Candidate for the Construction of Novel Bioengineered Probiotic Strains for Targeted Pathogen Control. *Foods*, **2022**, *11* (6), 785. DOI: 10.3390/foods11060785.

[83] Hojsak, I.; Abdović, S.; Szajewska, H.; Milošević, M.; Krznarić, Ž.; Kolaček, S. *Lactobacillus* GG in the Prevention of Nosocomial Gastrointestinal and Respiratory Tract Infections. *Pediatrics*, **2010**, *125* (5), e1171–e1177. DOI: 10.1542/peds.2009-2568.

[84] Homayouni-Rad, A.; Azizi, A.; Oroojzadeh, P.; Pourjafar, H. *Kluyveromyces marxianus* as a Probiotic Yeast: A Mini-Review. *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2020**, *16* (8), 1163–1169. DOI: 10.2174/1573401316666200217113230.

[85] Abiad, M. G.; Ajjour, C.; Kassaify, Z.; Iskandar, C. F.; Hamzeh, R.; Hassan, H. F. Preliminary Physiological, Phenotypic, and Probiotic Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Anbaris-Traditional Lebanese Fermented Dairy Product. *Int. J. Food Prop.*, **2022**, *25* (1), 1266–1278. DOI: 10.1080/10942912.2022.2077363.

[86] Torres, D. P. M.; Gonçalves, M. do P. F.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, L. R. Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2010**, *9* (5), 438–454. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00119.x.

[87] Barros, C. P.; Guimarães, J. T.; Esmerino, E. A.; Duarte, M. C. K.; Silva, M. C.; Silva, R.; Ferreira, B. M.; Sant'Ana, A. S.; Freitas, M. Q.; Cruz, A. G.

Paraprobiotics and Postbiotics: Concepts and Potential Applications in Dairy Products. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2020**, *32*, 1–8. DOI: 10.1016/j.cofs.2019.12.003.

[88] Khalafalla, S. M.; Fayed, E. O.; Aly, A. A.; El-Samragy, Y. A. Composition and Microbiological Properties of Laban Rayeb Produced in Lower Egypt. *Ecol. Food Nutr.*, **1988**, *21* (4), 297–302. DOI: 10.1080/03670244.1988.9991043.

[89] Ahmed, H.; Shahein, Y.; Mohran, M.; Tammam, A. Chemical Composition and Microbiological Quality of Laban Rayeb in Assuit City.; 2017. DOI: 10.21608/jfds.2017.38950.

[90] Amer, A.; Sakr, M. Physical, Chemical and Microbiological Properties of Laban Rayeb. *Alex. J. Vet. Sci.*, **2016**, *51*, 269. DOI: 10.5455/ajvs.230003.

[91] Nassib, T. A.; El-Hefnawy, S. A.; Ashmawy, T. a. M.; Al-Rahmany, A. S. Making Zabadi from Cow's Milk by Adding Different Concentrations of Goat's Protein. *J. Food Dairy Sci.*, **2018**, *9* (11), 365–369. DOI: 10.21608/jfds.2018.36029.

[92] Baroudi, A. A. G.; Collins, E. B. Microorganisms and Characteristics of Laban. *J. Dairy Sci.*, **1976**, *59* (2), 200–202. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(76)84184-7.

[93] Abou Jaoude, D.; Olabi, A.; Najm, N. E. O.; Malek, A.; Saadeh, C.; Baydoun, E.; Toufeili, I. Chemical Composition, Mineral Content and Cholesterol Levels of Some Regular and Reduced-Fat White Brined Cheeses and Strained Yogurt (Labneh). *Dairy Sci. Technol.*, **2010**, *90* (6), 699–706. DOI: 10.1051/dst/2010026.

[94] Serhan, M.; Mattar, J.; Debs, L. Concentrated Yogurt (Labneh) Made of a Mixture of Goats' and Cows' Milk: Physicochemical, Microbiological and Sensory Analysis. *Small Rumin. Res.*, **2016**, *138*, 46–52. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.04.003.

[95] Ibrahim, F. S.; Ateteallah, A. H.; Khalil, O. S. F. Assessment of Chemical Composition, Minerals and Amino Acid Content of Farmhouse Concentrate Fermented Milk (Laban Zeer) Manufactured in Minia Province. *J. Agric. Sci.*, **2016**.

[96] Tamime, A. Y.; Wszolek, M.; Božanić, R.; Özer, B. Popular Ovine and Caprine Fermented Milks. *Small Rumin. Res.*, **2011**, *101* (1–3), 2–16. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2011.09.021.

[97] Dimassi, O.; Iskandarani, Y.; Akiki, R. Effect of Followed Production Procedures on the Physicochemical Properties of Labneh Anbaris. *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.*, **2020**, *5* (6).

[98] Toufeili, I.; Shadarevian, S.; Artinian, T.; Tannous, R. Ripening Changes and Sensory Properties of Bovine, Caprine and Ovine Shankleesh. *Int. Dairy J.*, **1995**, *5* (2), 179–189. DOI: 10.1016/0958-6946(95)92209-M.

[99] Addas, M.; Hilali, M. E.-D.; Rischkowsky, B.; Kefalas, P. The Quality of Syrian Shanklish a Traditional Dairy Product. **2012**, 1.

[100] Nehme, L.; Salameh, C.; Tabet, E.; Nehme, M.; Hosri, C. Innovative Improvement of Shanklish Cheese Production in Lebanon. *Int. Dairy J.*, **2019**, *90*, 23–27. DOI: 10.1016/j.idairyj.2018.10.005.

[101] Kamber, U. The Manufacture and Some Quality Characteristics of Kurut, a Dried Dairy Product. *Int. J. Dairy Technol.*, **2008**, *61* (2), 146–150. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2008.00362.x.

[102] Altay, F.; Karbancıoglu-Güler, F.; Daskaya-Dikmen, C.; Heperkan, D. A Review on Traditional Turkish Fermented Non-Alcoholic Beverages: Microbiota, Fermentation Process and Quality Characteristics. *Int. J. Food Microbiol.*, **2013**, *167* (1), 44–56. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.06.016.

[103] Ozdemir, S.; Gocmen, D.; Yildirim Kumral, A. A Traditional Turkish Fermented Cereal Food: Tarhana. *Food Rev. Int.*, **2007**, *23* (2), 107–121. DOI: 10.1080/87559120701224923.

[104] Tamime, A. Y.; O'Connor, T. P. Kishk—A Dried Fermented Milk/Cereal Mixture. *Int. Dairy J.*, **1995**, *5* (2), 109–128. DOI: 10.1016/0958-6946(95)92205-I.

[105] Abd-Elhamid, A. M.; Khattab, A. A.; El-Ghannam, M. S.; Ziena, H. M. Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Egyptian Laban Rayeb and the Use of Some Isolated Cultures in the Preparation of Laban Rayeb. *Egypt. J. Dairy Sci.*, **2009**, *37* (2), 227–236.

[106] Mabrouk, A. Molecular identification of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy product. *Int. J. Biol. Pharm. Allied Sci.*, **2016**, *5*, 3221–3230.

[107] Roushdy, I. M. Ydrolytic Enzyme Profiles of *Lactococcus lactis ssp: lactis* Isolated from Laban Rayeb. *Arab Univ. J. Agric. Sci. Egypt*, **2000**.

[108] Benkerroum, N. Traditional Fermented Foods of North African Countries: Technology and Food Safety Challenges With Regard to Microbiological Risks. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2013**, *12* (1), 54–89. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2012.00215.x.

[109] Abd El Gawad, I. Identification and Characterization of Dominant Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Rayeb Milk in Egypt. *J. Am. Sci.*, **2010**.

[110] Chammas, I.; Saliba, R.; Béal, C. Characterization of the Fermented Milk "Laban" with Sensory Analysis and Instrumental Measurements. *J. Food Sci.*, **2006**, *71*, S156–S162. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb08919.x.

[111] Daglioğlu, O. Tarhana as a Traditional Turkish Fermented Cereal Food. Its Recipe, Production and Composition. *Food Nahr.*, **2000**, *44* (2), 85–88. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3803(20000301)44:2<85::AID-FOOD85>3.0.CO;2-H.

[112] Settanni, L.; Di Grigoli, A.; Tornambé, G.; Bellina, V.; Francesca, N.; Moschetti, G.; Bonanno, A. Persistence of Wild *Streptococcus thermophilus* Strains on Wooden Vat and during the Manufacture of a Traditional Caciocavallo Type Cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, **2012**, *155* (1–2), 73–81. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.022.

[113] amCharts https://www.amcharts.com/ (accessed Sep 28, 2022).

[114] Barakat, D. E. The Effect of Heat Treatment and Storage Temperature on the Microbiological and Chemical Qualities of Traditional Labneh Anbris - by Darine

Emile Barakat. Thesis, 2009.

[115] Zam, W.; Belal, L. *Ex Vivo* Study of Laban's Role in Decreasing Hemolysis Crisis in G6PD-Deficient Patients. *J. Nutr. Metab.*, **2020**, *2020*, 1–5. DOI: 10.1155/2020/8034672.

[116] Kabak, B.; Dobson, A. D. W. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2011**, *51* (3), 248–260. DOI: 10.1080/10408390903569640.

[117] Guler, Z.; Park, Y. Evaluation of Chemical and Color Index Characteristics of Goat Milk, Its Yoghurt and Salted Yoghurt; **2008**; Vol. 11.

[118] Kesenkaş, H.; Karagözlü, C.; Yerlikaya, O.; Özer, E.; Akpınar, A.; Akbulut, N. Physicochemical and Sensory Characteristics of Winter Yoghurt Produced from Mixtures of Cow's and Goat's Milk. *J. Agr. Sci.-Sri Lanka*. **2017**. DOI: 10.15832/tbd.90735.

Tables with captions.

Table 1. Physicochemical characteristics of the traditional fermented milks reviewed. The symbol '---'means absence of the characteristic and NS means that the information was not found in literature.

Product name	Group	pH	Dry matter (%)	Protein content (%)	Fat content (%)	Salt content (%)	References
Laban Rayeb	Fermented milk	4.10 4.80	8.86 – 11.74	2.00 – 7.84	0.20 – 3.00	---	[88–90]
Laban (also called Zabady)	Fermented milk	3.98 – 4.25	6.29 – 18.00	2.11 – 3.88	1.12 – 3.31	---	[72, 91, 92]
Laban Khad	Fermented milk	NS	NS	NS	NS	---	---
Labneh (commercial)	Concentrated fermented milk	3.66 – 4.20	25.30 – 25.80	8.20 – 10.90	7.10 – 10.90	0.75 – 2.00	[23, 93, 94]
Laban Zeer	Concentrated fermented milk	2.85 – 3.94	19.74 – 30.50	5.68 – 19.08	0.20 – 6.50	0.59 – 5.80	[37, 95]
Tuzlu yogurt (also called salted yoghurt or winter yoghurt)	Concentrated fermented milk	3.77 – 3.95	22.52 – 32.18	7.09 – 11.56	6.60 – 10.45	2.02 – 4.70	[96]
Labneh Ambaris (also called Serdeleh)	Concentrated fermented milk	2.90 – 3.89	25.41 – 47.17	7.02 – 19.01	3.90 – 30.50	0.50 – 11.00	[34, 52–55, 97]
Labneh Darf	Concentrated fermented milk	3.37 – 5.81	38.76 – 66.64	NS	NS	NS	[35]
Shanklish (also called surk, shinklish, shankleesh, sorke, or sürke)	Concentrated fermented milk	3.60 – 4.09	40.25 – 57.30	30.7 – 32.99	2.00 – 12.70	1.00 – 1.25	[53, 98–100]
Kurut	Concentrated fermented milk	4.01 – 4.29	86.24 – 89.56	23.33 – 56.01	16.69 – 49.16	5.30 – 8.00	[58, 101]

Ayran	Drink based on fermented milk	4.21 – 4.35	8.50 – 10.10	2.60 – 3.00	2.10 – 2.30	0.50 – 1.00	[24, 102]
Kishk (also called Tarhana)	Flavored fermented milk	3.50 – 5.00	87.00 – 94.00	8.90 – 23.50	1.00 – 11.90	6	[96, 103, 104]

Table 2. Identified microorganisms in some traditional fermented milks from Eastern Mediterranean countries. NS means that the information was not found in literature.

Product name	Detected lactic acid bacteria species	Detected yeast species	References
Laban Rayeb	*Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans, Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus helveticus, Lacticaseibacillus casei, Lactiplantibacillus plantarum, Levilactobacillus brevis, Pediococcus pentosaceus, Lacticaseibacillus rhamnosus, Limosilactobacillus fermentum, Ligilactobacillus salivarius, Pediococcus acidilactici, Leuconostoc mesenteroides,* and *Streptococcus thermophilus*	NS	[51, 88, 105–109]
Laban (also called Zabady)	*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii, Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus acidophilus*	*Kluveromyces fragilis* and *Saccharomyces cerevisiae*	[72, 92, 108, 110]
Laban Khad	*Lactococcus lactis, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii*, and *Lactiplantibacillus plantarum*	*Saccharomyces cerevisiae*, and *Kluyveromyces marxianus*	[108]
Labneh	*Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus thermophilus*	*Saccharomyces cerevisiae*	[23]
Laban Zeer	*Lacticaseibacillus casei*, *Levilactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Latilactobacillus curvatus*, and *Lactobacillus acidophilus*	*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida kefyr*, *Candida utilis*, and *Rhodotorula mucilaginosa*	[56, 108]
Tuzlu yogurt (also called salted yoghurt or winter yoghurt)	NS	NS	NS
Labneh Ambaris (also called Serdeleh)	*Streptococcus parasuis, Pediococcus parvulus, Lentilactobacillus sp., Lentilactobacillus buchneri, Lactococcus lactis, Lactobacillus sp., Lactobacillus kefiranofaciens,*	*Yarrowia lipolytica, Yarrowia galli, Yamadazyma triangularis, Torulaspora delbrueckii, Starmerella sp., Saccharomyces cerevisiae, Pichia sp., Pichia kudriavzevii, Moniliella sp., Kluyveromyces marxianus,*	[33, 34, 55]

	Lactobacillus helveticus, Lactiplantibacillus sp., Lactobacillus delbrueckii, Lacticaseibacillus rhamnosus, Klebsiella sp., Enterococcus sp., and *Aeromonas sp.*	*Kazachstania unispora, Kazachstania sp., Kazachstania exigua, Geotrichum candidum, Debaromyces hansenii, Candida sp., Rhodotorula sp.,* and *Aspergillus sp.*	
Labneh Darf	NS	*Torulaspora delbrueckii, Pichia kudriavzevii, Kazachstania unispora, Kluyveromyces marxianus, Kluyveromyces lactis, Saccharomyces cerevisiae, Geotrichum candidum, Debaryomyces hansenii, Yarrowia lipolytica, Pichia sp., Starmerella sp. Mucor sp.* and *Moniliella sp*	[35]
Shanklish (also called surk, shinklish, shankleesh, sorke, or sürke)	*Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus alimentarius*, and *Ligilactobacillus acidipiscis*	*Debaryomyces hansenii*, *Candida zeylanoides*, *Yarrowia lipolytica*, and *Kluyveromyces lactis*	[38]
Kurut	*Lactobacillus spp.,* and *Lactococcus spp.*	NS	[58]
Ayran	*Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus helveticus, Lacticaseibacillus paracasei, Enterecoccus faecium,* and *Enterecoccus durans*	*Kluveromyces spp.*, *Saccharomyces spp.* and *Geotrichum spp.*	[24, 102]
Kishk (also called Tarhana)	*Lactiplantibacillus plantarum, Levilactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis, Leuconostoc cremoris, Pediococcus acidilactici,* and *Streptococcus thermophilus*	*Saccharomyces cerevisiae,* and *Rhodotorula glutinis*	[20, 42, 108, 111, 112]

Figures



Figure 1. Map of the chosen countries that border the Eastern Mediterranean Sea. Created using "amCharts"[113].

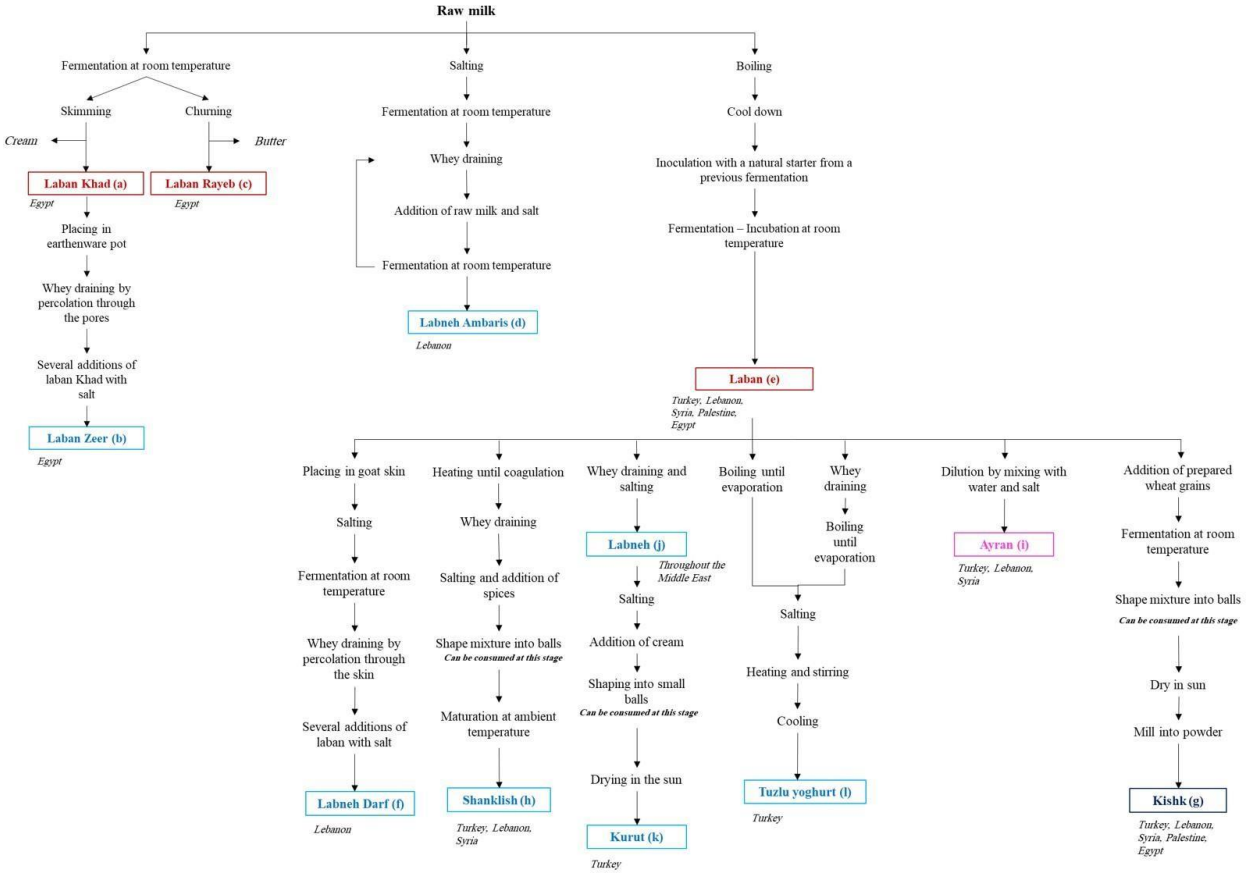


Figure 2. Generalized production flowcharts of some traditional fermented milks from Eastern Mediterranean countries. Fermented milks are color-coded according to the group they belong to: red for group A, blue for group B, pink for group C and dark blue for group D.

(a) [20], (b) [20], (c) [88],(d)[33, 34, 52, 54, 114], (e),[92, 115]. (f) [35], (g) [20, 103],(h) [96, 98, 100](i) [24, 102], (j) [23, 93, 94],(k) [96, 116] and (l) [96, 117, 118].

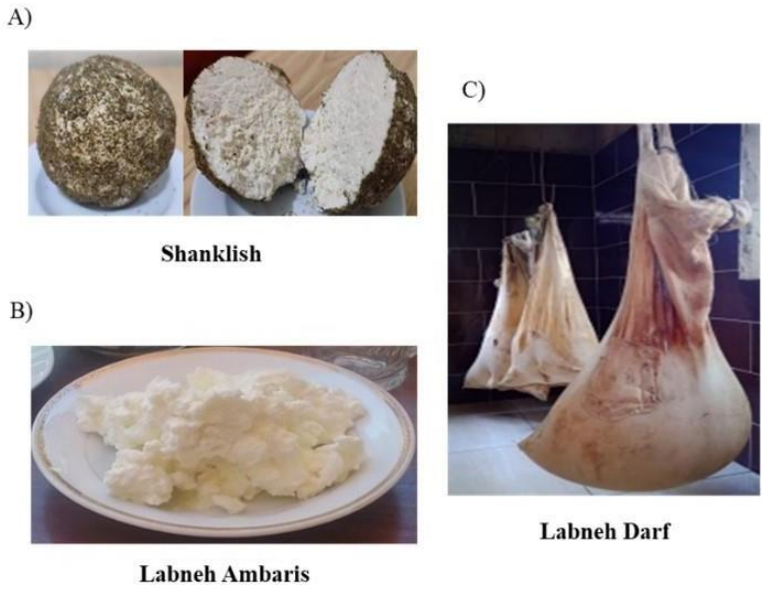


Figure 3. Some traditional fermented milks of Eastern Mediterranean countries Shanklish, B) Labneh Ambaris and C) Labneh Darf.



Figure 4. Earthenware jars used for the production of labneh Ambaris**.**

I.2 Les laits fermentés traditionnels du Liban

Le terroir libanais est riche en différents types de laits fermentés, dont la fabrication est fondamentale et fait partie de la culture et du patrimoine culinaire du pays. Comme la majorité des produits laitiers traditionnels dans le monde, la fabrication des laits fermentés libanais nécessite des savoir-faire hérités des générations précédentes (Alichanidis and Polychroniadou, 2008). Ainsi, autour d'une charpente commune englobant des conditions de fabrication caractéristiques d'un produit, chaque producteur construit son expertise et développe certaines pratiques qui lui sont propres et qu'il tire aussi de ses traditions familiales.

Les produits laitiers constituent une partie importante du régime alimentaire libanais, le Laban étant le produit le plus consommé (Haddad and Chamoun, 2014). Toutefois, la consommation de ces produits varie selon plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, la région et la saison (Arja *et al.*, 2001). Par exemple, les adultes préfèrent les laits fermentés et les fromages, au contraire les enfants préfèrent le lait. De plus, la consommation de produits laitiers « faits maison » est plus élevée dans les régions rurales, que dans les régions urbaines où les produits laitiers importés comme par exemple les yaourts fruités sont largement disponibles. Enfin, traditionnellement les Libanais consomment plus de plats chauds à base de lait fermenté (comme la soupe de Kishk) durant l'hiver pour se réchauffer comparé à l'été où les produits frais sont privilégiés comme le Laban et l'Ayran (Arja *et al.*, 2001). En se référant à notre revue bibliographique (Abi Khalil *et al.*, 2023), les laits fermentés peuvent être classés selon leurs technologies de production en quatre groupes: A) laits fermentés (comme le Laban), B) laits fermentés concentrés/égouttés (comme le Labneh, le labneh Ambaris, labneh Darf et Shanklish), C) les boissons à base de lait fermenté (comme l'Ayran) et D) les laits fermentés aromatisés (comme le Kishk). Cette classification est étroitement liée aux propriétés physicochimiques et ainsi microbiologiques des produits. Une autre classification est aussi proposée se basant sur leur durée de vie (El Balaa, 2009): 1) les produits à courte durée (aux alentours de 10 jours) comme les Laban et Labneh avec des dates limites de consommation, 2) les produits à moyenne durée (quelques mois) comme les fromages frais préservés généralement dans des saumures et réfrigérés, et 3) les produits à longue durée (plusieurs mois) où se classent le Shanklish et le Kishk, le premier étant un lait fermenté égoutté affiné et le second une

poudre avec un taux d'humidité très faible.

I.2.1 Le labneh Ambaris : un lait fermenté par des microorganismes endogènes

Même si la majorité des laits fermentés (Laban, Labneh, Ayran, etc.) sont disponibles sur tout le territoire libanais, il existe des produits typiques et exclusifs à une ou plusieurs régions. On distingue parmi ces produits le labneh Ambaris. C'est un lait fermenté égoutté typique des régions rurales libanaises qui présente des propriétés sensorielles particulières ainsi qu'une technique de fabrication unique. Selon la région de production, ce produit est connu sous différentes dénominations: Serdalli/Serdeleh au Chouf, labneh Ambaris/Anbaris/Ambarees ou labnet-el-jarra et jebnit-el-jarra à la Békaa et à Baalbeck-Hermel (Hajj Semaan *et al.*, 2011; Ayoub *et al.*, 2022). Dans les travaux de cette thèse, la dénomination adoptée est labneh Ambaris.

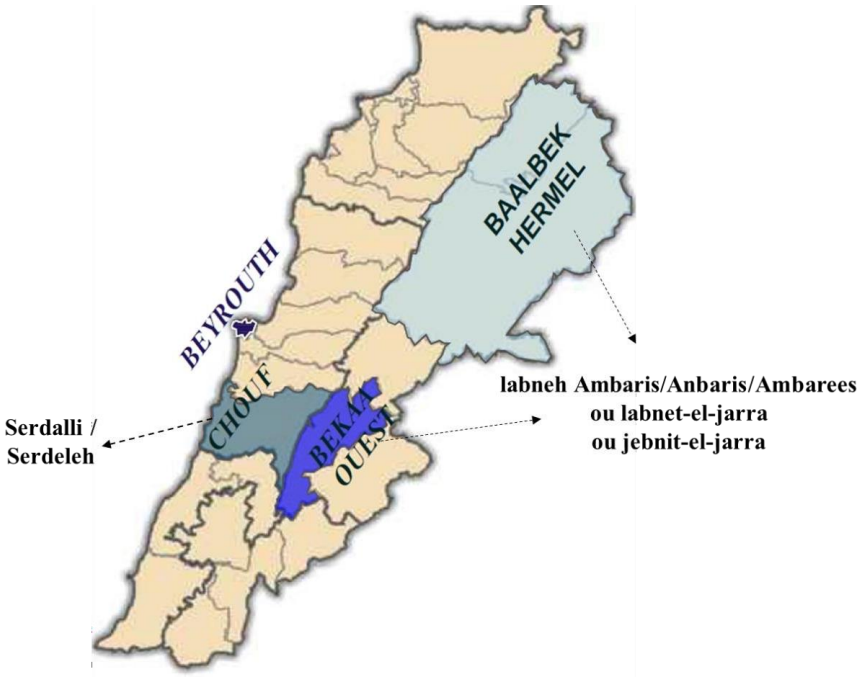


Figure 1. Carte du Liban montrant les dénominations du produit selon les régions.

Le procédé de fabrication traditionnel du labneh Ambaris est long et fastidieux et caractérisé par trois grandes étapes (Figure 2). La première consiste à placer du lait cru de chèvre et du gros sel (ente 2 et 2.5 % de sel) dans des jarres en terre cuite, munies d'un orifice situé sur la partie basse de la jarre pour permettre d'évacuer le lactosérum. Cette étape correspond au démarrage du procédé pendant laquelle le lait fermente 1 à 2 semaines à température ambiante. La deuxième étape commence par le soutirage du premier lactosérum. Des ajouts de lait cru et de gros sel puis l'élimination du lactosérum sont répétées jusqu'à ce que la jarre soit remplie de caillé. Selon la capacité de la jarre, cette étape peut durer entre 2 et 5 mois. A noter que tout au long du procédé, une couche de moisissure peut se former sur la surface du caillé. Certains producteurs l'éliminent tandis que d'autres, et pour éviter sa formation, placent un tissu au contact direct du caillé qu'ils recouvrent par une généreuse quantité de gros sel (Figure 3A). Dans la 3ème étape, et lorsqu'il n'y a plus de lactosérum, une maturation du produit est poursuivie jusqu'à dix jours environ sans aucun ajout de lait ni de sel. Enfin, la jarre est vidée de son contenu dans des sacs en tissu pour un égouttage supplémentaire (Figure 3B). Afin de conserver le labneh Ambaris pour des consommations ultérieures, particulièrement pour l'hiver, de façon courante de petites boules sont confectionnées puis recouvertes d'huile d'olive. Des producteurs le conservent également sous forme de portions dans des sacs en plastique puis directement placés au congélateur. En fonction des producteurs, le labneh Ambaris peut être également consommé sous forme de produit « frais » prélevé tout au long du procédé de fabrication et ce dès le premier mois de début de fermentation écoulé.

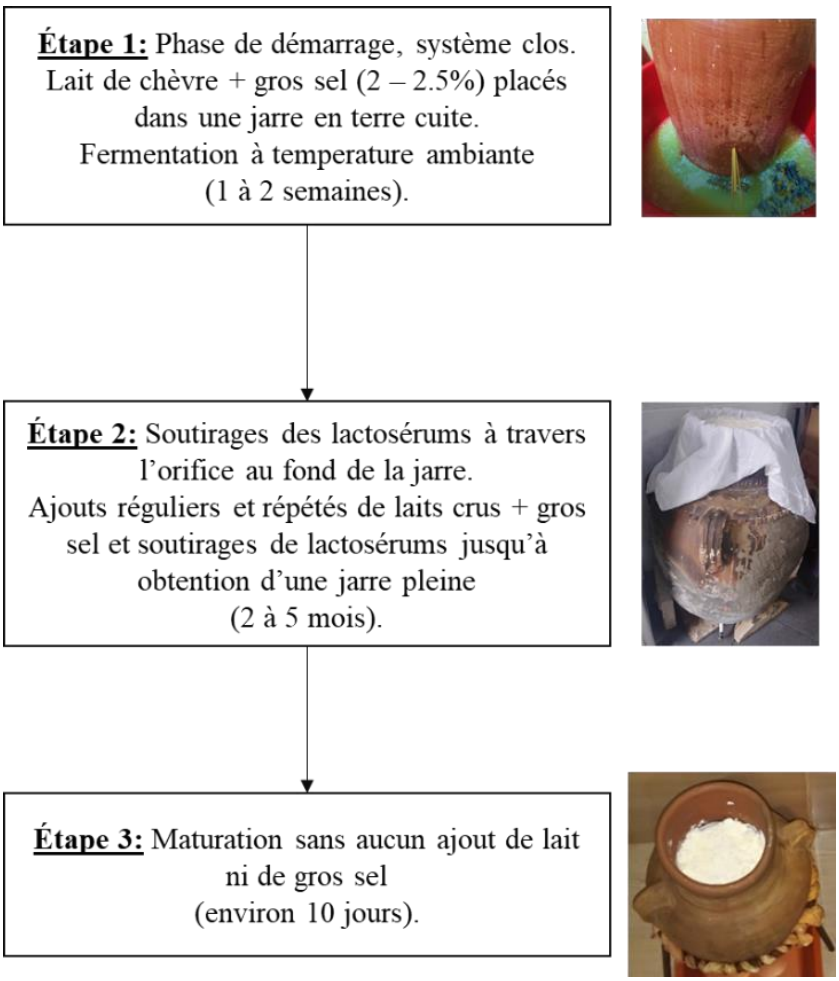


Figure 2. Procédé de fabrication du labneh Ambaris



Figure 3. Certaines étapes du procédé de fabrication du labneh Ambaris.

A) la surface de la jarre recouverte par une couche de gros sel, B) dernier égouttage du labneh Ambaris dans un sac en tissu.

Aujourd'hui, il existe des versions différentes du labneh Ambaris pour des raisons économiques, sanitaires et de praticité (Hajj Semaan *et al.*, 2011; Serhan and Mattar, 2013). Certains producteurs substituent les jarres en terre cuite par des contenants en plastique ou en acier inoxydable (Figure 4). D'autres, pour des raisons de sécurité sanitaire, pasteurisent artisanalement le lait de chèvre avant son utilisation pour la production du labneh Ambaris au lieu du lait cru.



Figure 4. Les contenants, autre que la terre cuite, utilisés par certains producteurs pour la fabrication du labneh Ambaris.

Le labneh Ambaris, comme beaucoup de produits traditionnels, est peu étudié et encore moins valorisé comme cela a été souligné dans notre revue (Abi Khalil *et al.*, 2023).

Rapprochement technologique du labneh Ambaris avec d'autres laits fermentés par des microorganismes endogènes

Le procédé de fabrication du labneh Ambaris fait appel à des fermentations complexes. Dans l'étape 1, aucun microorganisme n'est intentionnellement ajouté. Une coagulation a lieu démontrant le développement de microorganismes acidifiants. Ils peuvent avoir plusieurs origines comme le lait cru et la flore résidente de l'environnement (Groenenboom *et al.*, 2020; von Gastrow *et al.*, 2020). On parle alors de fermentation spontanée où les microorganismes sont endogènes et non ajoutés intentionnellement. L'étape 2 démarre par un soutirage du lactosérum. Le caillé égoutté obtenu est alors « rafraîchi » par des ajouts réguliers de lait. Cette pratique pourrait être assimilée à l'élaboration de levains en panification, à la technique « pied de cuve » employée en brasserie ou en fromagerie, appelée également *back-slopping* (von Gastrow, 2022). Dans le cas du labneh Ambaris, le caillé égoutté sert de « pied de cuve » qui est nourrit régulièrement par les laits ajoutés. Cette étape rappelle également le procédé de fabrication artisanale du kéfir de lait (Korsak

et al., 2015; Kim *et al.*, 2018b; Sindi *et al.*, 2020). Ce lait fermenté est constitué majoritairement de bactéries lactiques et acétiques et de levures de la famille des *Saccharomycetaceae* (Korsak *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2020; Rahmani *et al.*, 2022). Les grains de kéfir servant d'inoculum pour le lait sont ensuite récupérés après fermentation pour à nouveau ensemencer un autre lait. Il s'agit alors également du procédé de *back-slopping*. La Figure 5 illustre les similitudes des procédés entre le labneh Ambaris, le kéfir de lait artisanal, ainsi que les fromages fermiers au lait cru à coagulation lactique utilisant du lactosérum des productions précédentes comme ferment lactique. Ces trois catégories de produits (le labneh Ambaris, le kéfir de lait et les fromages à coagulation lactique), ont en commun l'utilisation du lait cru, le recours à un ferment dit naturel ou autochtone dont la composition microbienne n'est pas définie (donc ferment naturel complexe) (Demarigny *et al.*, 2011; Demarigny and Gerber, 2014), la pratique de *back-slopping* en système continu (labneh Ambaris) ou discontinu (kéfir de lait, fromage à coagulation lactique). De plus, l'égouttage, ainsi que le salage sont des étapes communes entre le labneh Ambaris et les fromages à coagulation lactique. Cependant, le salage et l'égouttage se font en milieu semi-fermé pour le labneh Ambaris et donc en conditions aéro/anaérobies. En effet la jarre est recouverte d'un tissu et le caillé s'accumule dans la jarre. Pour les fromages, l'égouttage (dans les moules) se fait en milieu « ouvert » dans des conditions d'aérobioses. D'autre part, fermentations et égouttages se font conjointement pour le labneh Ambaris (du lait substrat pour les bactéries lactiques notamment est ajouté régulièrement après drainage du lactosérum), alors que pour les fromages à coagulation lactique, la fermentation a lieu antérieurement pendant la coagulation. Une autre similarité existe entre ces trois catégories de produits: la fermentation se fait à des températures ambiantes. Ces rapprochements en termes de procédé, et d'utilisation de lait cru permettent d'envisager des similitudes des communautés microbiennes pour ces trois catégories de produits.

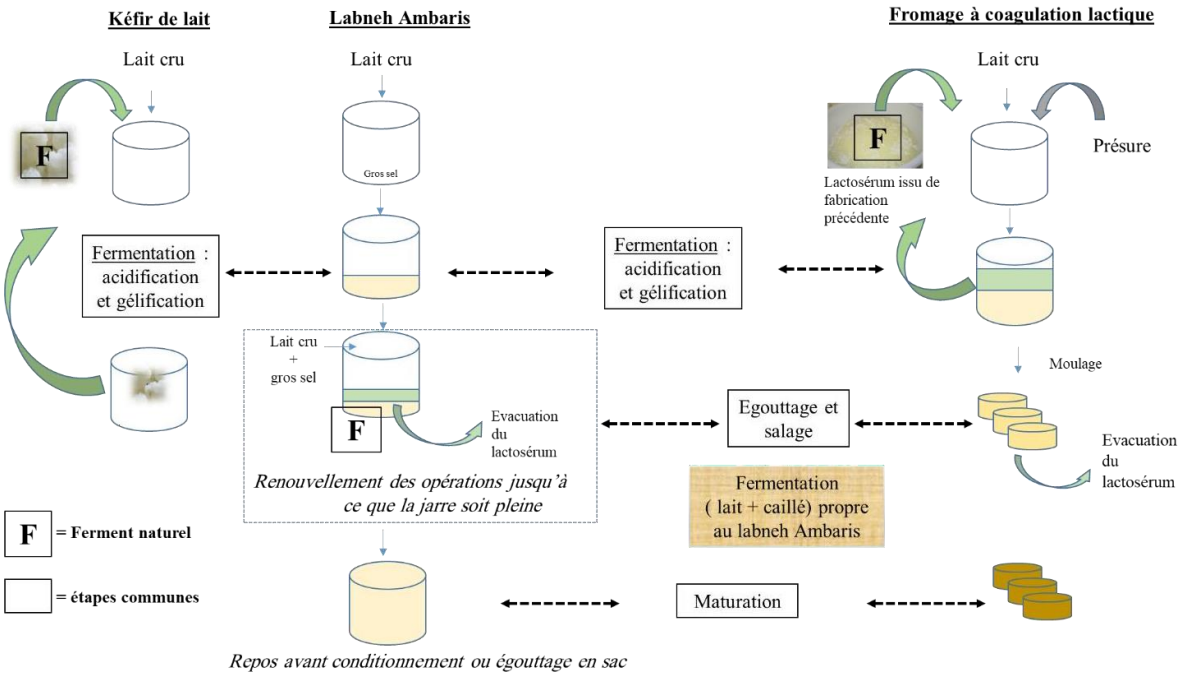


Figure 5. Procédés de fabrication du kéfir de lait, du labneh Ambaris et du fromage à coagulation lactique.

Les connaissances des communautés microbiennes du labneh Ambaris ainsi que des autres laits fermentés traditionnels mentionnés dans notre revue (Abi Khalil *et al.*, 2023) sont limitées et utilisent des approches microbiologiques culture-dépendantes qui ne permettent pas d'approcher de façon approfondie la diversité microbienne. Les communautés microbiennes dans le chapitre suivant traiteront des produits se rapprochant le plus des technologies de labneh Ambaris : le kéfir de lait et les fromages à coagulation lactique.

Chapitre II – Les communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes

Selon la norme proposée par Codex Alimentarius, un lait fermenté est « un produit laitier obtenu par la fermentation du lait, lequel peut avoir été fabriqué à base de produits obtenus à partir de lait avec ou sans modification de composition, par l'action de micro-organismes appropriés et résultant de la réduction du pH avec ou sans coagulation (précipitation isoélectrique) » (Codex Alimentarius, 2018). Pour les fabrications industrielles, des ferments sélectionnés sont utilisés afin d'obtenir un produit final ayant des caractéristiques organoleptiques et une qualité sanitaire prédéfinies. Dans le cas des laits fermentés par des microorganismes endogènes, les fermentations sont dues aux communautés microbiennes autochtones qui peuvent avoir plusieurs origines comme le lait, les ustensiles de production, l'air environnant, et le microbiote de l'homme. Ce qui se traduit souvent par une grande diversité d'espèces de bactéries et de levures/moisissures (Zhong *et al.*, 2016; Groenenboom *et al.*, 2020). Dans la suite du manuscrit, nous ferons référence à ces produits par les termes « laits fermentés par des microorganismes endogènes ».

Afin de décrire les microorganismes et leurs communautés, les écologistes appliquent un système de classification hiérarchique (Figure 6). Ce système commence par les microorganismes à l'échelle individuelle qui, génétiquement très liés, occupent le même environnement et constituent une population. Les populations qui exploitent les mêmes ressources sont regroupées dans une guilde (Weissenbach and Sghir, 2016). Toutes les guildes (et donc les populations) présentes dans un environnement spécifique constituent les communautés microbiennes de cet environnement. Les communautés microbiennes, ainsi que les autres composantes biotiques et abiotiques de leur environnement constituent l'écosystème microbien (Giraffa, 2004; Gentry *et al.*, 2015; Burman and Bengtsson-Palme, 2021).

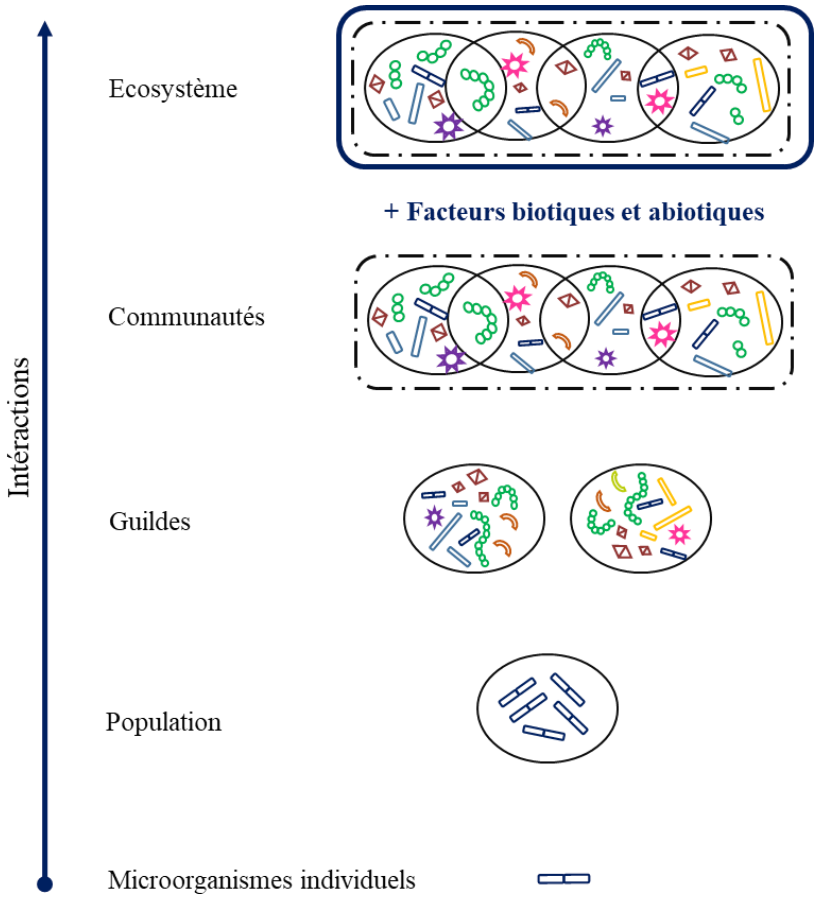


Figure 6. Organisation écologique des microorganismes et leurs communautés.

D'après *(Gentry et al., 2015)*.

La production de laits fermentés nécessite l'activité de bactéries, en particulier celles qui appartiennent au groupe le plus souvent retrouvé dans les productions laitières, celui des bactéries lactiques. Leur rôle essentiel est de produire des acides organiques, principalement de l'acide lactique, réduisant ainsi le pH du lait à des niveaux inférieurs au point isoélectrique des caséines et permettant alors la coagulation des protéines (Beresford *et al.*, 2001). Les bactéries lactiques les plus couramment retrouvées dans les laits fermentés appartiennent aux genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus*. Elles sont toutes Gram positiveset ne sécrètent pas l'enzyme catalase fonctionnelle (Hill and Ross, 1998; Quigley *et al.*, 2013).

II.1 La diversité microbienne des laits fermentés par des microorganismes endogènes

Etant donné le peu d'études portant sur le labneh Ambaris, nous nous appuierons particulièrement sur les connaissances acquises concernant les communautés microbiennes du kéfir de lait et de quelques données existantes sur les fromages à coagulation lactique. La particularité des laits fermentés par des microorganismes endogènes est l'importante diversité des populations microbiennes qui les composent. Cette diversité est due principalement au fait que la fermentation soit orchestrée par un grand nombre d'espèces qui proviennent de plusieurs sources (l'environnement laitier, l'alimentation des animaux, la traite, l'homme, le lait et les ferments naturels) plutôt qu'un nombre limité de souches spécialisées contenues dans les ferments industriels (Picon *et al.*, 2019; Groenenboom *et al.*, 2020). Pour ces laits fermentés traditionnels, les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus dominantes accompagnées souvent par les levures. Les bactéries acétiques peuvent également y être retrouvées. Un bon exemple qui illustre cette grande diversité est le kéfir de lait. En effet, entre 30 et 50 espèces microbiennes ont été répertoriées dans ce lait fermenté (Zelezniak *et al.*, 2015). Les bactéries lactiques appartenant aux genres *Lactobacillus, Lactococcus*, *Leuconostoc*, et *Streptococcus* dominent ses communautés microbiennes. Des bactéries acétiques du genre *Acetobacter* y sont également détectées. Des communautés fongiques sont couramment retrouvées dans le kéfir de lait qui peuvent fermenter ou non le lactose comme les genres *Kluyveromyces*, *Pichia* et *Saccharomyces* (Kesmen and Kacmaz, 2011).

Sindi *et al.*, (2020) ont exploré la diversité des populations bactériennes de 6 kéfirs de lait artisanaux ainsi que 6 grains de kéfir provenant de pays différents. Les profils microbiens entre les grains et les laits fermentés sont similaires avec une abondance relative de *Lactobacillus kefiranofaciens* (espèce majoritaire) plus importante dans les grains. Les bactéries les plus abondantes dans la plupart des kéfirs de lait artisanaux sont des bactéries lactiques suivies des bactéries acétiques. Notons que la moitié des espèces majoritaires répertoriées dans cette étude produisent des bactériocines comme *L. kefiri*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. apis* et *L. acidophilus* (Sindi *et al.*, 2020). De nombreuses espèces bactériennes et fongiques ont été répertoriées dans les kéfirs de lait artisanaux et industriels

comme l'illustre le Tableau 1 ci-dessous.

Les communautés de levures les plus étudiées pour les laits fermentés traditionnels disponibles dans la littérature sont celles du kéfir de lait. Leurs compositions fongiques varient selon les pays et les régions d'origine. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae,* a été isolée dans la plupart des kéfirs de lait étudiés. *K. marxianus* a été détectée dans des kéfirs argentin, belge, chinois, turc et iranien. *Candida spp*. a été retrouvée dans le kéfir bulgare, *Kasachstania spp.* (*unispora* et *exigua*) ainsi que *Pichia kudriavzevii* ont été détectées dans du kéfir chinois (Prado *et al.*, 2015; Rahmani *et al.*, 2022).

Tableau 1. Diversité microbienne des kéfirs de lait artisanaux et industriels de différents pays d'origine. D'après (Vieira *et al.*, 2021a)

	Diversité microbienne	Pays d'origine	Références
Kéfir de lait Artisanal	*Aspergillus amstelodam* , *Cordyceps bassiana* , *Fusarium solani* , *Lacticaseibacillus casei* , *Lactobacillus kefiranofaciens* , *Lentilactobacillus kefiri, Liquorilactobacillus mali, Lacticaseibacillus paracasei, Liquorilactobacillus satsumensis, Lactococcus cremoris, Lactococcus lactis ssp. lactis,* et *Leuconostoc mesenteroides*	Brésile	Brasiel *et al.* , 2021; Leite *et al* .,2015; Vieira *et al* ., 2017; Zanirati *et al.* , 2015
	Enterococcus durans, Lentilactobacillus kefiri, Lactococcus lactis et *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*	Taïwan	Chang-Liao *et al.* , 2020
	Lactobacillus sp., Lactobacillus delbrueckii, Lentilactobacillus kefiri, Lactocaseibacillus paracasei, Lactiplantibacillus plantarum, Latilactobacillus sakei, Lactococcus lactis, Leuconostoc gelidum, Leuconostoc mesenteroides, et *Pediococcus pentosaceus*	Russie	Khokhlacheva *et al.* 2015; Mantzourani *et al.* , 2019
	Cryptococcus sp. vega, Cyberlindnera jadinii, Davidiella tassiana, Dekkera bruxellensis, Dioszegia hungarica, Eurotium amstelodami, Ganoderma lucidum, Heterobasidion annosum, Kazachstania barnettii, Kazachstania unispora, Kluyveromyces marxianus, Malassezia pachydermatis, Microdochium nivale, Naumovozyma Castelli, Penicillium sp. vega, Peziza campestres, Pichia fermentans, Pichia kudriavzevii, Saccharomyces cerevisiae, Teratosphaeria knoxdaviesii, Wallemia sebi, et *Zygosaccharomyces lentus*	Irelande, Royaume Uni, États-Unis, Espagne, France, Italie, Canada, Allemagne	Marsh *et al.,* 2013
	Acetobacter fabarum, Acetobacter okinawensis, Acetobacter orientalis, Enterococcus durans, Kazachstania unispora, Kluyveromyces marxianus, Lentilactobacillus diolivorans, Lentilactobacillus kefiri, Lactobacillus kefirofaciens, Lentilactobacillus otakiensis, Lacticaseibacillus paracasei, Lactococcus lactis, et *Saccharomyces cerevisiae*	Turkie	Purutoglu *et al.* , 2020
	Acinetobacter orleanensis, Acinetobacter pasteurianus, Acidocella aluminiidurans, Gluconobacter morbifer, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus apis, Lacticaseibacillus casei, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus delbrueckii , Lactobacillus gigeriorum , Lactobacillus helveticus , Lactobacillus kefiranofaciens , Lacticaseibacillus paracasei , Lacticaseibacillus rhamnosus , Lactobacillus ultunensis , Lactococcus lactis , Lentilactobacillus kefiri , Leuconostoc mesenteroides et *Streptococcus thermophilus*	Corée du Sud, Lituanie, Royaume Uni, les pays Caucases	Sindi *et al.,* 2020
	Lactobacillus helveticus	Indonésie	Raras *et al.,* 2019
Kéfir industriel	*Lacticaseibacillus rhamnosus, Lactiplantibacillus plantarum, Lacticaseibacillus casei, Saccharomyces florentinus, Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris, Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium longum, Bifidobacterium breve, Lactobacillus acidophilus, Limosilactobacillus reuteri, Streptococcus diacetylactis*	Canada	Bourrie *et al.,* 2021
	Acetobacter fabarum, Acetobacter orientalis, Kluyveromyces marxianus, Kazachstania exígua, Kazachstania turicensis, Kazachstania unispora, Lactobacillus kefiranofaciens ssp. kefiranofaciens, Lactobacillus kefiranofaciens ssp. kefirgranum, Lentilactobacillus kefiri, Lactobacillus helveticus, Lacticaseibacillus paracasei, Lentilactobacillus parakefiri, Limosilactobacillus reutrei, Lactococcus cremoris, Lactococcus lactis ssp. lactis, Leuconostoc mesenteroides, Saccharomyces cerevisiae	Allemagne	Nejati *et al.,* 2020
	Kazachstania unispora, Kodamaea ohmeri, Saccharomyces boulardii, Saccharomyces Cerevisiae	Malaisie	Azhar *et al.,* 2019
	Aspergillus syzygii K03D05, *Lactiplantibacillus plantarum* K03D08	Chile	Dinamarca *et al.,* 2021
	Lactiplantibacillus plantarum CIDCA 83114, *Kuyveromyces marxianus* CIDCA 8154, *Streptococcus thermophilus* CIDCA 321	Argentina	Kakisu *et al.,* 2011

Concernant les fromages à coagulation lactique au lait cru de chèvre, la diversité microbienne observée par rapport au kéfir de lait est bien moindre et les espèces contenues dans ces fromages peuvent différer. Le type de ferment naturel, la structure et la composition de la matrice (liquide puis solide pour les fromages, teneurs en matières sèches plus élevées dans les fromages en raison de l'étape d'égouttage, puis affinage) les teneurs en oxygène, la présence ou l'absence de sel sont probablement des paramètres à l'origine de ces différences. Pour ces fromages, peu de données scientifiques sont disponibles dans la littérature. *Lactococcus lactis* est l'espèce bactérienne acidifiante dominante dès les premiers jours de fabrication (Demarigny *et al.*, 2006; Penland *et al.*, 2021). Une étude menée dans une exploitation fromagère fermière fabriquant du Pélardon (fromage de chèvre AOP), a montré que les espèces *Leuconostoc mesenteroides* et *Geotrichum candidum* sont présentes et associées au catabolisme des acides aminés après la phase d'acidification. Ces deux espèces sont aussi dominantes dans le lactosérum (ferment naturel utilisé en *back-slopping*). A l'étape d'affinage, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Penicillium commune* et *Scopulariopsis brevicaulis* sont les espèces dominantes et associées aux composés volatils responsables des arômes de chèvre et de terre (Penland *et al.*, 2021). Ces résultats sont issus d'une seule étude dans une seule fromagerie et mériteraient d'être confirmés par d'autres études scientifiques dans d'autres exploitations fromagères fermières.

Si l'on compare les espèces microbiennes de ces deux types de produits (kéfir de lait et fromage à coagulation lactique) aux rares données scientifiques disponibles sur les communautés microbiennes du labneh Ambaris, on observe des similitudes entre les espèces. Selon la communication affichée de Ammoun *et al.*, (2021), *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri* et *Lentilactobacillus diolivorans* sont les espèces les plus dominantes retrouvées dans les échantillons de labneh Ambaris (ou Serdaleh) étudiés. Ces espèces sont également fréquemment détectées dans les kéfirs de lait. De plus, *Lactococcus lactis* et *Leuconostoc spp*. sont les bactéries lactiques dominantes des fromages à technologie lactique, étant également retrouvées dans les laits fermentés traditionnels de la Méditerranée orientale (Abi Khalil *et al.*, 2023). Il est important de mentionner que la plupart des espèces identifiées dans les laits fermentés de la Méditerranée orientale le sont à partir de méthodes culture-dépendantes. *L*

kefiranofaciens, une des espèces dominantes des kéfirs de lait, est souvent identifiée par méthode culture-indépendante (Georgalaki *et al.*, 2021). En effet, cette espèce se développe difficilement dans les milieux de culture et les conditions d'incubation fréquemment utilisés (Georgalaki *et al.*, 2021). Ammoun *et al.*, (2021) l'ont d'ailleurs identifiée dans le labneh Ambaris comme espèce majoritaire par la méthode métagénomique shotgun.

Concernant les levures, la seule étude disponible dans la littérature est récemment faite par Ayoub *et al.*, (2022) dans laquelle les auteurs ont identifié 7 espèces majoritaires dans le labneh Ambaris chez un même producteur: *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaromyces hansenii*, *Candida parapsilosis* et *Kazachstania exigua*. Les équilibres entre ces espèces changent au cours de la production mais *Pichia kudriavzevii* et *Kluyveromyces marxianus* restaient dominantes quel que soit le stade de fabrication. Ces espèces sont souvent retrouvées dans le lait et les produits laitiers fermentés traditionnels (Lavoie *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013; Bintsis, 2021). Elles sont toutes capables de croître dans des milieux acides avec des teneurs en sel élevées, ce qui justifie leur présence dans le labneh Ambaris (Russo *et al.*, 2008; Radecka *et al.*, 2015; Buzzini *et al.*, 2018; Heaney *et al.*, 2020).

II.2 Les intérêts des communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes pour l'Homme

Outre le rôle des communautés microbiennes des laits fermentés traditionnels dans leurs caractéristiques sensorielles typiques, les bactéries lactiques et notamment les lactobacilles, bactéries dominantes de ces laits fermentés traditionnels, améliorent les propriétés nutritionnelles en éliminant les facteurs antinutritionnels et augmentent la digestibilité et la valeur biologique des protéines (Settanni and Moschetti, 2010; Peláez *et al.*, 2019). Il semblerait que les aptitudes à la biosynthèse de métabolites soient plus importantes pour les lactobacilles issus de souches dites « sauvages » que pour les souches domestiquées retrouvées dans les ferments industriels comme cela a été démontré dans les fromages au lait cru (Settanni and Moschetti, 2010). Les souches domestiquées, du fait de leur changement environnemental, ont probablement perdu une partie de leurs gènes ancestraux impliqués dans certaines voies de biosynthèse (McAuliffe, 2018). La qualité

sensorielle, nutritionnelle ainsi que les effets sur la santé de ces laits fermentés sont en grande partie dus aux métabolites produits par l'ensemble de leurs communautés par des voies métaboliques diverses et des interactions entre espèces et entre souches (Diosma *et al.*, 2014; Prado *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2019).

Concernant les effets sur la santé, le kéfir de lait, dont le procédé de fabrication caractérisé par le *back-slopping* se rapproche du procédé du labneh Ambaris comme vu précédemment, est largement populaire pour les nombreux bienfaits qu'il confère à l'Homme. Ceci est étroitement lié à la richesse et diversité de ses composés bioactifs. Les plus étudiés sont les exopolysaccharides (comme le kéfiran), les peptides bioactifs et les acides organiques notamment l'acide lactique (Vieira *et al.*, 2021b). Dans la méta-analyse réalisée par (Vieira *et al.*, 2021a), il semblerait que le kéfir de lait artisanal (inoculation du lait avec des grains de kéfir naturels) possède une plus grande diversité de composés bioactifs ayant un potentiel antioxydant comparé au kéfir de lait industriel (inoculé avec un ferment industriel). La plus grande diversité des communautés microbiennes ainsi que la nature des espèces contenues dans le kéfir de lait artisanal pourraient expliquer l'origine des différences concernant les composés bioactifs (référence Tableau 1). Cette hypothèse reste à confirmer car peu d'études portent sur le kéfir de lait industriel, ce qui limite la comparaison entre les deux types de lait fermenté.

II.3 Les origines des communautés microbiennes des laits fermentés par des microorganismes endogènes

II.3.1 Les laits crus

Le lait est une matrice riche en éléments nutritifs. Ses teneurs élevées en protéines, lipides, glucides, vitamines et minéraux (Tableau 2 ci-dessous), ainsi que son pH proche de la neutralité (6.6 – 6.8) et son activité de l'eau élevée (0.99), offrent un environnement idéal pour la croissance de nombreux microorganismes (Quigley *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017b).

Tableau 2. Intervalles des compositions biochimiques des laits de différentes espèces par 100g de lait. D'après (Muehlhoff *et al.*, 2013).

	Vache	Chèvre	Brebis
Energie (kcal)	59 - 66	58 - 74	93 - 108
Eau (g/100g)	87,3 - 88,1	86,4 - 89,0	80,7 - 83,0
Protéines (g/100g)	3,2 - 3,4	2,9 - 3,8	5,4 - 6,0
Lipides (g/100g)	3,1 - 3,3	3,3 - 4,5	5,8 - 7,0
Lactose (g/100g)	4,5 - 5,1	4,2 - 4,5	4,5 - 5,4
Minéraux			
Calcium (mg/100g)	91–120	100–134	170–207
Magnésium (mg/100g)	10–11	13–14	--
Potassium (mg/100g)	132–155	170–228	120–187
Vitamines			
Vitamine B2 (mg/100g)	0,17–0,20	0,04–0,18	0,32–0,36
Vitamine B5 (mg/100g)	0,34–0,58	0,31–0,41	0,41–0,45
Vitamine B9 (µg/100g)	5,0–8,0	Traces–1,0	5,0–7,0
Vitamine B12 (mg/100g)	0,25–0,90	0,04–0,10	0,60–0,71

Le lait dans la partie supérieure de la mamelle d'une femelle allaitante en bonne santé est souvent considéré comme stérile (Quigley *et al.*, 2013). Cependant, durant et après la traite, le lait est colonisé par des microorganismes provenant de diverses sources (trayons, ambiance et conditions de la traite). Les conditions de stockage du lait sont également cruciales dans le développement des microorganismes. Dans le cas de la production du labneh Ambaris traditionnel, la traite est souvent manuelle et le lait est rarement refroidi, ce qui favorise le développement des microorganismes mésophiles. Les mains du trayeur sont aussi une source directe de transfert de microorganismes au lait cru. En effet, il a été démontré que la traite à la main résulte en un nombre de cellules somatiques élevé dans les laits crus comparés aux laits issus des machines à traire (Delgado-Pertiñez *et al.*, 2003; Sinapis, 2007). Les références scientifiques portant sur la nature, l'abondance et la biodiversité microbienne des laits crus portent essentiellement sur des laits de traite mécanique, souvent refroidis (2-4°C).

Au total, plus de 400 espèces de bactéries, de levures et de moisissures ont été détectées dans les laits crus (Montel *et al.*, 2014). Parmi cette grande diversité, de nombreux genres bactériens et fongiques sont également présents dans la plupart des laits crus de vache, de chèvre et de brebis comme c'est le cas des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Aeromonas* et plusieurs genres de la famille des *Enterobacteriaceae*, ainsi que les genres fongiques *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*,

Geotrichum, Saccharomyces et *Torulaspora* (Lavoie *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013). Concernant les laits crus de chèvre, Pisano *et al.*, (2019) ont étudié les communautés bactériennes dominantes dans différentes régions de la Sardaigne. Les bactéries lactiques identifiées étaient *Lactococcus lactis, Lacticaseibacillus paracasei, Lactococcus raffinolactis, Lactiplantibacillus plantarum, Lactococcus cremoris, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis* et *Leucoconostoc spp.* Concernant la région de la Méditerranée orientale, peu voire pas d'informations sont disponibles à notre connaissance dans la littérature sur les compositions microbiennes des laits issus des races indigènes locales, notamment des chèvres. Tabet *et al.,* (2016) ont prélevé des échantillons de laits crus d'une ferme caprine libanaise (chèvres « Baladi », races locales). La flore mésophile aérobie viable moyenne était de 6,92 ± 0,71 log10 UFC/ml, ce qui est très élevé comparé aux données moyennes de la littérature sur des laits de chèvres français (Tormo *et al.*, 2011). Les teneurs en staphylocoques à coagulase négative ainsi que les coliformes totaux sont par contre dans le même ordre de grandeur que les laits de chèvre français (environ 4 log 10 UFC/ml) (Tormo *et al.*, 2011).

Le profil microbien du lait (nature, abondance et diversité des populations) dépend de l'exploitation et des systèmes d'élevage. En effet, les pratiques de production du lait, les équipements ainsi que l'environnement de la traite sont des éléments qui vont conditionner la composition de son microbiote (Tormo *et al.*, 2011, 2015; Montel *et al.*, 2014; Frétin *et al.*, 2018; Sant'Anna *et al.*, 2019). Les communautés bactériennes du lait, de l'environnement laitier et des fromages ont été suivies dans 7 exploitations du Minas Gerais au Brésil (Sant'Anna *et al.*, 2019). Certainespopulations appartenant aux familles *Planococaccaceae* et *Streptococcaceae* ont été retrouvées dans l'ensemble des laits crus des exploitations et également dans les fromagesà tous les stades de fabrication, mettant en évidence les flux microbiens entre les laits crus et les fromages d'une même exploitation. De même Frétin *et al.*, (2018) ont identifié 9 espèces bactériennes communes aux trayons, laits et fromages (cœur et croute) : *Lactobacillus casei/paracasei, Staphylococcus haemolyticus /petrasii, Staphylococcus spp., Lactococcus lactis, Lactoccocus spp., Brevibacterium linens, Macrococcus caseolyticus, Streptococcus porcinus/uberis,* et *Streptococcus dysgalactiae.*

II.3.2 Les ferments naturels

Les ferments naturels, également appelés ferments endogènes ou autochtones, sont constitués d'une microflore complexe, majoritairement des bactéries lactiques non-starter (NSLAB) ainsi que des levures/moisissures, pouvant provenir de diverses sources (environnement, matières premières, outils de transformation...). Ces microorganismes forment des écosystèmes complexes où ils peuvent facilement s'associer les uns aux autres (Demarigny, 2012). Les ferments naturels sont principalement liés au *back-slopping*, et peuvent également provenir d'une acidification naturelle par les bactéries lactiques autochtones présentes dans le lait cru de départ, c'est-à-dire par des fermentations spontanées. Progressivement, les espèces les plus adaptées aux conditions environnementales de la matrice sont sélectionnées et constituent ainsi les ferments naturels (Demarigny and Gerber, 2014). Dans le cas du labneh Ambaris, comme évoqué dans le chapitre I.2.1, une fermentation spontanée du lait de départ a lieu donnant lieu à un lait fermenté acidifié riche en bactéries lactiques. Le caillé obtenu est par la suite « rafraîchi » par ajouts réguliers de lait. Ce caillé peut alors être considéré comme un ferment naturel. Les communautés microbiennes présentes dans les ferments naturels sont très diversifiées et ont plusieurs origines comme le lait cru de départ, et également les pratiques de production employées par les producteurs (Demarigny and Gerber, 2014). Ceci donne des ferments étroitement liés aux producteurs, représentant la flore résidente de leur environnement laitier. Suite aux repiquages successifs et réguliers durant la production fromagère en utilisant le lactosérum des productions précédentes, la microflore du lait cru semble être sous-dominante et les communautés microbiennes installées dans la matrice sont celles du lactosérum i.e. le ferment naturel utilisé (Demarigny *et al.*, 2011). Les ferments naturels sont considérés comme étant un réservoir de microorganismes dans lequel ceux les plus adaptés sont toujours sélectionnés, quelles que soient les propriétés du produit final (Angelier, 2008). Ceci montre que ces ferments ne sont pas stables et leurs compositions microbiennes peuvent changer avec le temps et les conditions.

II.3.3 Les matériaux et l'environnement laitier

De nombreuses surfaces telles que les ustensiles, les équipements, les réservoirs de saumures, les salles de production, les salles de maturation, les cuves, les vêtements et le microbiote humain constituent l'environnement laitier (von Gastrow, 2022). Tous ces derniers sont des réservoirs potentiels de communautés microbiennes autochtones connues sous le terme de « flore résidente » (Kousta *et al.*, 2010) ou « house microbiota ». La colonisation et le maintien de ces communautés microbiennes au cours du temps, reposent sur leur capacité à s'adapter aux conditions environnementales telles que les teneurs en sel, l'activité de l'eau, le pH, ainsi que les procédures de nettoyage et les compétitions avec d'autres microorganismes (Mounier *et al.*, 2006; Bokulich and Mills, 2013). Ces communautés semblent être établies sur les surfaces de l'environnement laitier malgré un nettoyage fréquent (Bokulich and Mills, 2013). Afin d'explorer les écosystèmes microbiens des environnements laitiers, plusieurs études ont été réalisées. Bokulich et Mills, (2013) ont analysé deux exploitations fromagères artisanales fabriquant des produits laitiers proches et qui inoculent leurs laits pasteurisés par des ferments standardisés spécifiques. Cette étude suggère que les espèces microbiennes résidentes, et donc la flore résidente, dans chaque exploitation étaient massivement dominantes et que les souches commerciales inoculées ne se sont pas établies dans l'environnement de l'exploitation (Bokulich and Mills, 2013). Une telle installation des microorganismes endogènes peut orienter les caractéristiques sensorielles des produits laitiers fabriqués (Mauriello *et al.*, 2003; Randazzo *et al.*, 2010). L'origine des flores résidentes propres à chaque exploitation n'est pas encore claire. Pourtant, plusieurs hypothèses se posent. La plus probable est l'installation de ces flores résidentes suite aux pratiques de production utilisées, assurant un transfert continu d'une production à la suivante (Bokulich and Mills, 2013). Les laits utilisés, ainsi que les interventions humaines et les périodes d'affinage peuvent contribuer à l'inoculation, la sélection puis l'installation des flores résidentes dans l'environnement laitier (Quijada *et al.*, 2018).

Les équipements et ustensiles utilisés dans la fabrication de nombreux produits laitiers traditionnels participent à l'enrichissement de ces derniers par certaines populations microbiennes actives. Groenenboom *et al.*, (2020) ont étudié les communautés

microbiennes d'un lait fermenté traditionnel de Zambie: le Mabisi. Ces auteurs ont démontré que le *back-slopping* passif où le transfert non intentionnel de microorganismes restants de la production précédente sur les surfaces internes de la cuve de fermentation, appelée calebasse, résulte en une plus grande richesse et diversité de bactéries comparées au *back-slopping* actif intentionnel. D'autres études faites sur les surfaces internes des cuves en bois utilisées pour la fabrication des fromages AOP Salers (Gerles) (Didienne *et al.*, 2012) et AOP Ragusano (Tina) (Lortal *et al.*, 2009) ont montré que ces dernières constituent des réservoirs de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques acidifiantes, restants des productions précédentes sous forme de biofilms.



Figure 7. Gerle utilisée pour la production du fromage AOP Salers.

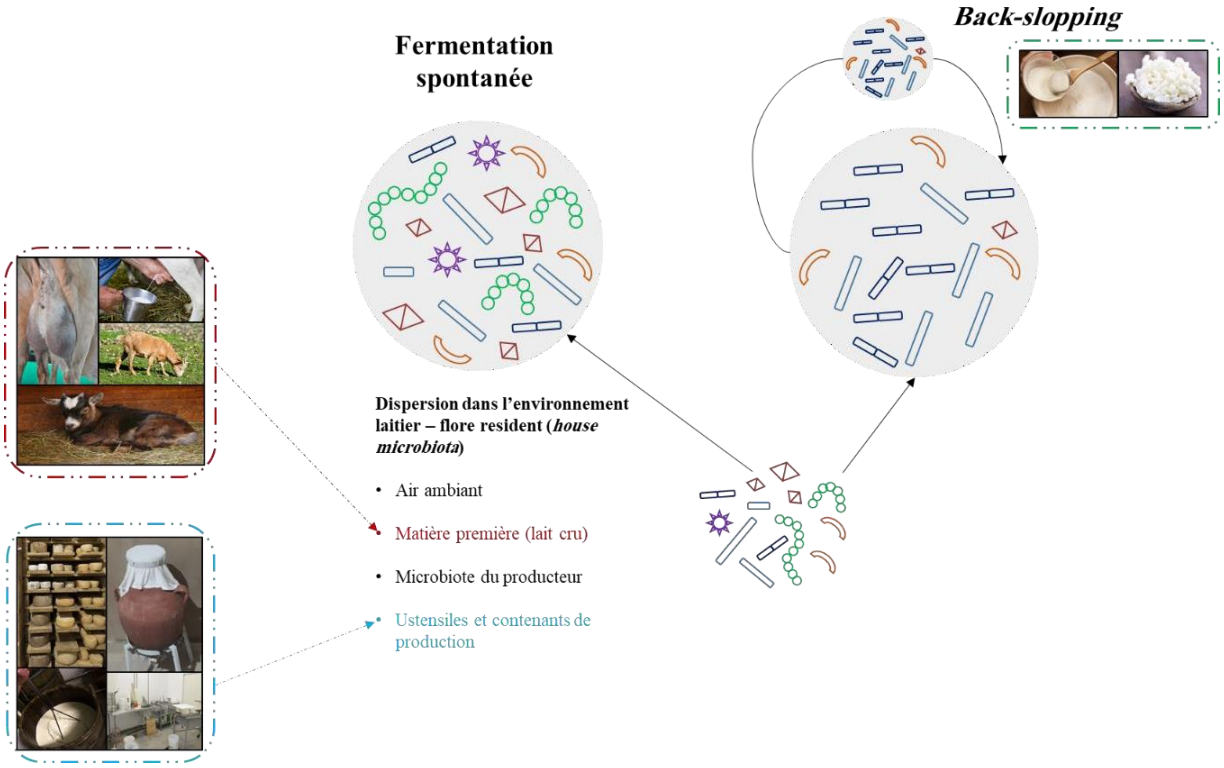


Figure 8. Schématisation des sources potentielles des microorganismes endogènes dans les laits fermentés traditionnels. D'après (von Gastrow, 2022).

Dans le cas d'une fermentation spontanée, l'ensemencement se fait majoritairement depuis l'environnement de production (air ambiant, matière première, les ustensiles et contenants de production et le microbiote du producteur). Tandis que dans le *back-slopping*, l'effet de l'environnement laitier est moindre. Ainsi, l'ajout de ferment naturel par *back-slopping* peut contrôler la dispersion.

II.4 La sélection des microorganismes par les paramètres physicochimiques des laits fermentés par des microorganismes endogènes

Plusieurs facteurs abiotiques affectent et régulent la composition microbienne des laits fermentés ainsi que la dynamique de leurs communautés, c'est-à-dire leur évolution dans leur habitat au fil du temps (Burman et Bengtsson-Palme, 2021). La dynamique de la croissance ainsi que la survie des microorganismes dans une matrice est le résultat de leurs réponses aux changements des paramètres biochimiques de la matrice alimentaire, tels que le pH, la teneur en sel et l'activité de l'eau (Groenenboom *et al.*, 2020).

II.4.1 L'acidité

Il est bien connu que le pH est l'un des paramètres les plus utilisés pour gérer la croissance microbienne. La fermentation, le processus durant lequel les microorganismes par leur métabolisme relarguent des acides organiques abaissant ainsi le pH du milieu, a été utilisée depuis longtemps pour la conservation des aliments. Les microorganismes peuvent être classés selon leur pH optimal de croissance en 3 groupes: les acidophiles qui se développent le mieux à des pH <5, les neutrophiles qui se développent le mieux à des pH entre 5 et 9 et les alcalophiles qui se développent à des pH> 9 (Jin and Kirk, 2018). Lorsque le pH environnemental s'écarte des niveaux de pH optimaux, les taux de croissance microbienne diminuent (Rosso *et al.*, 1995). Le rôle initial des bactéries lactiques, le groupe bactérien dominant des laits fermentés par des microorganismes endogènes, est d'abaisser le pH via la conversion du lactose présent dans le lait en acide lactique. La réduction du pH à moins de 4,6 permet de sélectionner les microorganismes qui tolèrent les acides et peuvent survivre dans ces conditions. Par conséquent, ceci inhibe la croissance de certains microorganismes non favorables comme les pathogènes et les bactéries d'altération. Il a été démontré que *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli* étaient inhibés par l'action de l'acide lactique (Conner *et al.*, 1990; Bachrouri *et al.*, 2002).

II.4.2 Le taux de sel

Le sel a d'abord été ajouté aux matrices alimentaires pour prévenir leur détérioration en créant un environnement non favorable pour les agents pathogènes ou d'altération et en favorisant la croissance de microorganismes désirables (Henney *et al.*, 2010). Lorsqu'il est ajouté au lait fermenté, le sel réduit l'activité de l'eau, qui représente la quantité d'eau non liée disponible pour la croissance microbienne et les réactions chimiques. Les valeurs théoriques de l'activité de l'eau varient entre 0 (le milieu est totalement sec) et 1 (l'eau pure). En dessous de 0,91, la plupart des bactéries ont du mal à se développer (Desmasures and Beuvier, 2011). L'ajout de sel peut engendrer un choc osmotique au niveau des cellules microbiennes, entraînant la perte d'eau de la cellule et provoquant ainsi la mort cellulaire ou un retard de croissance (Davidson *et al.*, 2012). D'autre part, l'ajout de sel aux laits fermentés favorise la croissance des bactéries lactiques tout en inhibant la croissance

d'autres bactéries et champignons pouvant être des microorganismes d'altération (Henney *et al.*, 2010). Les taux de sel détectés dans le labneh Ambaris varient entre 0.5 et 11 % selon le stade de fabrication et le producteur. Les teneurs élevées régissent certainement la nature et la diversité des communautés microbiennes présentes dans le produit (Abi Khalil *et al.*, 2023).

II.4.3 L'activité de l'eau

Comme dit précédemment, la quantité d'eau disponible pour le développement microbien est un élément essentiel qui régit la constitution des communautés microbiennes d'un produit. Cette activité de l'eau va dépendre de la composition du milieu et notamment des constituants biochimiques qui interagissent avec ces molécules d'eau (Berg and Bruin, 1981) comme par exemple les protéines et le sel que l'on retrouve dans le labneh Ambaris.

Le labneh Ambaris est un lait fermenté égoutté. Au démarrage de la fabrication, le milieu est liquide, puis se gélifie, et enfin devient solide après des drainages successifs de lactosérum. L'humidité du produit et notamment l'humidité du fromage dégraissé est liée à l'activité de l'eau du produit. Pour ce produit, l'humidité décroît durant la production pour atteindre en fin de production des teneurs qui avoisinent les 50 g/100g dans le produit en fin de fermentation (Ayoub *et al.*, 2022). Une autre étude faite par Dimassi *et al.*, (2020a) sur 102 échantillons de labneh Ambaris a montré que les valeurs d'activité de l'eau varient entre 0,95 et 0,96. A ces valeurs-là, certaines communautés microbiennes comme le genre *Pseudomonas* par exemple, sont inhibées (Lebert *et al.*, 1998; Palleroni, 2005). Concernant les bactéries lactiques et les levures, la croissance peut être ralentie mais ces communautés sont retrouvées vivantes et en abondance dans les fromages affinés (Montel *et al.*, 2014; Penland *et al.*, 2021).

Ainsi, en combinant seulement les trois paramètres décrits : pH, teneurs en sel et activité de l'eau, la pression de sélection des communautés microbiennes dans la fabrication du labneh Ambaris est importante, ce qui explique la dominance des lactobacilles et des levures dans ce produit (Abiad *et al.*, 2022; Ayoub *et al.*, 2022).

II.5 Les interactions microbiennes au cœur de la structuration des communautés

Les évolutions et la structuration des communautés microbiennes complexes au sein de matrices laitières sont le siège d'interactions positives, négatives ou neutres (Sieuwerts, 2016). Dans le cas du kéfir de lait, *Lactobacillus kefiranofaciens*, incapable de croitre seule dans le lait mais dominante au sein de la communauté est présente grâce à des interactions avec huit autres espèces (Blasche *et al.*, 2021). La structuration des communautés dépend également de la matrice. En effet, pour le kéfir de lait, par exemple, les interactions entre espèces sont plutôt positives dans la partie liquide, mais des compétitions prédominent ausein du grain. Ces interactions sont déterminantes dans la colonisation spatiale et temporelle des espèces co-habitantes au sein de ce lait fermenté, et conduisent probablement au maintien d'une communauté stable et résiliente (Blasche *et al.*, 2021). Ces interactions sontla plupart du temps associées, dans le cas d'interactions positives, à la mise à disposition de métabolites par certaines espèces microbiennes qui vont servir de nutriments pour d'autres espèces comme par exemple les acides aminés, les lactates, l'éthanol et le glucose (Prado *et al.*, 2015; Sindi *et al.*, 2020). Les facteurs abiotiques, comme la concentration en oxygène, le pH et la température, vont influer également sur lastructuration des communautés microbiennes. La formation du grain de kéfir est une bonneillustration de ces phénomènes. Les levures fermentent le lactose et produisent des acides aminés ainsi que de la vitamine B6. Ces métabolites activent les bactéries lactiques (principalement les lactobacilles) qui vont produire des exopolysaccharides (EPS) et des capsules de polysaccharides (Demirhan *et al.*, 2013; Stadie *et al.*, 2013). Les bactéries lactiques activées mettent à disposition des nutriments et de l'énergie pour la croissance des levures et des bactéries acétiques (Dong *et al.*, 2018). Ces phénomènes de coopérationpermettant l'obtention des grains de kéfir sont illustrés et proposés par Dong *et al.*, (2018) dans la Figure 9 ci-dessous. L'organisation spatiale des espèces microbiennes est également intéressante dans le cas des grains de kéfir, chaque communauté trouvant une niche favorable à sa survie et sa croissance. Wang *et al.*, (2012), en examinant une sectiond'un grain de kéfir, ont montré que les lactocoques et une faible densité de levures constituaient la couche externe, tandis que la couche interne contenait les lactobacilles et une plus grande quantité de

cellules de levure. Selon ces auteurs, *L. kefiranofaciens* avec une espèce de *Saccharomyces* commencent à former des petits granules en s'agrégeant ensemble, et ceci est davantage renforcé quand le pH du milieu baisse. Ensuite, des bactéries et levures productrices de biofilms (*L. kefiri*, *K. marxianus* ainsi que *P. kudriavzevii*) adhèrent à la surface des petits granules formés et ainsi, les lactobacilles et les levures présentes dans le kéfir continuent à s'agréger sur ces granules jusqu'à former les petits grains.

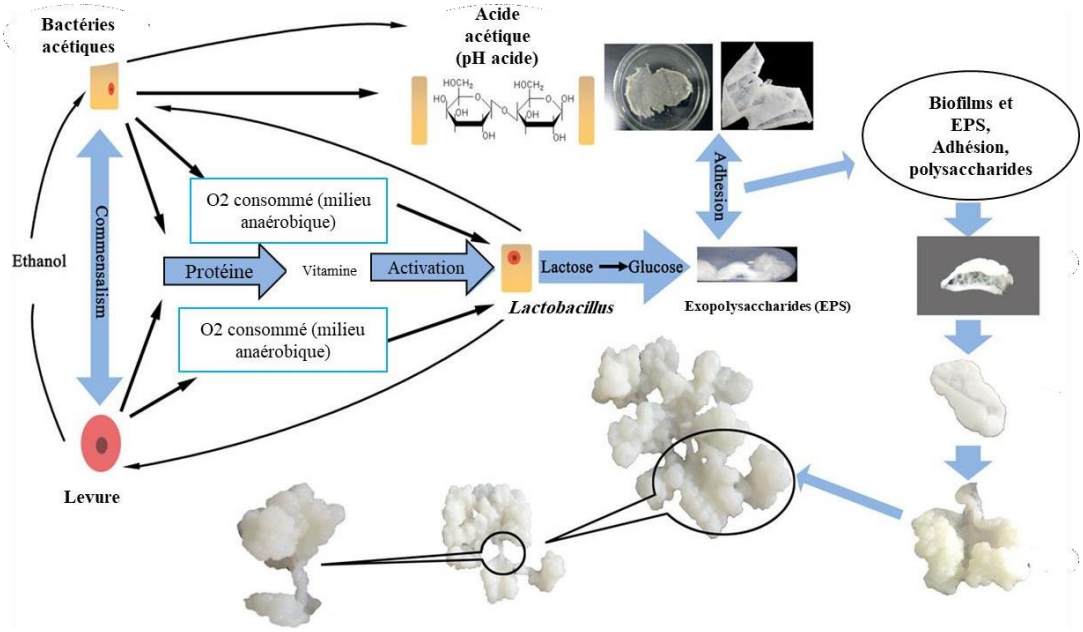


Figure 9. Processus et mécanisme de formation des grains de kéfir tibétain.
(Dong *et al.*, 2018)

II.6 Les méthodes de détection et d'identification des communautés microbiennes

La détection, l'identification et la quantification des communautés microbiennes dans les laits fermentés permettent notamment: a) d'étudier la présence, l'abondance et la distribution des microorganismes dans les matrices laitières, b) de contrôler les qualités sanitaires d'un produit (c'est-à-dire la présence de microorganismes pathogènes), c) d'améliorer les procédés technologiques par le suivi des populations d'intérêts technologiques ou les microorganismes bénéfiques pour la santé. La composition microbienne des laits fermentés peut être décrite quantitativement et qualitativement à

l'aide d'une variété de techniques basées sur divers principes de microscopie, de biochimie analytique et enzymatique, et de biologie moléculaire (Quigley *et al.*, 2011). Selon qu'une étape culturale est requise ou non, les techniques de détection et d'identification sont réparties en deux grandes classes de méthodes (Figure 10): les méthodes culture-dépendantes et les méthodes culture-indépendantes. En fait, une étape de culture sur des milieux nutritifs ou plus ou moins sélectifs peut être nécessaire pour pouvoir isoler et obtenir l'espèce avant de l'identifier. L'application parallèle des méthodes culture-dépendantes et méthodes culture-indépendantes montre de plus en plus l'efficacité et la complémentarité de ces deux approches puisque chacune fournit des informations différentes (Quigley *et al.*, 2011). Le choix de la méthode utilisée dépend des plateformes technologiques disponibles, des populations microbiennes spécifiques à identifier, de la complexité des échantillons, de la rapidité de réponse requise, de la charge microbienne attendue, et surtout des objectifs à atteindre.

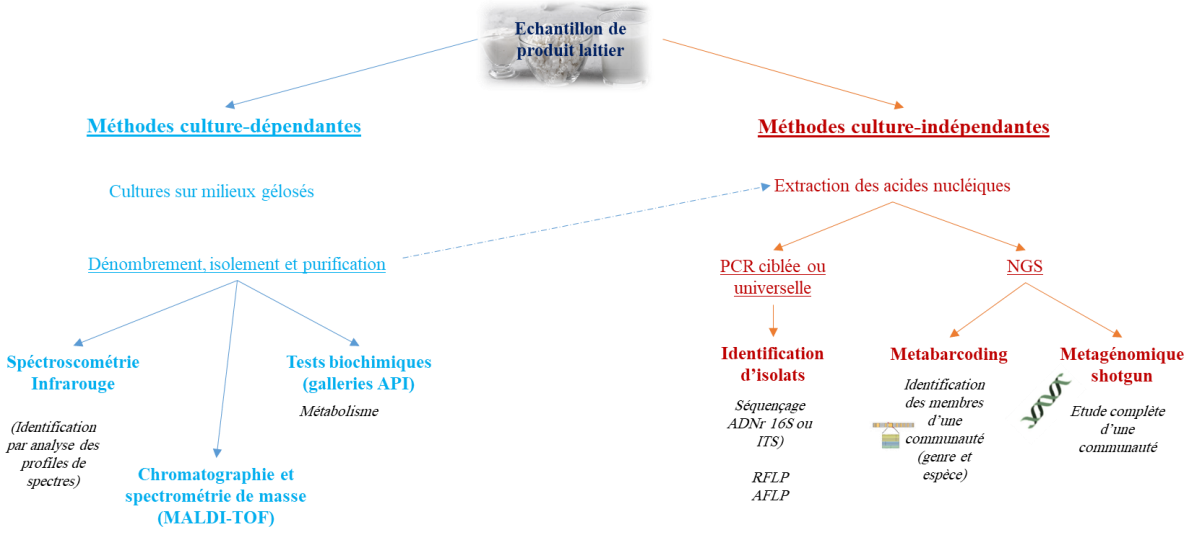


Figure 10. Organigramme des méthodes culture-dépendantes et indépendantes utilisées pour identifier les espèces microbiennes dans les produits laitiers. D'après (Ndoye *et al.*, 2011; Quigley *et al.*, 2011; Yap *et al.*, 2022).

II.6.1 Les méthodes culture-dépendantes

Pour identifier et étudier les populations microbiennes, des méthodes microbiologiques culture-dépendantes sont traditionnellement utilisées, connues pour être les méthodes références (Jasson *et al.*, 2010). Ces méthodes utilisent des milieux de croissance sélectifs et nutritifs pour compter et par la suite isoler les microorganismes.

II.6.1.1 Identification par méthodes biochimiques et spectrales

Après isolement et conservation des microorganismes purifiés, des analyses traditionnelles biochimiques sont d'habitude utilisées qui permettent l'identification au rang du genre ou même de l'espèce et aussi de connaitre certaines propriétés technologiques et métaboliques (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). Ces méthodes nécessitent généralement des réactions avec différents substrats chimiques. Les galeries API (Analytical Profile Index), appelées aussi galeries de tests biochimiques miniaturisés, sont un exemple de réactions communément utilisées en microbiologie pour l'identification de l'espèce. En effet, ces tests se basent sur le résultat positif ou négatif d'une réaction enzymatique avec un nombre de substrats comme les sucres, les peptides ou les acides carboxyliques. Les galeries API ont été largement utilisées pour l'identification d'isolats provenant de laits fermentés traditionnels comme les bactéries et les levures d'un lait fermenté kenyan (Nyambane *et al.*, 2014), les bactéries lactiques de certains laits fermentés indigènes africains (Beukes *et al.*, 2001), tunisiens (Fguiri *et al.*, 2016) et celles du laban Zeer, un lait fermenté traditionnel égyptien (Saleh, 2013). L'identification des espèces bactériennes et fongiques par cette technique présente des inconvénients. Ces galeries sont conçues pour un nombre limité de microorganismes dont les propriétés sont connues dans la littérature. De plus, des contradictions de résultats ont été démontrées. En utilisant différentes galeries API pour identifier les mêmes isolats de bactéries Gram négatives, 20% des identifications n'étaient pas conformes entre les galeries (Reynaud *et al.*, 1988).

Le comportement du microorganisme cible dans des conditions définies comme par exemple le pH et le taux de sel peut être également étudié. Ceci permet d'obtenir une liste des capacités métaboliques du microorganisme et par la suite de les comparer à des bases

de données afin de l'identifier (Franco-Duarte *et al.*, 2019). Enfin, d'autres techniques utilisant des méthodes spectrales permettent d'identifier les espèces microbiennes. La technique MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time Of Flight) couplée à la spectrométrie de masse (Franco-Duarte *et al.*, 2019) est la méthode la plus utilisée dans le domaine de la médecine pour l'identification des pathogènes et elle est de plus en plus utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire. Cette méthode a été largement utilisée pour l'identification de bactéries lactiques provenant de fromages artisanaux grec (Gantzias *et al.*, 2020), d'autres provenant de yaourts turcs (Karaduman *et al.*, 2017) et récemment des bactéries ainsi que des levures provenant du fromage AOP Pélardon et de son environnement laitier (Penland *et al.*, 2021). Les analyses étant réalisées directement sur les cultures cellulaires, la technique nécessite uniquement l'utilisation d'un spectromètre et présente l'avantage d'être peu coûteuse et non destructive. Les cultures pourraient ainsi être utilisées pour d'autres analyses.

La spectrométrie proche infrarouge peut être utilisée pour l'identification des microorganismes isolés (Dziuba and Nalepa, 2012; Levasseur-Garcia *et al.*, 2017). Cette technologie a récemment été utilisée sur isolats bactériens pour l'identification de bactéries lactiques et a donné des résultats encourageants en termes de classification au niveau du genre voire de l'espèce bactérienne. Treguier *et al.*, (2019) ont réussi à différencier des espèces appartenant aux genres *Lactococcus* (*L. lactis)* et *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium* et *E. durans*), communément retrouvées dans les produits laitiers. Cette technique repose sur l'interaction entre un rayonnement électromagnétique et les molécules qui composent la paroi cellulaire du microorganisme ciblé. Lorsqu'une source de lumière est dirigée vers une culture microbienne, une partie du rayonnement est réfléchie mais la majorité la traverse et peut être absorbée ou transmise. En utilisant un spectromètre contenant un détecteur, il est alors possible de mesurer cette énergie transmise, absorbée ou réfléchie en fonction de la longueur d'onde d'excitation des molécules composant la paroi cellulaire du microorganisme ciblé (Treguier *et al.*, 2019).

II.6.1.2 Identification par méthodes de biologie moléculaire

Afin de détecter et d'identifier les microorganismes, une variété d'outils et de techniques ont été mises à disposition avec le début de "l'ère de la biologie moléculaire" (Spratt, 2004).

Avant, l'identification des microorganismes se faisait en majorité par des méthodes phénotypiques et biochimiques. Même si ces méthodes sont toujours utilisées, les techniques reposant sur la biologie moléculaire, basées sur une analyse de l'ADN soit par amplification soit par séquençage, ont fourni de nouvelles informations sur l'identification des microorganismes (Höfling *et al.*, 1997). Ces méthodes sont soit des approches relativement simples basées sur l'amplification de l'ADN (exemple : la PCR), soit des méthodes plus complexes basées sur l'analyse des fragments de restriction, le gène ciblé etle séquençage du génome entier.

La PCR (polymerase chain reaction), décrite pour la première fois par Kary Mullis dans les années 1980s, est une technique *in vitro* cyclique en trois étapes basée sur la capacité d'une enzyme, l'ADN polymérase, à copier un brin d'ADN spécifié par le choix des amorces (Mullis and Faloona, 1987). La capacité d'amplifier l'acide nucléique à partir d'une concentration de départ relativement faible, fait de la PCR l'une des techniques les plus sensibles disponibles pour l'identification des microorganismes. La méthode standard implique l'amplification par PCR du gène cible suivie d'un séquençage (Sanger *et al.*, 1977), et d'une comparaison des séquences avec des bases de données connues pour l'identification du microorganisme (Fouad *et al.*, 2002). Les gènes cibles les plus adoptés pour l'identification des champignons sont les gènes qui codent les ARNr 18S, 5.8S et 28S en plus des espaceurs internes transcrits ITS1 et ITS2 (Chen *et al.*, 2000). Le gène cible idéal et le plus couramment utilisé pour l'identification des bactéries est l'ADNr 16S, hautement spécifique à chaque espèce bactérienne. Des bactéries lactiques isolées de différents laits fermentés ont été identifiées avec succès par amplification de régions de ce gène (Kesmen and Kacmaz, 2011; Yu *et al.*, 2011; Ao *et al.*, 2012). Pourtant, des bactéries très proches génétiquement sont difficiles à être discriminées en se basant sur le gène qui code l'ARNr 16S, et en blastant les séquences obtenues sur les bases de données, plusieurs options d'espèces peuvent sortir (donc nous obtenons des espèces multi-affiliées). Des études ont démontré que les divergences entre les séquences *rpoB* (qui code pour la sous-unité Beta de l'ARN polymérase) de différentes espèces étaient sensiblement plus élevées que celles entre leurs gènes d'ARNr 16S. Ce pouvoir discriminant supérieur propose que le gène *rpoB* puisse être utilisé pour l'identification des isolats bactériens génétiquement proches (Mollet *et al.*, 1997; Shevtsov *et al.*, 2011). Après amplification du gène cible

choisi, les produits PCR sont séquencés. Même si c'est la méthode la plus utilisée, le séquençage Sanger présente plusieurs inconvénients importants, notamment son coût élevé et la nécessité d'une quantité importante d'ADN (Fournier and Raoult, 2010).

D'autres techniques basées sur la digestion enzymatique des fragments d'ADN sont aussi utilisées et ont montré leur efficacité dans l'identification des isolats. La méthode RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism et la méthode AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism en sont les exemples les plus courants (Franco-Duarte *et al.,* 2019). Bien que ces méthodes culture-dépendantes soient utiles pour détecter les microorganismes viables et cultivables à un moment précis dans l'échantillon, ainsi que pour conserver les matériaux microbiens pour des applications ultérieures, il s'est avéré que ces approches ont des capacités limitées pour détecter les espèces rares et difficiles à cultiver (Yeluri Jonnala et al., 2018 ; Penland et al., 2021). En effet, il est difficile de simuler les conditions de l'habitat naturel essentielles à la croissance de microorganismes exigeants. De ce fait, les microorganismes environnementaux sont en majorité incultivables, donc une approche culture-dépendante sous-estime toujours la diversité microbienne et échoue parfois à détecter certains groupes microbiens (Zhong *et al.*, 2016). Bien qu'elles soient peu coûteuses comparées aux méthodes cultures-indépendantes et fournissent des informations quantitatives et qualitatives sur la diversité des microorganismes présents dans un échantillon, ces techniques sont laborieuses. Les résultats sont souvent observés après plusieurs jours et des résultats faussement positifs sont fréquemment obtenus, en particulier lorsque des espèces microbiennes similaires sont prises en compte (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

II.6.2 Les méthodes culture-indépendantes : les approches –omiques

La diversité microbienne et la composition des aliments fermentés ont été largement étudiées au cours des dernières décennies en utilisant une variété de techniques basées sur l'identification de l'ADN de toute la communauté microbienne sans isoler chacun des individus (Giraffa and Neviani, 2001; Jany and Barbier, 2008). L'étape d'extraction de l'ADN, la qualité et la quantité d'ADN purifié, sont importantes et déterminent les résultats d'identification et de quantification par ces techniques cultures-indépendantes. Ces

techniques ont l'avantage de permettre la détection et l'identification des microorganismes viables et non viables au sein de matrices complexes telles que les laits crus et fermentés.

Le séquençage à haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) a bien évolué au cours de la dernière décennie et de nouvelles méthodes sont continuellement commercialisées. Ces méthodes fournissent des informations plus approfondies sur les espèces dominantes et rares, ce qui donne une vision plus globale de la communauté microbienne totale dans la matrice alimentaire (Yeluri Jonnala *et al.*, 2018; Penland *et al.*, 2021; Zago *et al.*, 2021).

Le métabarcoding, également connu sous le nom de métagénétique, parfois, métagénomique 16S pour les bactéries et ITS pour les champignons est une approche moléculaire ciblée qui nécessite l'amplification de gènes marqueurs à partir d'ADN génomique total de la matrice initiale par PCR, suivie d'un séquençage direct et d'un alignement sur une base de données de référence pour identifier la composition taxonomique des communautés microbiennes entières (Franzosa *et al.*, 2015). Le gène de l'ARNr 16S est le plus fréquemment utilisé dans l'identification des bactéries, car on le trouve universellement dans les bactéries, et le gène contient neuf régions hypervariables, dont certaines ou toutes peuvent être ciblées par amplification (Yap *et al.*, 2022). Cette technique moléculaire ciblée est la plus utilisée pour la détermination de la composition globale des communautés complexes telles que dans les laits fermentés ou les laits crus. Les régions V1-V3 ou V3-V4 sont les plus couramment ciblées pour la détection des microorganismes procaryotes (Quigley *et al.*, 2011; Yap *et al.*, 2022). Concernant les populations de levures et moisissures, ces dernières peuvent être identifiées en ciblant les régions de l'ADNr 18S, 26S ou 28S et, plus fréquemment, des régions ITS1 et ITS2 des espaceurs internes transcrits (Delavenne *et al.*, 2011; Banjara *et al.*, 2015). Suite au séquençage metabarcoding, des OTUs (Operational Taxonomic Units) ou des ASVs (Amplicon Sequencing Variants) étant des clusters de séquences hautement similaires (jusqu'à 100% d'identité pour les ASVs) représentant chacun un taxon identifié au sein de la communauté étudiée sont obtenus (Ercolini, 2013). L'alignement des séquences de ces clusters (OTUs ou ASVs) contre des bases de données définies comme SILVA pour les bactéries et UNITE pour les levures et moisissures permet leur affiliation à un taxon: en majorité jusqu'au rang du genre et assez fréquemment aussi au rang de l'espèce. La

précision et la fiabilité de l'affiliation dépendent alors de l'agrégation et de la mise à jour régulière des bases de données. Certaines bases de données sont spécialisées et adaptées pour l'identification des microorganismes normalement rencontrés dans les échantillons étudiés (de Almeida Brasiel *et al.*, 2021). DAIRYdb est une base de données organisée manuellement et mise à jour régulièrement, actuellement la version V2.1 est disponible depuis Avril 2022, qui regroupe les annotations taxonomiques des séquences du gène qui code l'ARNr 16S provenant de produits laitiers (Meola *et al.*, 2019). Plusieurs pipelines disponibles peuvent être utilisés comme outils d'analyses pour le traitement des données du séquençage metabarcoding. Le pipeline FROGS (Find Rapidly OTUs with Galaxy Solution), développé par Escudié *et al.*, (2018) en est un exemple. C'est un outil rapide, hautement sensible qui ne requiert pas énormément de connaissances préalables de bio-informatique, donc user-friendly. D'autres pipelines sont aussi utilisés comme DADA2 (Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2) du programme R (Callahan *et al.*, 2016) et QIIME2 (Bolyen *et al.*, 2019). De nombreuses études ont utilisé le metabarcoding pour caractériser et identifier les populations microbiennes dans les laits fermentés (Korsak *et al.*, 2015; Groenenboom *et al.*, 2020; de Almeida Brasiel *et al.*, 2021; Kazou *et al.*, 2021). Bien que le métabarcoding soit une technique émergente et utilisée pour l'identification des communautés microbiennes, son point négatif le plus fort est qu'elle permet l'amplificationde l'ADN mort et vivant dans la matrice (Pochon *et al.*, 2017).

La technique métagénomique shotgun, connue comme métagénomique, consiste à analyser l'intégralité de l'ADN extrait d'une communauté microbienne mixte d'un échantillon sans étape préalable d'amplification ciblée (Quince *et al.*, 2017). Cette méthode nécessite la fragmentation de l'ADN, puis une étape de préparation d'une bibliothèque qui est par la suite séquencée. Les données résultantes fournissent des informations sur la taxonomie et les propriétés fonctionnelles de l'ensemble de la communauté microbienne étudiée. Un avantage important de la métagénomique shotgun est le potentiel de récupération des génomes assemblés par métagénome (MAG), qui révèlent les propriétés fonctionnelles et permettent l'étude de la diversité au niveau des souches chez les espèces microbiennes intéressantes liées à la production alimentaire comme les bactéries lactiques (Pasolli *et al.*, 2020). Cette technique a notamment été utilisée pour l'analyse de la diversité d'échantillons de labneh démontrée dans une communication affichée (Ammoun *et al.*,

2021).

II.7 Etude de la diversité microbienne au sein d'un écosystème

La diversité microbienne est définie comme la quantité de variation (pouvant être morphologique, fonctionnelle, et génétique) dans les populations microbiennes qui occupent un environnement donné (Gentry *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2017a). Une multitude d'indices pour mesurer la diversité sont couramment utilisés (Figure 11). Ces mesures se basent sur le nombre (richesse) des différentes espèces, la répartition et l'identité (composition) dans un ou plusieurs échantillons. On distingue les indices de diversité α étant basés sur les mesures de richesse et ou de répartition des microorganismes au sein d'une même communauté et les indices de diversité β représentant la variation retrouvée entre les communautés (Gentry *et al.*, 2015).

II.7.1 Les indices de diversité α

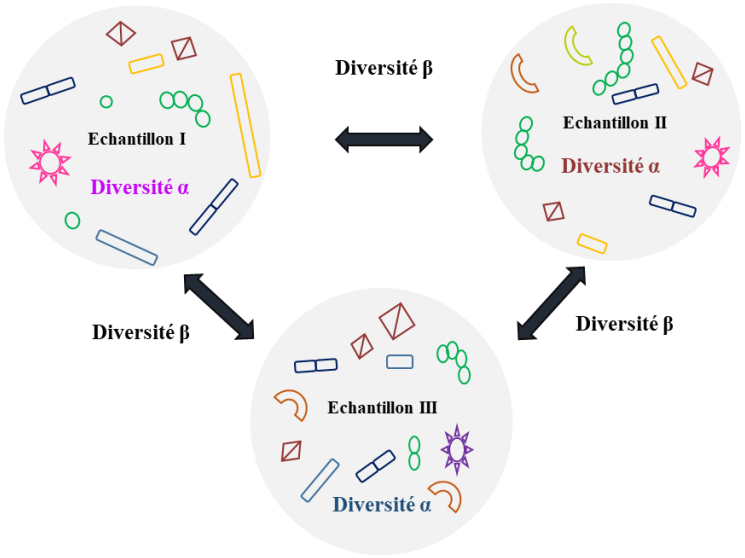


Figure 11. Indices de diversité alpha α et beta β au sein des échantillons de produits laitiers. D'après (Iknayan *et al.*, 2014; Du and Alemseged, 2018).

Ce sont la richesse et l'abondance qui sont principalement pris en compte pour mesurer la diversité dans un écosystème. La richesse est la mesure du nombre des différentes espèces retrouvées. Si plus d'espèces sont présentes dans l'échantillon "A" que l'échantillon "B", alors "A" est plus riche que "B". L'indice de richesse ne prend pas en compte l'abondance de chaque espèce. Cependant, la diversité dépend aussi de la répartition des espèces. Celle-ci compare l'uniformité de la distribution de la population de chacune des espèces présentes, donc la répartition donne l'abondance relative des différentes espèces dans une communauté (Kim *et al.*, 2017a). Les indices de diversité α les plus utilisés, à part la simple diversité observée, sont Shannon et Simpson. L'indice Shannon (appelé aussi Shannon-Weaver et codé par *H*) mesure le degré moyen d'incertitude dans la prédiction de l'espèce à laquelle appartiendra un individu choisi au hasard parmi une collection de X espèces et de Y individus. La valeur de cet indice augmente quand le nombre d'espèces augmente et que la répartition des individus parmi les espèces devient uniforme (Ludwig and Reynolds, 1988). Dans la formule de l'indice de Shannon (H), *p* indique la proportion (n/N) d'individus d'une espèce particulière (n) divisé par le nombre total d'individus (N), ln est le logarithme, Σ est la somme des calculs, et s est le nombre d'espèces (Ritchie, 1986).

$$\text{Shannon Index (H)} = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln p_i$$

Concernant l'indice Simpson, codé par *D*, il reflète la probabilité que deux individus choisis au hasard appartiennent à la même espèce. Il met en relief la dominance des espèces dans un échantillon et augmente lorsque la diversité diminue (Simpson, 1949). Les lettres indiquées dans la formule de l'indice Simpson, réfèrent aux mêmes constituants que ceux de la formule de l'indice Shannon.

$$\text{Simpson Index (D)} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{s} p_i^{\,2}}$$

II.7.2 Les indices de diversité β

L'indice Bray-Curtis et l'indice Jaccard sont les plus couramment utilisés pour évaluer la similarité ou la dissimilarité entre les compositions microbiennes des communautés (Hao *et al.*, 2019). L'indice Bray-Curtis prend en compte l'abondance relative des espèces entre les communautés alors que l'indice Jaccard est un indice qui représente la présence/absence d'une espèce entre les communautés (Schroeder and Jenkins, 2018; Bag *et al.*, 2019). Dans la formule de l'indice de Bray-Curtis, les lettres C_{ij} indiquent le nombre total d'espèces partagées par les deux écosystèmes, S_i le nombre total d'espèces dans l'écosystème 1 et S_j est le nombre total d'espèces dans l'écosystème 2 (Hao *et al.*, 2019). Dans la formule de l'indice Jaccard ci-dessous, la lettre A représente le nombre d'espèces partagées par deux écosystèmes, B et C sont le nombre d'espèces uniques à chacun des deux écosystèmes (Hao *et al.*, 2019).

$$\text{Bray-Curtis index} = 1 - \frac{(2\ C_{ij})}{(S_i + S_j)}$$

$$\text{Jaccard index} = 1 - \frac{A}{(A+B+C)}$$

.

Objectifs et démarche expérimentale

Cette thèse vise à étudier un lait fermenté par des microorganismes endogènes typique de certaines régions rurales libanaises : le labneh Ambaris. Très peu d'études scientifiques, à notre connaissance, sont disponibles dans la littérature décrivant ce produit. Le premier volet de ces travaux de thèse avait pour objectif de caractériser le produit en prenant en compte ses variations de production (laits crus, laits pasteurisés, contenants en terre cuite, plastique et acier inoxydable). Pour cela, 20 échantillons de labneh Ambaris ont été collectés en fin de l'étape de maturation chez 17 producteurs ayant des pratiques différentes. Ces échantillons ont fait l'objet d'analyses physicochimiques et sensorielles. Les communautés microbiennes qui les constituent ont été caractérisées par des méthodes culture- dépendantes et par métabarcoding.

Il est largement décrit dans la littérature scientifique que les produits laitiers traditionnels au lait cru doivent leurs caractéristiques typiques à leurs communautés microbiennes et que la pasteurisation du lait résulte en des produits laitiers ayant des diversités microbiennes plus faibles. Ainsi, nous avons exploré l'impact de la pasteurisation du lait sur les populations microbiennes du labneh Ambaris. Les compositions microbiennes de six échantillons produits à partir de laits crus et de six autres à partir de laits pasteurisés ont été étudiées et comparées par metabarcoding. Ces 12 échantillons ont été collectés durant l'étape 2 du procédé de fabrication. La troisième partie de ces travaux avait pour objectifs d'étudier les évolutions des paramètres physicochimiques et des communautés microbiennes tout au long du procédé de fabrication ainsi que l'éventuelle contribution de la flore résiduelle de la jarre en terre cuite sur le produit. Pour ceci, un producteur parmi les 17 de la première campagne d'échantillonnage a été sélectionné chez lequel deux productions ont été suivies en parallèle dans deux jarres en terre cuite différentes. La première jarre dite « ancienne » a déjà été utilisée durant les saisons précédentes pour la production de labneh Ambaris et l'autre dite « nouvelle » qui ne l'a jamais été. Des échantillons de laits crus et de laits fermentés ont été collectés dans les deux jarres tout au long de la production. Des analyses microbiologiques culture-dépendantes et indépendantes, des analyses physicochimiques et une analyse sensorielle discriminative

ont été réalisées.

La démarche expérimentale générale est illustrée dans les Figures 12 et 13 ci-dessous.

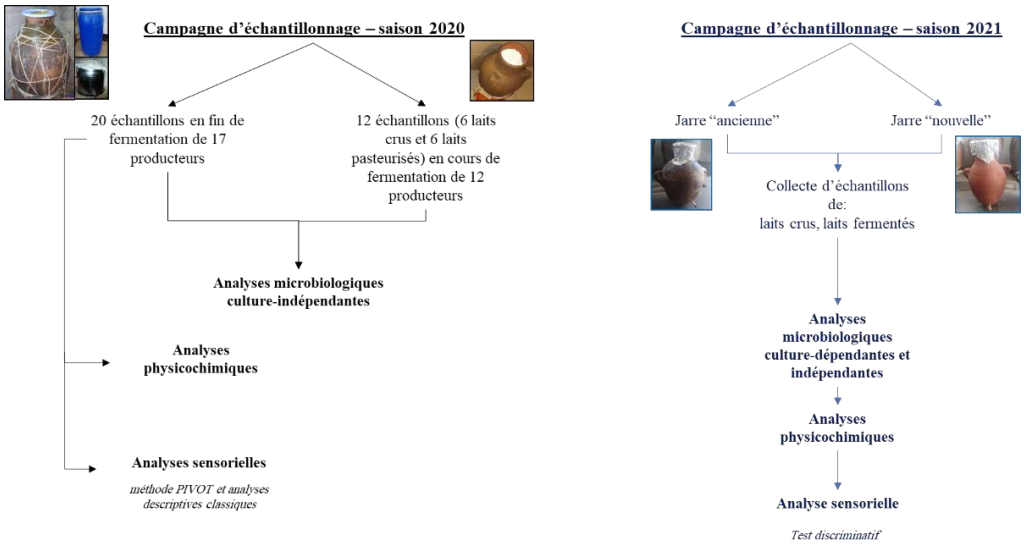


Figure 12. Démarche expérimentale générale pour répondre aux objectifs de la thèse.

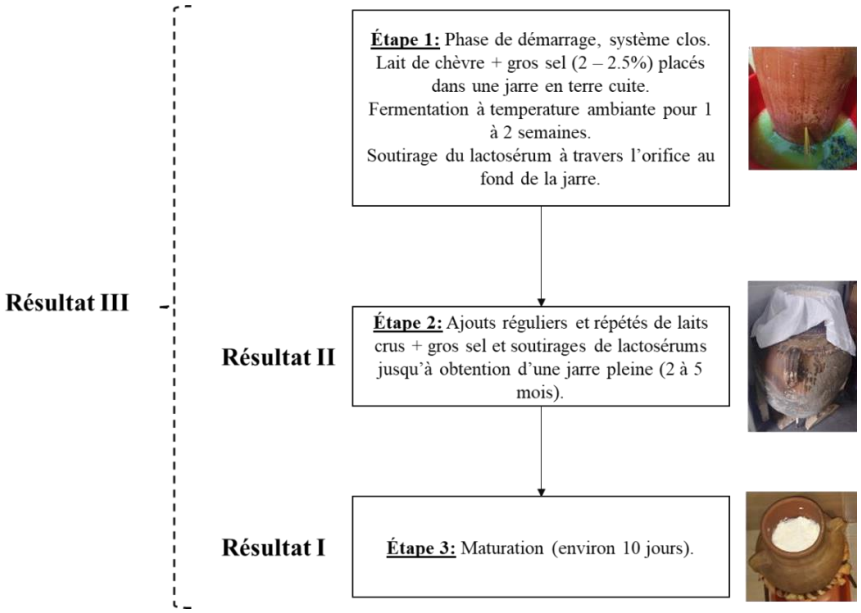


Figure 13. Etapes du procédé concernées en lien avec les chapitres I, II et III des résultats.

Résultats

Résultat I

Caractérisation du labneh Ambaris sur les plans physicochimique, microbiologique et sensoriel.

Reine Abi Khalil, Sophie Yvon, Christel Couderc, Loubnah Belahcen, Gwenaelle Jard, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Hélène Tormo*, et Marie-José Ayoub*.

* *Ces auteurs ont participé à part égale à ce travail.*

Publié dans *« Journal of Dairy Science ».* DOI:https://doi.org/10.3168/jds.2022-22275

Contexte et Objectifs : le labneh Ambaris est un produit laitier traditionnel, typique de certaines régions rurales du Liban. Il est traditionnellement fabriqué à partir du lait cru de chèvre et de gros sel dans des jarres en terre cuite. De nos jours, ce produit laitier est peu à peu abandonné par les producteurs et les consommateurs. Ceci est principalement le résultat des vagues d'urbanisation ainsi que les demandes des consommateurs pour des produits alimentaires « safe ». Dans la perspective de contribuer à sa protection en tant qu'héritage culinaire, cette étude vise à fournir les caractéristiques du labneh Ambaris libanais. Ces résultats peuvent être considérés comme une base vers l'initialisation du processus d'obtention d'un label de qualité/protection pour le labneh Ambaris en tant que produit alimentaire culturel durable à préserver.

Démarche expérimentale : Vingt échantillons de labneh Ambaris en fin de fermentation provenant de chez 17 producteurs de différentes régions du Liban, tous produits par fermentation spontanée, ont été collectés durant la saison de production de 2020. Parmi ces échantillons, se trouvent des labneh Ambaris authentiques (lait cru de chèvre dans la terre cuite), ainsi que des variantes émergentes (lait pasteurisé, contenants en acier inoxydable ou plastique). Les propriétés physicochimiques de base ont été définies. Une description sensorielle a été établie en s'appuyant d'abord sur la méthode Pivot. Cela a permi de créer

un lexique sensoriel qui a ensuite été utilisé pour l'analyse descriptive classique. De plus, la diversité microbienne des bactéries ainsi que des levures/moisissures a été analysée à l'aide de techniques culture-dépendantes (dénombrements sur milieux de culture) et indépendantes (métabarcoding). La région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S et la région ITS2 ont été séquencées par des analyses de métabarcoding pour l'identification des communautés de bactéries et de levures/moisissures respectivement.

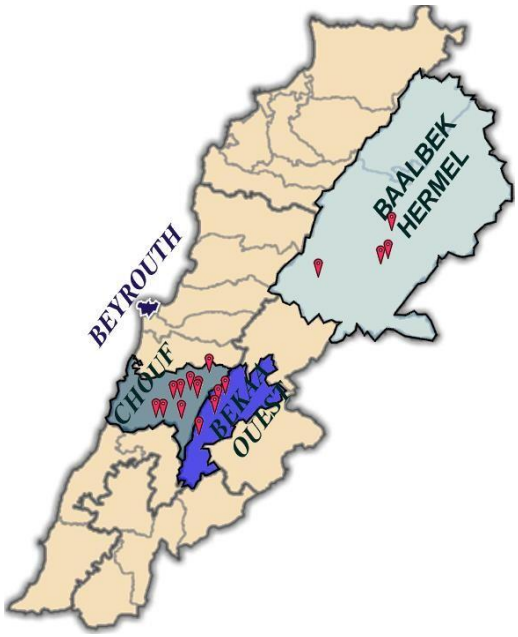


Figure 14. Carte du Liban montrant les régions desquelles les échantillons en fin de fermentation de la campagne de 2020 ont été collectés. Les 17 producteurs sont référés sur la carte par des points rouges.

Résultats : Le labneh Ambaris possède une acidité élevée avec des pH qui varient entre 2,9 et 4,1 unités, des teneurs en sel importantes (minimum 0,5% et maximum 11%) ainsi qu'une texture semblable à celle d'un fromage à pâte molle. Ce produit traditionnel héberge une grande diversité de microorganismes. Concernant les bactéries, les lactobacilles sont les genres les plus dominants dans la totalité des échantillons. Les espèces microbiennes dominantes se sont avérées être *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus sp.* et *Lactococcus lactis* pour les bactéries et *Geotrichum candidum*, *Pichia kudriavzevii* et *Kluyveromyces marxianus* pour les levures.

Conclusions et perspectives : De fortes variabilités ont été enregistrées concernant les compositions microbiologiques, les aspects physico-chimiques et sensoriels. Cela pourrait

s'expliquer par les différentes matières premières utilisées, les processus et l'environnement de production spécifiques au producteur, ainsi que les ustensiles et matériaux utilisés. Ces facteurs pourraient être investigués dans des études ultérieures.

Mots clés: lait cru de chèvre, métabarcoding, diversité microbienne, fermentation spontanée, labneh Ambaris, analyses sensorielles.

J. Dairy Sci. 106
https://doi.org/10.3168/jds.2022-22275
© 2022, The Authors. Published by Elsevier Inc. and Fass Inc. on behalf of the American Dairy Science Association®.
This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Microbial communities and main features of labneh Ambaris, a traditional Lebanese fermented goat milk product

Reine Abi Khalil,[1,2] Sophie Yvon,[2,3] Christel Couderc,[2] Loubnah Belahcen,[2] Gwenaelle Jard,[2] Delphine Sicard,[4] Frédéric Bigey,[4] Rabih El Rammouz,[5] Pierre Abi Nakhoul,[1] Hélène Eutamène,[2,3] Hélène Tormo,[2]*† and Marie-José Ayoub[1]*†

[1]Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon
[2]Departement Sciences de l'Agroalimentaire et de la Nutrition INP-EI Purpan, Université de Toulouse; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse, Cedex 3, France
[3]Toxalim UMR 1331, INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse, Toulouse, 31027 Toulouse, France
[4]SPO, Univ. Montpellier, INRAE, Institut Agro Montpellier, 34060 Montpellier, France
[5]Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon

ABSTRACT

Labneh Ambaris is a traditional Lebanese dairy product typically made using goat milk in special earthenware jars. Its production is characterized by the regular additions of milk and coarse salt, all while draining the whey throughout a process that lasts for a minimum of 2 mo. In this study, 20 samples of labneh Ambaris, all produced by spontaneous fermentation, were studied. They were collected at the end of fermentation from different regions in Lebanon. Physicochemical and sensory properties were studied and microbial diversity was analyzed using culture-dependent and independent techniques. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene and the ITS2 region were sequenced by DNA metabarcoding analyses for the identification of bacteria and yeast communities, respectively. Out of 160 bacterial and 36 fungal taxa, 117 different bacterial species and 24 fungal species were identified among all labneh Ambaris samples studied. The remaining ones were multi-affiliated and could not be identified at the species level. *Lactobacillus* was the dominant bacterial genus, followed by *Lentilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, and *Lactococcus* genera, whereas *Geotrichum* and *Pichia* were the dominant fungal genera. The 20 samples tested had varying levels of salt, protein, and fat contents, but they were all highly acidic (mostly having a pH < 4). According to the sensory scores generated by classical descriptive analysis, all samples were described as having basic similar characteristics such as goat smell and flavor, but they could be differentiated based on various intensities within the same descriptors like salty and acidic. This work could be considered as a base toward obtaining a quality label for labneh Ambaris.

Key words: spontaneous fermentation, raw goat milk, microbial diversity, metabarcoding, sensory analyses

INTRODUCTION

Labneh Ambaris is a traditional Lebanese dairy product that has been made in rural areas for hundreds of years. From a socio-economic point of view, this product is important in its production regions where it represents cultural heritage and allows a significant income to farmers. In Lebanon, goats have always been associated with rural areas, the local "Baladi" breed being the most common (Serhan and Mattar, 2018). The particularity of goat flocks is that they are managed mainly under transhumance and nomadic systems (Srour et al., 2006). Local goat milk and coarse salt are the only ingredients used for the production of labneh Ambaris, where they are placed in special earthenware jars and left to ferment for several days. After coagulation, whey is drained, then milk and coarse salt are again added to the jar and left to ferment. These steps are repeated until the jar is full of coagulum, and the product can be consumed at this point. Labneh Ambaris can be regarded as a fermented milk rather than cheese, as per the definition of fermented milks according to Codex Alimentarius Standard (2018; CXS 243–2003), because of its manufacturing process involving reduction in pH due to fermentation of milk by microorganisms. The repeated additions of milk and salt throughout the fermentation process characterize this product. During this process, the salt quantities added throughout production vary largely between producers, which will affect salt's final concentration and the product's taste

Received May 5, 2022.
Accepted September 4, 2022.
*These authors contributed equally to this paper.
†Corresponding authors: mayoub@ul.edu.lb and helene.tormo@purpan.fr

and physicochemical characteristics, such as texture and moisture content (Møller et al., 2013). Aside from the salting aspect, high acidity characterizes the product as it was shown in other studies where the pH of labneh Ambaris varied between 3.50 and 3.80 (Serhan and Mattar, 2013; Tabet et al., 2019). Salt content and high acidity are known to influence the growth and activities of microorganisms and to participate in the safety of a product by contributing, along with other factors, to the inhibition of pathogenic microorganisms (Arboatti et al., 2014; Bourdichon et al., 2021).

Today, labneh Ambaris is being slowly abandoned by consumers. This is mainly the result of urbanization waves and several consumer lifestyle expectations, such as the consumption of safe food products (Arja et al., 2001; Licitra, 2010). In addition, changes to the traditional production process were applied by some industries and households, either for economical purposes, by the use of nontraditional production containers such as plastic jars, or for safety concerns by the use of pasteurized goat milk (Tabet et al., 2019). From a sustainability point of view, it is essential to characterize labneh Ambaris and contribute to its preservation as a Lebanese cultural heritage because it can be presented as a potential food product to obtain a national quality label, as it was the case recently with Cyprus' Halloumi, recognized as a national dairy product and classified in 2021 as a Protected Designation of Origin cheese by the European Commission (European Commission, 2021).

To our knowledge, limited studies were published concerning labneh Ambaris. Tabet et al. (2019) demonstrated that, beside differences in moisture contents, the physicochemical characteristics (pH, ash, protein, and fat contents) of labneh Ambaris produced in earthenware and plastic jars were not significantly different from each other, whereas Dimassi et al. (2020) showed significant differences in fat, moisture, pH, and protein contents between samples collected from different Lebanese regions. However, none of these studies explored the sensory properties of labneh Ambaris, nor used culture-independent methods for the microbial analyses.

In a more global perspective and to preserve this sustainable food product, the present study aims to provide the first overall characterization of the Lebanese labneh Ambaris, produced by spontaneous fermentations (no starter cultures added). Therefore, different samples, each from a distinct production jar, were collected at the end of fermentation when the product can already be consumed, and the following distinct aspects were studied for the same samples: (1) physicochemical, (2) microbiological by using culture-dependent (viable counts) and culture-independent (DNA metabarcoding for the identification of bacteria and yeasts) approaches, and (3) sensory by using an original approach which combines the Pivot Profile (**PP**) method with classical descriptive analysis.

MATERIALS AND METHODS

Sampling

Twenty labneh Ambaris samples (**LA-1** through **LA-20**) were collected from 17 producers located in 3 different regions in Lebanon. The producers were selected according to their respect for animal welfare. The details of the collected samples as well as the production flowchart are presented in Supplemental Table S1 (https://figshare.com/articles/figure/TableS1/19582057; Abi Khalil, 2022d). All these samples were produced by spontaneous fermentations where no starter cultures were added. Samples were taken directly from the production jars (earthenware, plastic, or stainless steel). Each sample's quantity was divided in halves, the first one was refrigerated at 4°C for sensory and culture-dependent microbiological analyses, whereas the remaining half was frozen at −20°C for DNA metabarcoding and physicochemical analyses.

Physicochemical Analyses

The 20 samples were analyzed by Agrolabs for DM content (%; NF EN ISO 5534–10), fat content (%; NF V04–287), protein content (%; NF EN ISO 8968–3), and salt content (%; NF EN ISO 5943). The percentage of moisture content on a fat-free basis was calculated as mentioned in the General Standard for Cheese (Codex Alimentarius Standard, 2021). Salt-to-moisture ratio was calculated as mentioned by D'Amico et al. (2010). The pH values were recorded in triplicates at room temperature using a calibrated pH meter (HQ11 HD, HACH). Descriptive statistical analyses (mean values, standard deviations, quartiles, and minimum and maximum values) were applied to the collected data using XLSTAT (Addinsoft, 2022).

Microbiological Analyses: Microbial Enumeration and Pathogens Detection

Microbial enumeration was performed on the 20 collected samples. A 10-fold dilution was prepared by homogenizing 10 g of each sample in 90-mL sterile buffered peptone water (Scharlau). Successive 10-fold dilutions were then prepared and plated on nutritive and selective media and incubated with respect to necessary conditions (Table 1). Two values for de Man, Rogosa, and Sharpe agar, and M17 lactose agar were identified

Table 1. List of media used for enumeration along with their respective incubation conditions

Medium	Reference or composition	Targeted microorganism	Incubation condition	Oxygen incubation condition
de Man, Rogosa, and Sharpe agar	HIMEDIA	Mesophilic lactobacilli	30°C for 72 h	Anaerobiosis
M17 with 0.5% lactose	Fluka	Mesophilic lactococci and streptococci	30°C for 72 h	Aerobiosis
Plate count agar	Liofilchem	Mesophilic aerobic total flora	30°C for 72 h	Aerobiosis
Yeast peptone dextrose	1% yeast extract powder (HIMEDIA), 2% glucose (Scharlau), 2% peptone (Scharlau), 2% agar (Liofilchem)	Yeast and molds	25°C for 5 d	Aerobiosis

as outliers by Grubbs statistical test (Velasco et al., 2000) and removed from the analysis. The results were expressed as log cfu/g of sample. In addition, samples were tested in an external laboratory (Microbiological Quality Control Laboratory, Saint Joseph University USJ, Beyrouth) for the presence of the following food pathogens: *Brucella melitensis* (NF U47–105 ISO), *Escherichia coli* (RAPID' E.coli 2 Agar – NF validation according to ISO 16140, AOAC-RI approved N° 050601), *Staphylococcus aureus* (ISO 6888_1–1999) followed by coagulase and DNase confirmation tests, *Listeria monocytogenes* (ISO 11290–1/A1–2004), and *Salmonella* spp. (ISO 6579–2002). In addition, coliform bacteria at 37°C and thermotolerant coliforms at 44°C (ISO 4832–1991) were enumerated.

Culture-Independent Analysis: DNA Metabarcoding

DNA Extraction. Five grams of the sample was placed in 45 mL of sterile peptone water and homogenized in a stomacher (Mayo International Srl) for 3 × 1 min at maximum speed. Five milliliters of the dilution was placed in a sterile tube and centrifuged for 3 min at 13,000 × *g* at 4°C. The supernatant was then discarded and the pellet was washed with sterile peptone water and centrifuged several times while removing the fat layer present on the sides of the tube after each centrifugation. DNA was extracted using the DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen), which uses combined chemical and mechanical lysis conditions. DNA concentrations were determined using a nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000/2000c, Thermo Fisher Scientific) and were adjusted to 10 ng/µL.

Mock Communities. Positive controls of mock communities (a mix of DNA of multiple known species) were used for the following 2 main reasons: to make sure that the primers used for 16S rDNA and ITS2 region did not over-amplify certain species, and to detect any false positives in the case of tag-jumping between samples (Francioli et al., 2021). They were subjected to the same analysis as the samples and as described in the Illumina MiSeq Sequencing and Bioinformatics Analysis sections. Previously identified bacterial and fungal species isolated from labneh Ambaris samples were used to constitute theses mock communities. The bacterial mock community was composed of equimolar DNA concentrations (10 ng/µL) of the following 6 species: *Lentilactobacillus diolivorans*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Lactococcus lactis*. The fungal mock community was composed of equimolar DNA concentrations (10 ng/µL) of the following 10 species: *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia terricola*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii*, and *Candida parapsilosis*.

Illumina MiSeq Sequencing. The V3–V4 region of the 16S rRNA gene for bacteria and ITS2 region for fungi were amplified. The primers used for the amplification of the 16S region were 16SV3 and 16SV4, and the primers used for the amplification of the ITS2 region were ITS3 tagmix1 and ITS4ngs (Tedersoo et al., 2015). To constitute forward and reverse primers that should be added to the PCR mix for 16S and ITS2 amplifications, an equal mix of the 3 primers, each containing a different frameshift, was made (Supplemental Table S2; https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582585.v4; Abi Khalil, 2022e). To prepare the multiplexed Illumina libraries, 2 amplifications are needed; particularly, the first PCR (Supplemental Table S3; https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582642.v2; Abi Khalil, 2022f) was used to add Illumina adapters and frameshifts to the target genes. The second PCR (indexing PCR, 8 cycles) was done by the sequencing platform to tag each sample with a unique nucleotide sequence (barcodes). The amplified DNA of all the samples were then pooled together to form the library. The mix was then sequenced with an Illumina MiSeq protocol, generating 2 × 300 bp paired-end reads.

Bioinformatics Analysis. Bacterial and fungal populations were assessed using 2 pipelines: DADA2

package version 1.14.1 in R program version 3.6.1 and FROGS version 3.2.2 (Escudié et al., 2018).

Pre-processing Using DADA2. The first demultiplexing step was done directly by the sequencing platform. The files received were the R1 and R2, constituting the forward and reverse sequences, respectively, for each sample. The bioinformatics pipeline applied consists mainly of the following steps: (1) removing primers using cutadapt (Martin, 2011), (2) filtering and trimming reads as per their quality, (3) dereplicating identical reads, (4) sample inference, (5) merging paired reads, (6) constructing amplicon sequence variants (**ASV**) table, and (7) removing chimeras.

Taxonomic Affiliation Using FROGS. Affiliation was performed using DAIRYdb database version 1.1.2 (Meola et al., 2019) and UNITE database version 8.2 (Nilsson et al., 2019) for 16S rRNA gene and ITS2 sequences, respectively. Multi-affiliated ASV were manually inspected using affiliation Explorer (Mariadassou, 2021) to choose between conflicting affiliations. The final ".biom" table was then uploaded into FROGS (Galaxy Version 3.2.2) for further processing and visualization using phyloseq R package (McMurdie and Holmes, 2013). For visual simplification, ASV tables were sorted and the most abundant (top 15) genera or species were presented for 16S and ITS2. The microbial compositions of samples were visualized using the Phyloseq Composition Visualization tool in FROGS (Galaxy Version 3.2.2). Amplicon sequence variants tables were then normalized by rarefaction before assessing the diversity indices. Species diversity within each sample was estimated using α-diversity indices (richness, Chao1, Shannon, and inverse Simpson). Species diversity between communities (β-diversity) was estimated using Bray-Curtis dissimilarity index and visualized by applying the metric multidimensional scaling ordination method.

Sensory Evaluation

All sensory tests were approved by INP-EI Purpan and the Lebanese University Institutions. The sensory tests took place during autumn season of 2020. The sensory panel was divided into 2 groups. The first one took the tests in a dedicated room at the Lebanese University–Faculty of Agriculture, and the second group was gathered in a dedicated room close to the panelists' houses or work places.

Sample Preparation. Five out of the 20 samples were discarded from the sensory analyses because 4 contained pathogens (LA-1, LA-4, LA-17, and LA-18) and 1 (LA-7) had insufficient quantity for testing. Refrigerated samples were placed at room temperature before being served to the panelists. Approximately 5 g of each sample was used for each tasting. To prevent saturation of the taste buds of the panelists, a maximum of 5 samples were tested per session because labneh Ambaris is strongly acidic and salty. Samples were presented in random order and the panelists were asked to cleanse their palates with a small piece of Lebanese bread (pita), then with room temperature water between samples.

Pivot Profile Method. Pivot Profile is a relatively new sensory method where panelists compare samples to a pre-identified reference, the pivot, using their own words (Thuillier et al., 2015). Samples should be described using terms less "*X*" than the pivot and more "*Y*" than the pivot (e.g., less salty, more acidic). Twenty panelists, 12 women and 8 men, aged between 24 and 65 yr, were selected. Panelists were informed about the nature of the products and provided written consent to participate in the analysis. Throughout the sampling campaign, most of the samples were tested by several persons, independently from the analysis, and one labneh Ambaris sample was chosen as the pivot for being the most appreciated and having balanced sensory characteristics. Fourteen samples were compared with the pivot, each placed on an opaque white plate on one side and the pivot on the other side. Samples were each coded with a random 3-digit number, whereas the pivot had always the same code. At the end of each session, panelists were asked for the exact meaning of their written descriptors, and words having the same meaning were grouped to form the final dictionary noting that only affirmative, 1-word descriptors were accepted.

Descriptors were entered into TASTEL software version 2015.2 along with the dictionary created to obtain contingency tables. The pivot was reintegrated into the analysis according to the method described previously (Fonseca et al., 2016). Statistical analysis was applied to the contingency tables generated using XLSTAT (Addinsoft, 2022).

As done by Fonseca et al. (2016), global chi-square was first used to assess the existence of a relationship between descriptors and samples in the contingency table. Then, it was possible to apply the chi-squared per cell statistical test to analyze, within each cell, the source of the variation obtained with a 95% confidence interval.

Classical Descriptive Analysis. The PP sensory sessions were considered as the "descriptive lexicon" generating sessions. Four men and 11 women were selected from the previous panel according to their motivation, commitment, and availability, and received 6 h of additional training. Eleven descriptors were retained from the PP results to constitute the "descriptive lexicon" of labneh Ambaris. Fifteen samples were

described, each presented individually to the panelists on an opaque white plate. The samples were each coded with a random 3-digit number and were scored on a 7-unit scale with a minimum of 1 (the descriptor exists in low intensity) and a maximum of 7 (the descriptor exists in very high intensity).

Statistical tests were applied using XLSTAT (Addinsoft, 2022). Analysis of variance test was applied to the sensory scores to detect significant differences between samples regarding the chosen attributes with a 95% confidence interval, followed by a principal component analysis on the 10 discriminatory descriptors. A hierarchical ascendant classification on the principal components based on Ward's linkage was then used to group labneh Ambaris samples having similar sensory characteristics.

Similarity Between the Sensory Methods. Multiple factors analysis was applied to the contingency table and the means table derived from the 2 methods. The regression vector coefficient (**RV coefficient**) was used to compare the similarities between the 2 sensory methods. The RV coefficient is an index that ranges from 0 (no correlation) to 1 (perfect correlation; Fonseca et al., 2016).

Correlation Between Descriptive Sensory Analysis and Physicochemical Characteristics. A correlation matrix between descriptors and physicochemical characteristics was generated with a 95% confidence interval.

Results

Physicochemical Analyses.

The pH values of the 20 samples varied between 2.92 and 4.14, with a mean value of 3.42 ± 0.28 (Figure 1A), which shows that labneh Ambaris is a highly acidic food product. For salt contents, high variability was recorded between the samples with a minimum of 0.52% and a maximum of 10.99%, and a mean value of 2.76 ± 2.47%, noting that 15 out of the 20 samples had values equal to or below 2.98% (Figure 1B). Salt-to-moisture ratio values ranged from 0.69 to 17.95% with a mean value of 4.39 ± 4.11% (Figure 1B). As for the fat, protein, and moisture contents, important variations existed between the samples. Values ranged from 9.5 to 30.5% for fat contents with a mean value of 18.07 ± 5.34, from 7.02 to 14.92% for protein contents with a mean value of 12.17 ± 2.09 and from 52.83 to 74.59% for moisture contents with a mean value of 65.08 ± 6.21 (Figures 1C and 1D). Details of all physicochemical characteristics of each sample is available in Supplemental Table S4 (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20306520.v3; Abi Khalil, 2022g).

Microbiological Analyses: Microbial Enumeration and Pathogens Detection

Total mesophilic aerobic flora levels varied between 4.80 and 8.81 log cfu/g, with a mean value of 7.10 ± 1.16 log cfu/g. For presumptive mesophilic lactococci and streptococci, levels varied between 5.22 and 7.85 log cfu/g with a mean value of 6.81 ± 0.82 log cfu/g. Presumptive mesophilic lactobacilli counts ranged between 5.87 and 8.76 log cfu/g with a mean value of 7.57 ± 0.78 log cfu/g. Yeasts were found in all the samples with levels varying between 4.30 and 8.39 log cfu/g and a mean value of 6.65 ± 1.25 log cfu/g. The details of the microbial enumerations are presented in Figure 2.

Out of the 20 samples tested, only 2 showed the presence of coliforms (with one of them also positive for *E. coli*); specifically, sample LA-1 had 4 log cfu/g coliforms at 37°C, 3.90 log cfu/g thermotolerant coliforms at 44°C and 3.90 log cfu/g *E. coli*. Sample LA-4 had 3.30 log cfu/g coliforms at 37°C and 2.47 log cfu/g thermotolerant coliforms at 44°C. Two samples collected from the same producer (LA-17 and LA-18) were positive for *L. monocytogenes*. None of the samples contained *Salmonella* sp., *B. melitensis*, or *Staph. aureus*.

Identification of Microbial Communities by DNA Metabarcoding Analyses

16S Sequencing for Bacterial Identification. After demultiplexing, 16S rRNA gene sequencing produced 1,909,754 paired-end reads for all samples, mock communities, and negative controls. This means that on average, 68,205 reads were obtained per sample, ranging from 37,385 reads to 95,126. These raw paired-end reads were then filtered according to their quality, dereplicated, and the background noises and chimeras removed, which leaves a total of 929,771 merged reads that were classified into 419 ASV. Within the bacterial composition, *Bacillota* was the dominant phylum in the 20 samples of labneh Ambaris with 95.31% of total sequences, followed by *Pseudomonadota* with 4.32%. The remaining 0.37% were composed of *Actinomycetota*, *Bacteroidota*, and *Mycoplasmatota*. The dominant phyla were translated as *Bacilli* and *Gammaproteobacteria* classes (95.30 and 4.31%, respectively). The most dominant bacterial family was *Lactobacillaceae* with a very high percentage (88.08% of the total sequences), followed by *Streptococcaceae* (6.11%) and *Enterobacteriaceae* (3.14%). At the genus level, *Lactobacillus* was the dominant one (63.14%), followed by *Lentilactobacillus* (11.98%), *Lactiplantibacillus* (7.17%), *Lacticaseibacillus* (5.02%), *Lactococcus* (4.62%), *Streptococcus* (1.49%), and *Aeromonas* (0.71%). Several ASV (constituting 1.29% of total sequences) could not be identified at

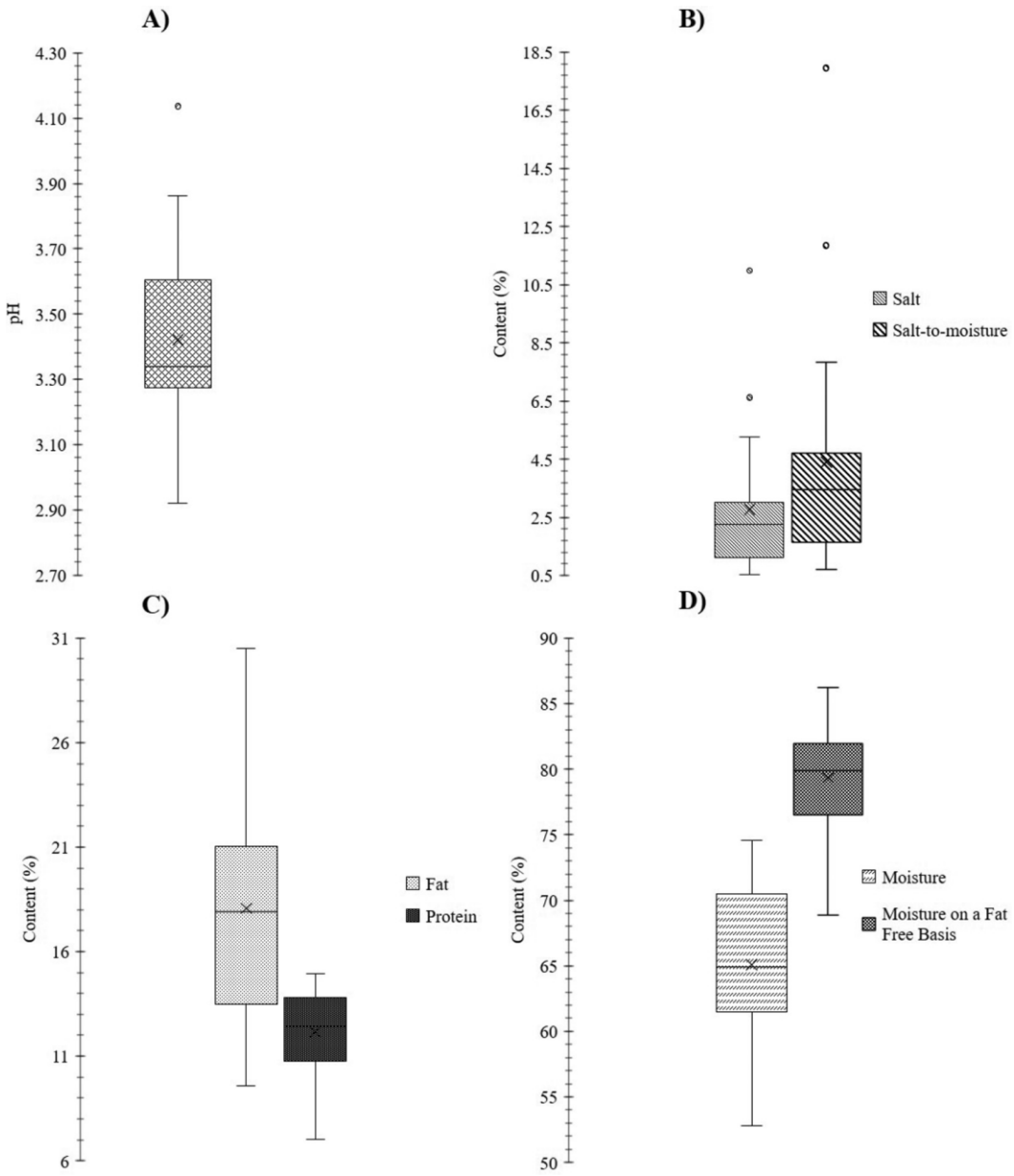


Figure 1. Physicochemical characteristics of 20 labneh Ambaris samples: (A) pH values, (B) salt and salt-to-moisture contents (%), (C) fat and protein contents (%), and (D) moisture and moisture on fat-free basis contents (%). Values are scattered according to the following: top of box = maximum, bottom of box = minimum, horizontal line = median, x = mean, lower whisker = quartile 1, upper whisker = quartile 4.

the genus level, but they all belonged to the family *Enterobacteriaceae* and were presented as "unidentified" genus. Out of the 20 samples tested, 13 had *Lactobacillus* as the dominant genus (Supplemental Figure S1; https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582657.v4; Abi Khalil, 2022a), whereas the remaining ones had *Lactiplantibacillus* (LA-3 and LA-6), *Lactococcus* (LA-15), *Lentilactobacillus* (LA-17), *Streptococcus* (LA-18), *Lacticaseibacillus* (LA-20), and *Enterococcus* (LA-7) as the dominant genus. It is important to note that 2 samples (LA-10 and LA-11) were strictly dominated by *Lactobacillus* genus (with over 99% within each sample), whereas 7 out of 20 samples showed more than 10 different bacterial genera. A significant amount of ASV could not be identified at the species level; particularly, when blasted into the currently available databases, the sequences gave several options having the same identity percentages and query coverage. *Lactiplantibacillus* sp. could either be the species *plantarum*, *paraplantarum*, or *pentosus*. *Lentilactobacillus* sp. could either be one

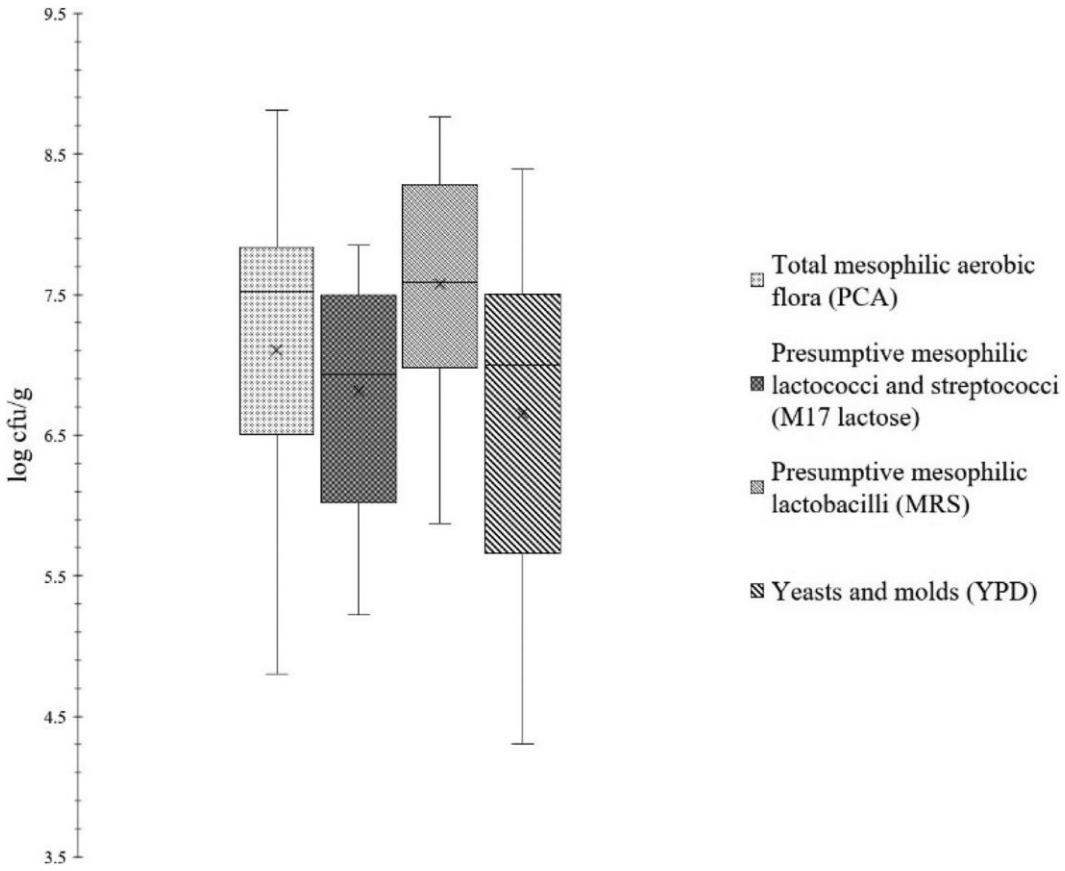


Figure 2. Microbial counts of 20 labneh Ambaris samples plated on selective and nutritive media. The results are expressed in log cfu/g. Values are scattered according to the following: top of box = maximum, bottom of box = minimum, horizontal line = median, x = mean, lower whisker = quartile 1, upper whisker = quartile 4.

of the species *hilgardii* or *diolivorans*, or the species *kefiri*, *sunkii*, or *otakiensis*. *Lactobacillus* sp. could be *helveticus*, *gallinarum*, or *crispatus* species. The options for *Enterococcus* sp. were the species *durans*, *faecium*, *hirae*, or *ratti*. A total of 160 bacterial species were detected within the samples. As shown in Figure 3A, within the identified species, *Lactobacillus kefiranofaciens* was the most dominant among samples with 40% of the total sequences obtained. Out of the 20 samples, this species was present in 16, in varying abundances. It constituted more than 90% of the relative abundance in 5 samples. The species *Lactobacillus helveticus* was the next most dominant with 12% of the total sequences, but it was only found in 4 samples, and it constituted more than 99% of the bacteria in sample LA-10 that was produced in a stainless-steel container. *Lactobacillus delbrueckii* (with 7% of total sequences) was present in 11 samples, but in low abundance, except for the sample LA-11 (produced in a plastic jar) where it was the only species present. *Lacticaseibacillus rhamnosus* with 4.7% of total sequences was detected in 4 samples and was present in a very high percentage (77.73%) in sample LA-20. As for *Lactococcus lactis*, it constituted 4.5% of total sequences and was detected in 18 samples but at varying relative abundances (Figure 3A and 3B). It is important to note that the unidentified species *Lentilactobacillus sp*. constituted around 12% of the total sequences and was present in 17 samples in varying abundances. Other species were identified among the samples but in lower percentages (<4.5% of total sequences). The species *Lc. lactis*, *Lentilactobacillus* sp., and *Lb. kefiranofaciens* were present in 80% and more of the samples and can be consequently considered as main keystone bacterial species (Figure 3B).

Species richness for each sample was assessed using several α-diversity indices presented in Supplemental Table S5 (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582738.v2; Abi Khalil, 2022h). A comparison between the richness and the Chao1 indices, which is the estimated richness, revealed that our study captured almost all the bacterial diversity in the studied samples (more than 94% of the estimated richness for all the samples except for LA-10 with 83%). Based on the number of different ASV, the most diverse sample

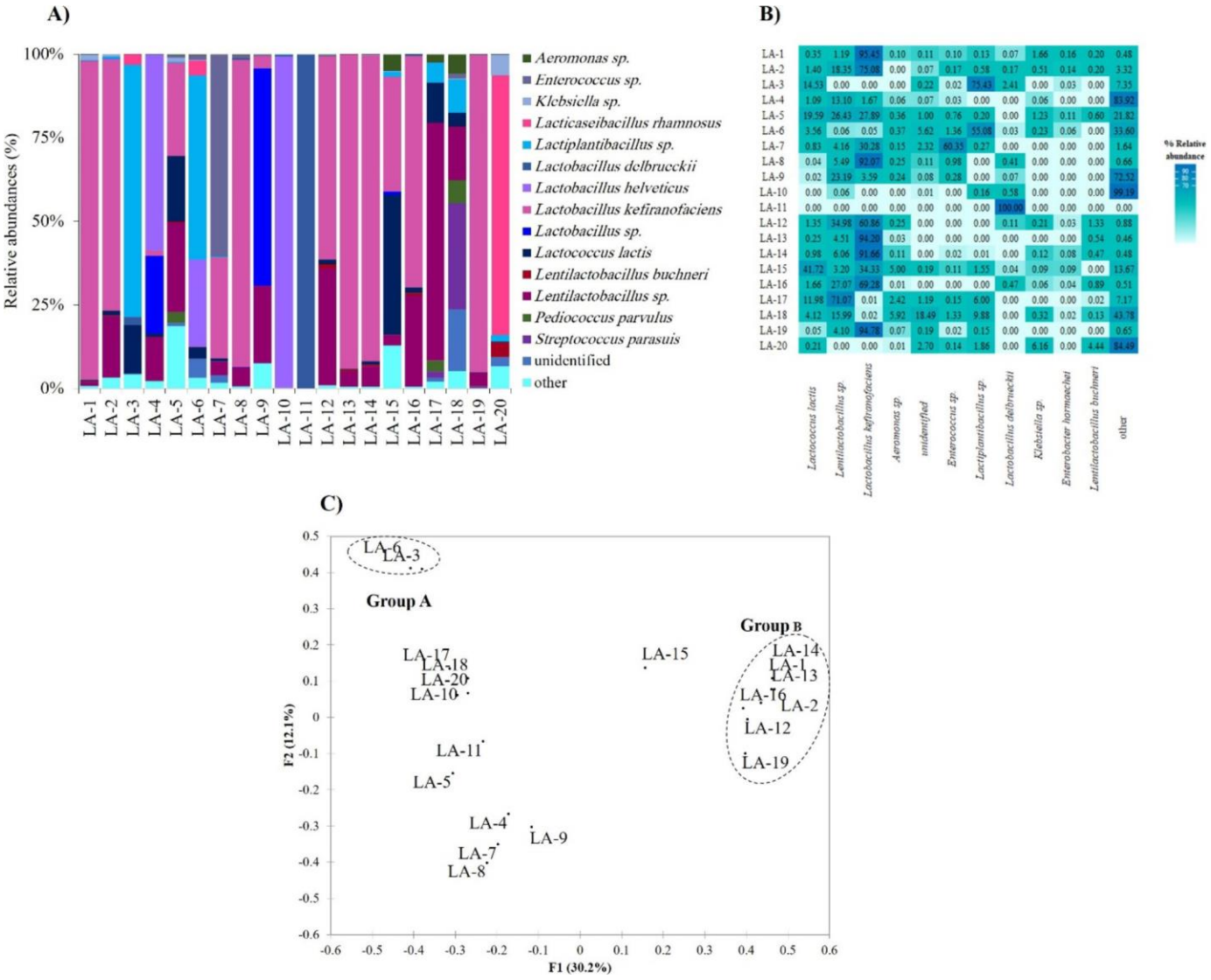


Figure 3. Analysis of bacterial communities in 20 labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) by sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene. (A) Distribution of the major 15 bacterial species, (B) heat map showing the keystone bacterial species present in 50% and more of the samples, and (C) metric multidimensional scaling plot based on Bray-Curtis dissimilarity matrix.

was LA-5 (richness index 72 and 56 different species present), followed by LA-18 (richness index 50 and 38 different species present). The least diverse sample was LA-11 (richness index 5 and only 1 species present). The richness within each sample was validated by the Shannon index, which showed the highest number for sample LA-5 (value 2.49) and the lowest number for LA-11 (value 0.12). As for species evenness, the inverse Simpson index showed that the sample LA-18 (value 7.93) had the highest value, whereas the sample LA-11 had the lowest (value 1.04). Samples dissimilarities based on the identified ASV were visualized using the metric multidimensional scaling ordination method as per Bray-Curtis indices (Figure 3C). Samples LA-3 and LA-6 (group A) that were dominated by *Lactiplantibacillus* sp. were grouped together. Samples mainly dominated by the species *Lb. kefiranofaciens* and *Lentilactobacillus* sp., where these 2 combined species constitute more than 95% of relative abundance, were clustered (group B) and separated from the others.

ITS2 Sequencing for Yeast and Mold Identification. After demultiplexing, ITS2 spacer sequencing produced 5,042,238 paired-end reads for all samples, mock communities, and negative controls. This means that on average, 180,080 reads were obtained per sample, ranging from 114,408 reads (LA-20) to 343,771 (LA-14). These raw paired-end reads were then filtered according to their quality, dereplicated, and the back-

ground noises and chimeras removed, which leaves a total of 1,580,496 merged reads that were classified into 111 ASV.

Ascomycota was the dominant fungal phylum in the 20 samples of labneh Ambaris representing 96.40% of the sequences, whereas the remaining 3.60% were for the *Basidiomycota* phylum. These ASV were classified into *Saccharomycetes* (96.24%), *Moniliellomycetes* (3.56%), *Eurotiomycetes* (0.16%), and *Tremellomycetes* (0.04%) classes. The most dominant fungal family was *Dipodascaceae* with 60.72% of the total sequences, followed by *Pichiaceae* with 33.05%, *Moniliellaceae* with 3.56%, and *Saccharomycetaceae* with 1.94%. Important differences in terms of relative abundances were recorded between samples at the family level. The Dipodascaceae family ranged from 0.042 to 92.77%, Pichiaceae from 0.64 to 99.45%, and Moniliellaceae from nonexistent in 13 out of 20 samples to 45.09% in the sample LA-14. At the genus level, *Geotrichum* was the most dominant with 60.56% of the total sequences, followed by *Pichia* with 33.04% and *Kazachstania* with 1.04%. The majority of the samples were either dominated by *Geotrichum* genus (more than 80% of the sample abundance in 6 samples) or by *Pichia* genus (more than 80% of sample abundance in 5 samples). The samples LA-13 and LA-14 (collected from the same producer) were co-dominated by *Geotrichum*, *Pichia*, and *Moniliella*. The genera *Kazachstania*, *Torulaspora*, *Kluyveromyces*, and *Starmerella* were among the top 15 identified, but they were found in lower abundances compared with *Geotrichum* and *Pichia*. The detailed composition of the top 15 fungal genera is available in Supplemental Figure S2 (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582753.v4; Abi Khalil, 2022b). A total of 36 fungal species were detected among samples. *Geotrichum candidum* was identified as the most abundant species among the samples with 60.56% of the total sequences. It was detected in all 20 samples with varying relative abundances ranging from 3.54 to 92.73%, except for 2 samples LA-6 and LA-20 where it was found in traces (<1%; Figure 4A). *Pichia kudriavzevii* was the next most abundant species and was found in all 20 samples with varying percentages. *Moniliella* sp. was found in high percentages in 3 samples collected from the same producer (LA-12, LA-13, and LA-14) compared with the other samples where it was either absent or present in very low percentages (<2.5%). *Kazachstania unispora*, *K. marxianus*, *Starmerella sp*., and *T. delbrueckii* were also identified in the samples with different relative abundances ranging from inexistent to 3.2% in sample LA-8. It is noticeable that the species *Yarrowia galli* and *Yamadazyma triangularis* were only found in the sample LA-11. The species *G. candidum*, *P. kudriavzevii*, *Geotrichum* sp., *Pichia* sp., and *K. marxianus* were present in 50% and more of the samples, and can be considered as the main keystone fungal species of labneh Ambaris samples (Figure 4B).

To normalize the data, samples LA-7 and LA-11 were removed due to their very low number of sequences in the ASV table (124 and 514, respectively). Species richness for each sample was assessed using several α diversity indices presented in Supplemental Table S6 (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582765.v3; Abi Khalil, 2022i). By comparing the richness and the Chao1 indices, we conclude that our study captured almost all the fungal richness in most of the samples (100% for all samples and 95% for sample LA-12). Based on the number of different ASV, the richest samples were LA-14 and LA-4 (richness index 22 with 14 and 12 different species detected, respectively). The least rich samples were LA-17 and LA-6 (richness index 7 with 6 and 5 different species detected, respectively). These values were emphasized by the Shannon index, which showed the highest number for sample LA-14 (value 1.47) and the lowest number for LA-6 (value 0.08). As for species evenness, the inverse Simpson index showed that sample LA-14 (value 3.41) had the highest value whereas the sample LA-6 had the lowest (value 1.03). The grouping of samples based on identified ASV was visualized using the multidimensional scaling ordination method as per Bray-Curtis distance indices between samples (Figure 4C). Samples could be divided into 2 groups according to the dominant fungal species. The first (group A) was mainly dominated by the species *G. candidum* with more than 75% of relative abundance within each sample (8 out of 18 samples). The second one (group B) was dominated by *P. kudriavzevii* (6 out of 18 samples) with more than 50% of relative abundance. The sample LA-8 was co-dominated by the species *P. kudriavzevii* (41%) and *G. candidum* (52%) and was therefore placed in between the 2 groups A and B. As for the samples LA-12, LA-13, and LA-14, collected from the same producer, they were ordinated at a distance from all the other samples because they had a high percentage of the species *Moniliella* sp. compared with the other samples.

Sensory Evaluation

Pivot Profile Method. Overall, the PP method generated descriptors specific for labneh Ambaris. A first sensory description was given using this method, which showed that all products share similar attributes, but with different intensities. After the dictionary was created, attributes along with their synonyms were entered into TASTEL software. To create the contingency table where the frequencies of each attribute were written per sample, the 15 terms having the highest oc-

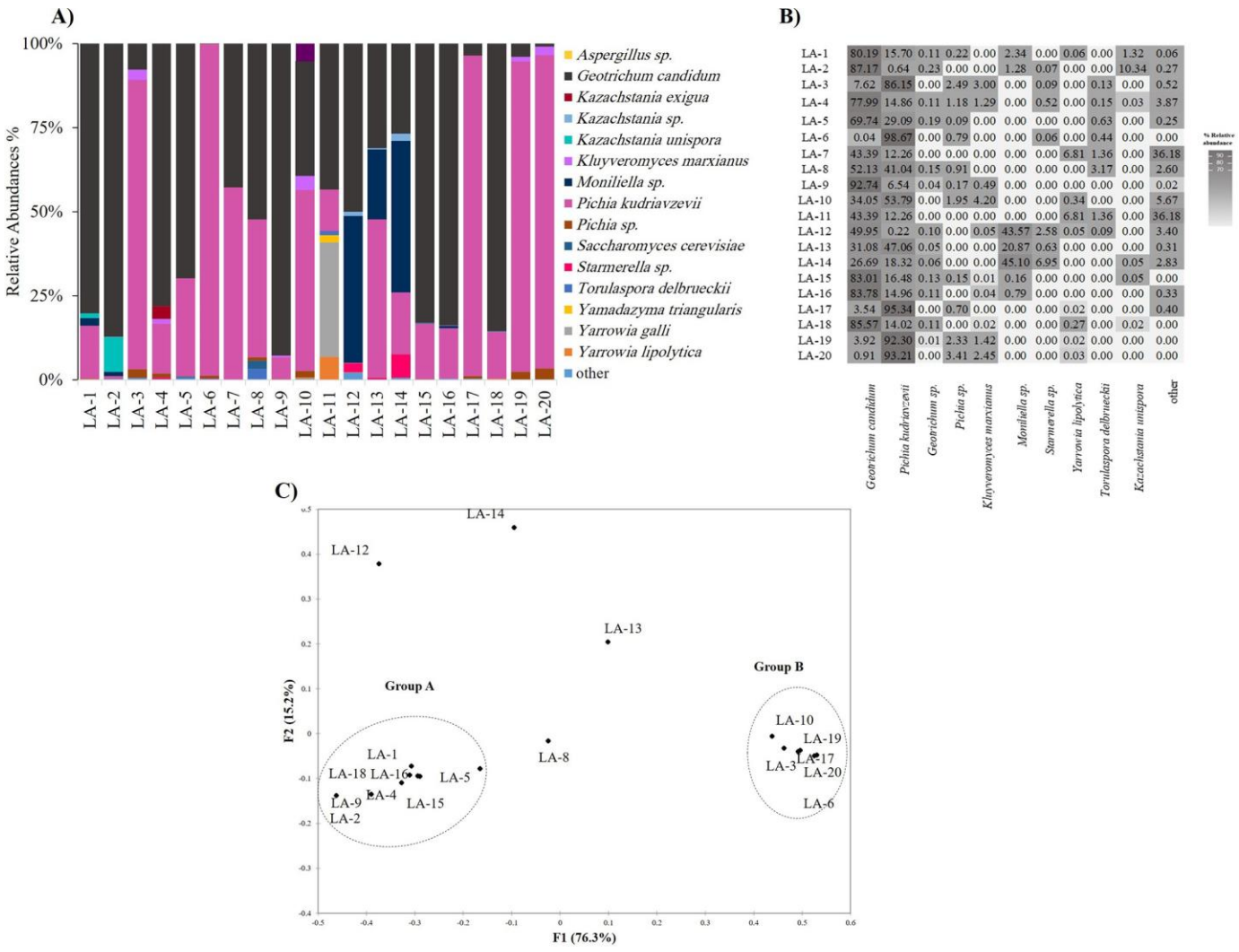


Figure 4. Analysis of fungal communities in labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) by sequencing of the ITS2 region. (A) Distribution of the major 15 fungal species, (B) heat map showing the keystone fungal species present in 30% and more of the samples, and (C) metric multi-dimensional scaling plot based on Bray-Curtis dissimilarity matrix.

currences were retained, which are as follows: “acidic,” “granulated texture,” “white,” “salty’, “goat smell,” “beige,” “melting,” “goat flavor,” “bitter,” “fatty,” “humid,” “granulated visually,” “shiny,” “acidic smell,” and “fresh smell.” According to Supplemental Table S7 (https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582771.v5; Abi Khalil, 2022j), the taste attribute “acidic” was the most used to describe labneh Ambaris samples with 424 total citations, followed by texture attribute “granulated texture” and color attribute “white” with 412 and 324 citations, respectively. The attributes “bitter,” “fatty,” and “fresh smell” were cited less than 100 times with 90, 68, and 48 citations, respectively. As for the attributes “beige” and “white,” they were cited oppositely of one another concerning a given sample, such as the sample LA-2, where it was described as whiter than the pivot (20 positive citations for “white” and 18 negative citations for “beige”). Same for the attributes “granulated texture” and “melting,” where they were cited in opposition to one another. When compared with the pivot, the descriptors “granulated visually” and “granulated texture” both varied in the same direction, either positively or negatively.

The global chi-squared test applied to the contingency table, after reintegration of the pivot and translation, was highly significant ($P < 0.0001$). This means that some labneh Ambaris samples were descriptors-dependent. Consequently, chi-squared per cell tests were applied to identify the source of statistical differences. According to the *P*-values, no particular sample was linked to the descriptors “bitter,” “fatty,” and “fresh smell.” As for the following descriptors, they were sig-

nificantly correlated with only 1 or 2 samples: "goat flavor" with LA-9, "goat smell" with LA-19, "shiny" with LA-8, and "acidic smell" with LA-6 and LA-19.

Classical Descriptive Analysis. From the 15 descriptors generated by the PP method, 11 were kept for the descriptive analysis. "Acidic smell" and "fresh smell" were discarded for the difficulty in training panelists to distinguish them. For the descriptors "granulated visually" and "granulated texture," only the second one was kept because, as shown previously, a high correlation was obtained between the 2 attributes. The descriptors "beige" and "white" were grouped into 1 "color intensity." According to ANOVA statistical analysis, the following 8 descriptors had a high discriminating potential ($P < 0.05$): "humid," "melting," "shiny," "acidic," "fatty," "salty," "color intensity," and "granulated texture." As for the descriptors "goat flavor" and "goat smell," only 2 samples for the first (LA-8 and LA-12) and 1 sample for the second (LA-11) were found significantly different from the other samples. For the descriptor "bitter," no significant differences were recorded between the samples. A principal component analysis was performed using only the 10 discriminatory descriptors. According to Figure 5, the first principal component analysis plan explains 58.86% of the variability. As per the cosines square values, the descriptors "melting," "humid," "shiny," "acidic," and "granulated texture" were explained predominantly by the first axis F1 (34.25%), whereas the descriptors "goat smell" and "color intensity" were explained by the second axis F2 (24.59% of the variability). The descriptors "salty" and "goat flavor" were explained by the third axis F3 (18.39% of the variability). According to the dendrograms obtained by Ward linkage method based on the principal components (Supplemental Figure S3; https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582777.v3; Abi Khalil, 2022c), the 15 labneh Ambaris samples could mainly be classified into 3 groups according to their characteristics. The first group A was situated on the left side of the axis F1 and was characterized by having a "granulated texture," and was neither "acidic," "humid," "melting," nor "shiny." Sample LA-5 was classified within group A, though it was explained by both axes F1 and F2. Group B was explained by axis F2 and was described as having higher "color intensity," higher "goat smell," and being "fatty." The final group C was dispersed between the other 2 groups and was composed of several diverse samples. Some of them (LA-3, LA-9, and LA-15) were "humid," "melting," "shiny," and "acidic," but did not have "granulated texture," whereas others (LA-11, LA-2) had a whitish color and were not "fatty" compared with the other samples. It was clear that the terms used describe all labneh Ambaris samples well, whereas the latter are differentiated based on the ranges that exist within each descriptor.

Both sensory methods were compared using the RV coefficient used to calculate the degree of correlation between the 2 sets of values, each generated by a method. The RV coefficient obtained was 0.706, indicating a relatively good similarity between the PP and the classical descriptive analysis, noting that only 20 untrained panelists participated in the PP method.

Correlation Between Classical Descriptive Analysis and Physicochemical Characteristics. Important correlations were recorded between sensory descriptors and physicochemical characteristics (Supplemental Table S8; https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19634595.v4; Khalil, 2022k). "Humid" was positively correlated with "shiny," and negatively correlated with "granulated texture" and "salt content." The descriptor "fatty" was positively correlated with "goat smell," whereas "color intensity" was positively correlated with fat and protein contents.

DISCUSSION

Labneh Ambaris is a traditional and sustainable fermented dairy product made in Lebanese rural areas, typically through spontaneous lactic fermentation. Its unique sensory characteristics linked to the environment and a special expertise make it well appreciated by consumers. For the first time, our study described labneh Ambaris using different combined approaches. Twenty samples were collected from 3 regions in Lebanon, covering the range of all available product variants that are manufactured without added starter cultures. Results showed that labneh Ambaris is a high acid food product with varying salt contents and a soft cheese-like texture because the minimum value recorded for the moisture content on a fat-free basis was 68.85%. Labneh Ambaris appears to be generally free of pathogens, while the main microbial group present in it is lactic acid bacteria (**LAB**) with *Lactobacillus* being the dominant genus, in addition to the presence of various yeasts. It could be mainly described as salty, acidic, having different textures, and distinctive goat smell and flavor, all with varying intensities.

The pH values obtained within our study (ranging from 2.92 to 4.13) were in accordance with those from other authors (Serhan and Mattar, 2013; Dimassi et al., 2020). The dominance of LAB present in labneh Ambaris, their high-count numbers (around 10^7 cfu/g), and their diversity could explain the low pH values obtained. Indeed, within our samples, the bacterial species found in labneh Ambaris such as *Lc. lactis*, *Lb. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus* sp. (mainly *kefiri*),

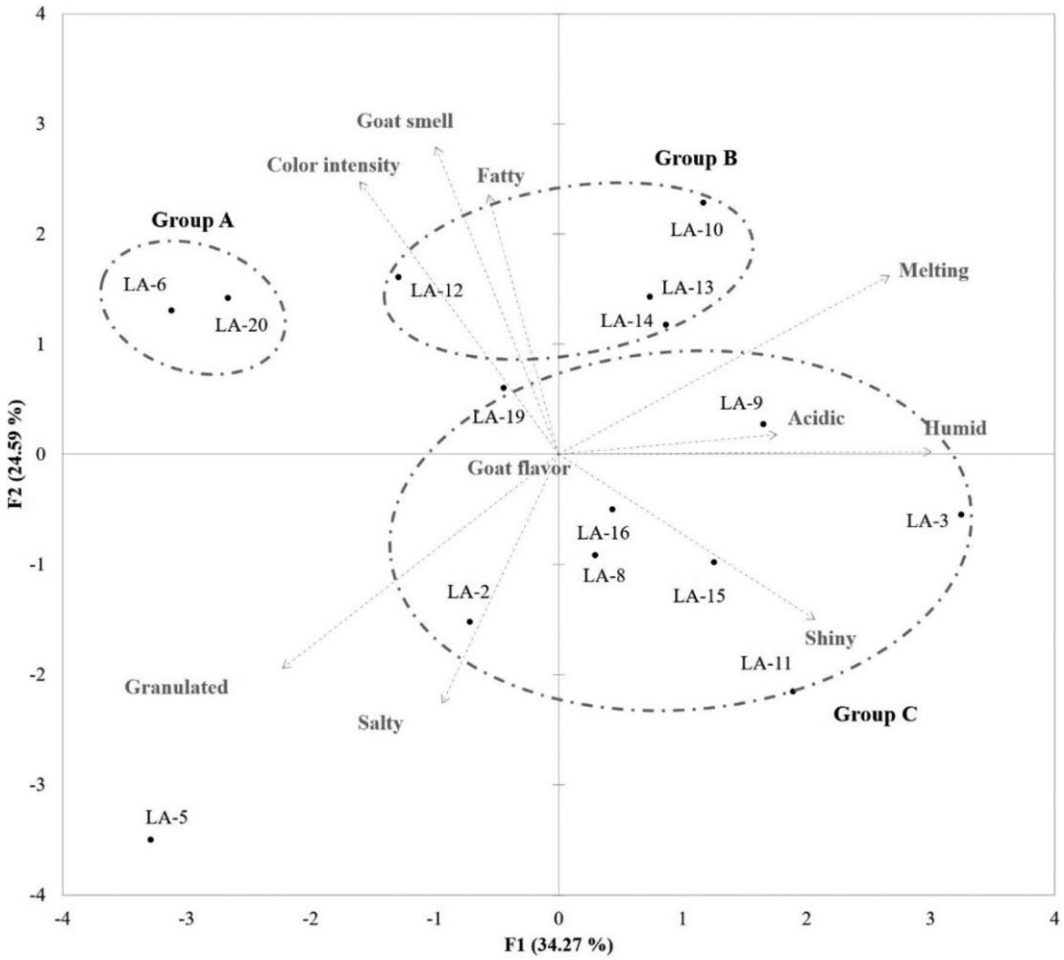


Figure 5. Principal component analysis showing the sensory profiles of 15 labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) based on the sensory notes given by panelists during classical descriptive analysis sessions. Only discriminating descriptors are shown.

Lb. helveticus, *Lentil. diolivorans*, *Lactic. rhamnosus*, and *Lactip. plantarum* are similar to those mentioned in literature for milk kefir (Bengoa et al., 2019; Yilmaz et al., 2022). A study showed a drastic pH decrease for milk fermented with whole kefir grains compared with milks fermented with individual bacterial species mainly found in kefir grains (*Lb. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri*, and *Lentilactobacillus parakefiri*; Duran et al., 2022). Interestingly, herein among the consortia of LAB, 2 species, *Lb. kefiranofaciens* and *Lc. lactis*, could play a significant role in the low pH values measured. Indeed, Wang et al. (2021) demonstrated that a coculture of *Lb. kefiranofaciens* and *Lc. lactis* leads to lower pH values compared with pH obtained with their own individual fermentations. In our study, we have also shown the presence of *G. candidum*, *P. kudriavzevii*, *K. marxianus*, and *T. delbrueckii*, fungal species well known to grow in acidic matrices like milk kefir and contribute to acidity development (Witthuhn et al., 2005; Diosma et al., 2014).

In addition to acidity, the presence and distribution of microorganisms in milk products are also greatly affected by other abiotic factors such as the salt content and water activity of products (Zheng et al., 2021). Salt is usually added to milk products for several purposes such as to control the microflora, inhibit the growth of undesirable microorganisms (spoilage and pathogenic), and enhance consumer appreciation and mouthfeel (Møller et al., 2013; Dugat-Bony et al., 2016). High variability existed between our samples regarding salt content. This was not surprising because labneh Ambaris is a homemade traditional dairy product and salting is done arbitrarily, according to the product's needs, the producer's taste, and inherited expertise. It is safe to say that 60% of the samples had values ranging between 1 and 3% salt content, which are in accordance with the results found by Dimassi et al. (2020).

Fecal coliforms were detected in 2 samples (with one containing *E. coli*). This result was in agreement with

previous studies (Serhan and Mattar, 2013; Tabet et al., 2019). These bacteria are commonly found in artisanal milk products as shown by Samelis and Kakouri (2007) who compared industrial and artisanal Galotyri cheese (an acid-curd type Greek Protected Designation of Origin cheese). No *Staph. aureus*, *Salmonella* sp., or *Brucella* sp. were detected in our study. It is commonly known that salt and organic acids play a crucial role in inhibiting pathogenic microorganisms, although studies have shown that these 2 factors are not enough on their own to inhibit certain food pathogens, and other factors take part in this. Kim et al. (2016) demonstrated that organic acids solutions with 3.5 pH (lactic acid solution and acetic acid solution) and ethyl alcohol solution (2% wt/wt) inoculated with *Staph. aureus*, *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, and *Pseudomonas aeruginosa* failed to inhibit the growth of these pathogens. Interestingly, antibacterial activity was observed when these pathogens were inoculated in different milk kefirs during fermentation process, noting that the longer fermentation time reinforced the antibacterial effect (Kim et al., 2016). Lactic acid bacteria have an inhibitory effect toward pathogenic bacteria due to their abilities to lower the pH, in addition to the secretion of bacteriocins and other antibacterial substances such as peroxides, alcohols, and carbon dioxide (Vardjan et al., 2013; Ołdak et al., 2020). Further, short-chain fatty acids produced by LAB in acidic environments are mainly responsible for the antimicrobial effect of these bacteria against pathogens (Rhoades et al., 2021). Herein, *L. monocytogenes* was detected in 2 samples collected from the same producer in which high salt concentrations were recorded. Even if the optimal growth of this species is under 5% of salt (Zarei et al., 2012), these bacteria can survive in media with salt concentrations up to 10% (Gérard et al., 2018). Beside this physicochemical aspect, *L. monocytogenes* is mainly found in products processed under low sanitary conditions (Ulusoy and Chirkena, 2019), as observed in this production facility.

It is well known that raw milk microbiota is an important factor that shapes the microbial composition of traditional milk products. The milk microbiota comes from many sources such as dairy equipment, the surrounding environment, animal feed, or seasonality (Montel et al., 2014; O'Sullivan and Cotter, 2017). Pasteurization is also an important factor that affects the diversity of milk microbiota. In our study, samples made from pasteurized milk apparently had the same diversity levels and species composition as raw milk samples. However, the low number of pasteurized milk samples (3 among 20) was not sufficient to make definitive conclusions about the effects of milk's heat treatment on the microbial composition of labneh Ambaris. The variability that exists between the microbial compositions of our samples could also be influenced by other factors such as a house microbiota in the production facility, the processes, or the production materials (earthenware, plastic, and stainless steel). Indeed, in our study, 2 out of 6 samples produced in non-earthenware materials showed lower bacterial diversity than all the other samples, with practically only 1 dominant species in each, these species being minor in the other samples. Here also, we cannot be conclusive from our limited data set about the influence of the container material. Taken together, these results illustrate possible various factors (including production material and milk pasteurization) that could influence the microbial diversity present in the final product. Additional investigations will be needed to confirm any possible role these factors might play in shaping the microbial communities of labneh Ambaris.

Through an original approach combining both PP and classical descriptive sensory analysis, our work generated descriptors that are well suited to the specific description of labneh Ambaris. The sensory analysis showed different intensities between the tested samples within the same descriptor. These differences are the result of the diversified combined microbial compositions and physicochemical characteristics observed. The majority of labneh Ambaris samples had distinctive "goat smell" that could mainly be explained by the presence of fatty acids originating from goat milk (Watkins et al., 2021), because a positive correlation was shown between "fatty" and "goat smell" descriptors. Salt content is described to affect texture and moisture content of the product (Møller et al., 2013). In our study, salt content was positively correlated with "granulated texture" and negatively correlated with "humid" and "melting" descriptors. Fat and protein contents are important factors that affect color intensity, and our study showed a positive correlation between these 2 physicochemical characteristics. They are initially linked to the milk composition which varies according to season, stage of lactation, and feed (Kljajevic et al., 2018). The activities of microbial communities could also influence labneh Ambaris sensory features, although no clear correlation was found between microbial compositions and sensory scores. For example, *G. candidum*, present in the majority of our samples, produces enzymes responsible for fat and protein degradation (Boutrou et al., 2006). Furthermore, other yeasts such as *P. kudriavzevii* also found majorly in our samples can degrade fat molecules (Costas et al., 2004). The texture and mouthfeel of fermented milk products can be influenced by the presence of exopolysaccharides, which are particularly and extensively produced by LAB species, such as *Lb. kefiranofaciens*, *Lactip. plantarum*, and *Lacticaseibacil-*

lus paracasei (Hamet et al., 2015) and some yeasts such as *K. marxianus* and *P. kudriavzevii* (Rahbar Saadat et al., 2020), and all of these species were present in our labneh Ambaris samples. Exopolysaccharides not only affect the rheological properties of dairy products but can also have health-promoting beneficial effects. For example, exopolysaccharides reduce blood cholesterol levels and protect the intestinal epithelial barrier against food pathogens (Hamet et al., 2015). In addition, it is commonly agreed that fermented milk products, especially milk kefir, which microbial composition can be closely compared with labneh Ambaris, provide various health benefits to humans upon consumption, either directly through the living probiotics that they harbor or indirectly through the functional metabolites present in the product (Rosa et al., 2017; Aguilar-Toalá et al., 2018; Kim et al., 2019; Ganatsios et al., 2021). Our study showed, via DNA metabarcoding analysis approach, that labneh Ambaris harbors a wide diversity of potential beneficial dead or alive microorganisms. However, future studies could be done to elucidate the probiotic or postbiotic healthy effect, or both, of labneh Ambaris.

CONCLUSIONS

Labneh Ambaris is a fermented milk product with high acidity, important salt contents, and a soft cheese-like texture. Our study showed, via DNA metabarcoding analysis approach, that it harbors a wide diversity of microorganisms closely related to kefir. The keystone microbial species were shown to be *Lb. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus sp*., and *Lc. lactis* for bacteria and *G. candidum*, *P. kudriavzevii*, and *K. marxianus* for yeasts. Despite these common features, high variabilities were recorded regarding the microbiological compositions, physicochemical, and sensory aspects. This could be explained by the different raw materials used, the producer-dependent production processes adopted, and the processing environments and materials involved. These factors could be investigated in further studies. This study can be considered as a base toward initializing the process of obtaining a quality label for labneh Ambaris as a sustainable cultural food product to be preserved.

ACKNOWLEDGMENTS

Sylvain Santoni (AGAP, University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier SupAgro, 34000 Montpellier, France) is appreciated for conducting the Illumina MiSeq DNA metabarcoding sequencing. This work was partially funded by a grant from the Scientific Research Projects Program of the Lebanese University (Beirut, Lebanon). The sequencing data generated in this study were deposited in the European Nucleotide Archive under accession number PRJEB52591. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

Abi Khalil, R. 2022a. Figure S1. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582657.v4.

Abi Khalil, R. 2022b. Figure S2. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582753.v4.

Abi Khalil, R. 2022c. Figure S3. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582777.v3.

Abi Khalil, R. 2022d. Table S1. figshare. Figure. https://doi.org/https://figshare.com/articles/figure/Table_S1_/19582057.

Abi Khalil, R. 2022e. Table S2. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582585.v4.

Abi Khalil, R. 2022f. Table S3. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582642.v2.

Abi Khalil, R. 2022g. Table S4. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20306520.v3.

Abi Khalil, R. 2022h. Table S5. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582738.v2.

Abi Khalil, R. 2022i. Table S6. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582765.v3.

Abi Khalil, R. 2022j. Table S7. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19582771.v5.

Abi Khalil, R. 2022k. Table S8. figshare. Figure. https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19634595.v4.

Addinsoft. 2022. XLSTAT statistical and data analysis solution. Accessed May 5, 2022. https://www.xlstat.com.

Aguilar-Toalá, J. E., R. Garcia-Varela, H. S. Garcia, V. Mata-Haro, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba, and A. Hernández-Mendoza. 2018. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Trends Food Sci. Technol. 75:105–114. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009.

Arboatti, A. S., M. L. Olivares, N. G. Sabbag, S. C. Costa, S. E. Zorrilla, and G. A. Sihufe. 2014. The influence of sodium chloride reduction on physicochemical, biochemical, rheological and sensory characteristics of Mozzarella cheese. Dairy Sci. Technol. 94:373–386. https://doi.org/10.1007/s13594-014-0169-2.

Arja, R. H. E., H. Mouawad, and H. Serhan. 2001. Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée: état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche. Options Méditerr. Sér. B: Études Rech. 148–158.

Bengoa, A., C. Iraporda, G. Garrote, and A. Abraham. 2019. Kefir micro-organisms: Their role in grain assembly and health properties of fermented milk. J. Appl. Microbiol. 126:686–700. https://doi.org/10.1111/jam.14107.

Bourdichon, F., E. Arias, A. Babuchowski, A. Bückle, F.D. Bello, A. Dubois, A. Fontana, D. Fritz, R. Kemperman, S. Laulund, O. McAuliffe, M.H. Miks, P. Papademas, V. Patrone, D.K. Sharma, E. Sliwinski, C. Stanton, U. Von Ah, S. Yao, and L. Morelli. 2021. The forgotten role of food cultures. FEMS Microbiology Letters 368:fnab085. https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085.

Boutrou, R., L. Kerriou, and J.-Y. Gassi. 2006. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. Int. Dairy J. 16:775–783. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.007.

Codex Alimentarius Standard. 2018. Standard for Fermented Milks CXS 243–2003. Accessed Sep. 5, 2022. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B243-2003%252FCXS_243e.pdf.

Standard, C. A. 2021. Standard for Cheese CXS 283–1978. Accessed Sep. 5, 2022. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B283-1978%252FCXS_283e.pdf.

Costas, M., F. J. Deive, and M. A. Longo. 2004. Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. Process Biochem. 39:2109–2114. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.001.

D'Amico, D. J., M. J. Druart, and C. W. Donnelly. 2010. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of gouda and stirred-curd cheddar cheeses manufactured from raw milk. J. Food Prot. 73:2217–2224. https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.12.2217.

Dimassi, O., Y. Iskandarani, M. Afram, R. Akiki, and M. Rached. 2020. Production and physicochemical properties of labneh anbaris, a traditional fermented cheese like product, in Lebanon. Int. J. Envi. Agric. Biotechnol. 5:509–516. https://doi.org/10.22161/ijeab.53.3.

Diosma, G., D. E. Romanin, M. F. Rey-Burusco, A. Londero, and G. L. Garrote. 2014. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. World J. Microbiol. Biotechnol. 30:43–53. https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9.

Dugat-Bony, E., A.-S. Sarthou, M.-C. Perello, G. de Revel, P. Bonnarme, and S. Helinck. 2016. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. J. Dairy Sci. 99:2502–2511. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10502.

Duran, F. E., N. Özdemir, O. Güneşer, and T. Kök-Taş. 2022. Prominent strains of kefir grains in the formation of volatile compound profile in milk medium; the role of *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri* and *Lentilactobacillus parakefiri*. Eur. Food Res. Technol. 248:975–989. https://doi.org/10.1007/s00217-021-03936-2.

Escudié, F., L. Auer, M. Bernard, M. Mariadassou, L. Cauquil, K. Vidal, S. Maman, G. Hernandez-Raquet, S. Combes, and G. Pascal. 2018. FROGS: find, rapidly, OTUs with galaxy solution. Bioinformatics 34:1287–1294. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791.

European Commission. 2021. European Commission registers Χαλλούμι/Halloumi/Hellim as a Protected Designation of Origin (PDO). Press Conf. IP/21/1623.

Fonseca, F. G. A., E. A. Esmerino, E. R. T. Filho, J. P. Ferraz, A. G. da Cruz, and H. M. A. Bolini. 2016. Novel and successful free comments method for sensory characterization of chocolate ice cream: A comparative study between pivot profile and comment analysis. J. Dairy Sci. 99:3408–3420. https://doi.org/10.3168/jds.2015-9982.

Francioli, D., G. Lentendu, S. Lewin, and S. Kolb. 2021. DNA metabarcoding for the characterization of terrestrial microbiota—Pitfalls and solutions. Microorganisms 9:361. https://doi.org/10.3390/microorganisms9020361.

Ganatsios, V., P. Nigam, S. Plessas, and A. Terpou. 2021. Kefir as a functional beverage gaining momentum towards its health promoting attributes. Beverages 7:48. https://doi.org/10.3390/beverages7030048.

Gérard, A., S. El-Hajjaji, E. Niyonzima, G. Daube, and M. Sindic. 2018. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review. Int. J. Dairy Technol. 71:825–843. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12552.

Hamet, M. F., J. A. Piermaria, and A. G. Abraham. 2015. Selection of EPS-producing Lactobacillus strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. Lebensm. Wiss. Technol. 63:129–135. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.097.

Kim, D.-H., D. Jeong, H. Kim, I.-B. Kang, J.-W. Chon, K.-Y. Song, and K.-H. Seo. 2016. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. Han-gug Chugsan Sigpum Hag-hoeji 36:787–790. https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787.

Kim, D.-H., D. Jeong, H. Kim, and K.-H. Seo. 2019. Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59:1782–1793. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1428168.

Kljajevic, N. V., I. B. Tomasevic, Z. N. Miloradovic, A. Nedeljkovic, J. B. Miocinovic, and S. T. Jovanovic. 2018. Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions. J. Food Sci. Technol. 55:299–303. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2938-4.

Licitra, G. 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business? Dairy Sci. Technol. 90:357–374. https://doi.org/10.1051/dst/2010016.

Mariadassou, M. 2021. AffiliationExplorer. Accessed May 5, 2022. https://shiny.migale.inrae.fr/app/affiliationexplorer.

Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet. J. 17:10. https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200.

McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2013. phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. PLoS One 8:e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.

Meola, M., E. Rifa, N. Shani, C. Delbès, H. Berthoud, and C. Chassard. 2019. DAIRYdb: A manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. BMC Genomics 20:560. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5914-8.

Møller, K. K., F. P. Rattray, W. L. P. Bredie, E. Høier, and Y. Ardö. 2013. Physicochemical and sensory characterization of Cheddar cheese with variable NaCl levels and equal moisture content. J. Dairy Sci. 96:1953–1971. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5524.

Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D. A. Vuitton, N. Desmasures, and F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int. J. Food Microbiol. 177:136–154. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019.

Nilsson, R. H., K.-H. Larsson, A. F. S. Taylor, J. Bengtsson-Palme, T. S. Jeppesen, D. Schigel, P. Kennedy, K. Picard, F. O. Glöckner, L. Tedersoo, I. Saar, U. Kõljalg, and K. Abarenkov. 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. Nucleic Acids Res. 47(D1):D259–D264. https://doi.org/10.1093/nar/gky1022.

O'Sullivan, O., and P. D. Cotter. 2017. Chapter 12—Microbiota of raw milk and raw milk cheeses. Pages 301–316 in Cheese. 4th ed. P. L. H. McSweeney, P. F. Fox, P. D. Cotter, and D. W. Everett, ed. Academic Press.

Ołdak, A., D. Zielińska, A. Łepecka, E. Długosz, and D. Kołożyn-Krajewska. 2020. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from polish regional cheeses exhibit anti-staphylococcal activity and selected probiotic properties. Probiotics Antimicrob. Proteins 12:1025–1038. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09587-w.

Rahbar Saadat, Y., A. Yari Khosroushahi, A. A. Movassaghpour, M. Talebi, and B. Pourghassem Gargari. 2020. Modulatory role of exopolysaccharides of *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii* as probiotic yeasts from dairy products in human colon cancer cells. J. Funct. Foods 64:103675. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103675.

Rhoades, J., I. Anastasiou, S. Michailidou, A. Koinidis, C. Doulgerakis, E. A. Alexa, A. Alvarez-Ordóñez, A. Argiriou, and E. Likotrafiti. 2021. Microbiological analysis of Greek protected designation of origin cheeses and characterisation of the isolated lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 123:105183. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105183.

Rosa, D. D., M. M. S. Dias, Ł. M. Grześkowiak, S. A. Reis, L. L. Conceição, and M. C. G. Peluzio. 2017. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. Nutr. Res. Rev. 30:82–96. https://doi.org/10.1017/S0954422416000275.

Samelis, J., and A. Kakouri. 2007. Microbial and safety qualities of PDO Galotyri cheese manufactured at the industrial or artisan scale in Epirus, Greece. Ital. J. Food Sci. 19:81–90.

Serhan, M., and J. Mattar. 2013. Characterization of four Lebanese artisanal goat milk cheeses: Darfiyeh, Aricheh, Shankleesh and Serdale by physico-chemical, microbiological and sensory analyses. J. Food Agric. Environ. 11:97–101.

Serhan, M., and J. Mattar. 2018. The goat dairy sector in Lebanon. Pages 381–396 in Goat Science. S. Kukovics, ed. InTech.

Srour, G., M. Marie, and S. Abi Saab. 2006. Performances productives des élevages caprins et ovins au Liban. Pages 193–201 in

Analyse technico-économique des systèmes de production ovine et caprine: méthodologie et valorisation pour le développement et la prospective. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 70. Y. Mena, J. M. Castel, P. Morand-Fehr, ed. Zaragoza: CIHEAM, FAO, Universidad de Sevilla.

Tabet, E., C. Salameh, M. Nehme, J. Daher, and C. Hosri. 2019. Innovation aspects of Serdaleh, a traditional Lebanese cheese produced from raw extensive goat's milk. Pages 299–304 in Innovation for Sustainability in Sheep and Goats. Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 123.

Tedersoo, L., S. Anslan, M. Bahram, S. Põlme, T. Riit, I. Liiv, U. Kõljalg, V. Kisand, H. Nilsson, F. Hildebrand, P. Bork, and K. Abarenkov. 2015. Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. MycoKeys 10:1–43. https://doi.org/10.3897/mycokeys.10.4852.

Thuillier, B., D. Valentin, R. Marchal, and C. Dacremont. 2015. Pivot profile: A new descriptive method based on free description. Food Qual. Prefer. 42:66–77. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.012.

Ulusoy, B.H., and K. Chirkena. 2019. Two perspectives of Listeria monocytogenes hazards in dairy products: The prevalence and the antibiotic resistance. Food Qual. Saf. 3:233–241. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyz035.

Vardjan, T., P. Mohar Lorbeg, I. Rogelj, and A. Čanžek Majhenič. 2013. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. J. Dairy Sci. 96:2729–2736. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5829.

Velasco, F., S. P. Verma, and M. Guevara. 2000. Comparison of the performance of fourteen statistical tests for detection of outlying values in geochemical reference material databases. Math. Geol. 32:439–464. https://doi.org/10.1023/A:1007573815959.

Wang, S.-Y., R.-F. Huang, K.-S. Ng, Y.-P. Chen, J.-S. Shiu, and M.-J. Chen. 2021. Co-culture strategy of *Lactobacillus kefiranofaciens* HL1 for developing functional fermented milk. Foods 10:2098. https://doi.org/10.3390/foods10092098.

Watkins, P. J., J. R. Jaborek, F. Teng, L. Day, H. Z. Castada, S. Baringer, and M. Wick. 2021. Branched chain fatty acids in the flavour of sheep and goat milk and meat: A review. Small Rumin. Res. 200:106398. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106398.

Witthuhn, R. C., T. Schoeman, and T. J. Britz. 2005. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. Int. Dairy J. 15:383–389. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.016.

Yilmaz, B., H. Sharma, E. Melekoglu, and F. Ozogul. 2022. Recent developments in dairy kefir-derived lactic acid bacteria and their health benefits. Food Biosci. 46:101592. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101592.

Zarei, M., M. Khezizadeh, S. Kazemipour, G. Hesami, and E. Bemani. 2012. Growth and cell morphology of *Listeria monocytogenes* as affected by various concentrations of NaCl and KCl. JABS 6:55–58.

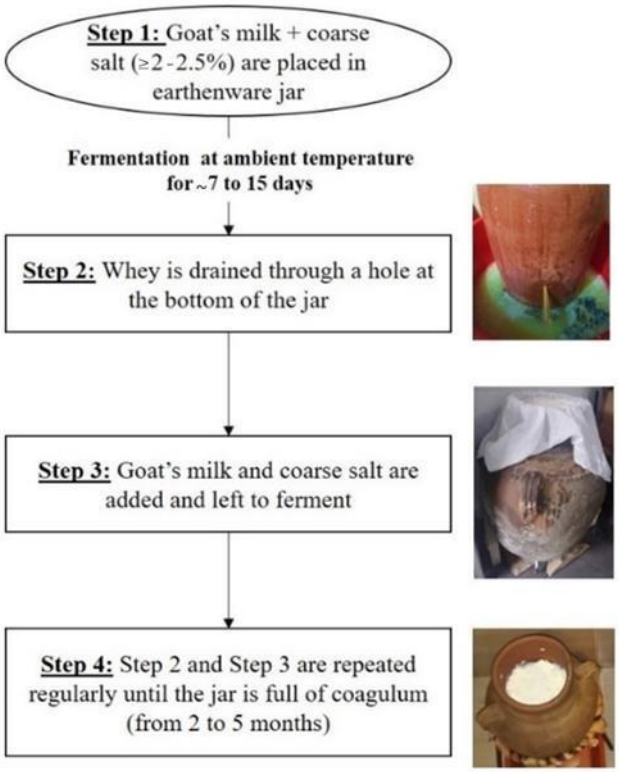
Zheng, X., X. Shi, and B. Wang. 2021. A review on the general cheese processing technology, flavor biochemical pathways and the influence of yeasts in cheese. Front. Microbiol. 12:703284. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703284.

ORCIDS

Reine Abi Khalil https://orcid.org/0000-0002-3081-5142
Sophie Yvon https://orcid.org/0000-0002-0592-2675
Christel Couderc https://orcid.org/0000-0002-6941-6915
Gwenaelle Jard https://orcid.org/0000-0003-0578-2438
Delphine Sicard https://orcid.org/0000-0002-6570-3212
Frédéric Bigey https://orcid.org/0000-0002-6240-3038
Rabih El Rammouz https://orcid.org/0000-0002-5833-4543
Pierre Abi Nakhoul https://orcid.org/0000-0002-0457-9000
Hélène Tormo https://orcid.org/0000-0003-2097-8703
Marie-José Ayoub https://orcid.org/0000-0002-5511-7180

SUPPLEMENTARY DATA

Supplemental Table S1. Production flow chart of Labneh Ambaris as well as the details and characteristics of the 20 labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) used in this study



Sample code	Region	Container material	Milk type	Producer
LA-1	Chouf	Plastic	Raw goat's milk	A
LA-2	Chouf	Stainless steel	Raw goat's milk	B
LA-3	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	C
LA-4	Chouf	Plastic	Raw goat's milk	D
LA-5	West-Bekaa	Earthenware	Raw goat's milk	E
LA-6	West-Bekaa	Earthenware	Raw goat's milk	F
LA-7	Baalbek-Hermel	Earthenware	Pasteurized goat's	G
LA-8	Baalbek-Hermel	Earthenware	Pasteurized goat's	H
LA-9	Baalbek-Hermel	Earthenware	Pasteurized goat's	I
LA-10	Chouf	Stainless steel	Raw goat's milk	J
LA-11	Chouf	Plastic	Raw goat's milk	K
LA-12	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	L
LA-13	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	L
LA-14	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	L
LA-15	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	M
LA-16	Chouf	Earthenware	Raw goat's milk	N
LA-17	West-Bekaa	Earthenware	Raw goat's milk	O
LA-18	West-Bekaa	Stainless steel	Raw goat's milk	O
LA-19	Baalbek-Hermel	Earthenware	Raw goat's milk	P
LA-20	West-Bekaa	Earthenware	Raw goat's milk	Q

Supplemental Table S2. Forward and Reverse primers used for the amplifications of 16S rRNA gene and ITS2 regions of the total DNA of 20 labneh Ambaris samples.

Targeted region	Primer		Illumina tail
16S V3-V4	16SV3-Forward	Illu4_16SV3F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNTACGGRAGGCAGCAG
		Illu6_16SV3F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNDVTACGGRAGGCAGCAG
		Illu8_16SV3F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNRMTACGGRAGGCAGCAG
	16SV4-Reverse	Illu4_16SV4R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNTACCAGGGTATCTAATCCT
		Illu5_16SV4R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNHTACCAGGGTATCTAATCCT
		Illu6_16SV4R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNWTACCAGGGTATCTAATCCT
ITS2	ITS3 tagmix1-Forward	Illu4_ITS3tagmix1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNCTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG
		Illu6_ITS3tagmix1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNDVCTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG
		Illu8_ITS3tagmix1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNNRMCTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG
	ITS4ngs-Reverse	Illu4_ITS4ngs	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNTTCCTSCGCTTATTGATATGC
		Illu5_ITS4ngs	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNHTTCCTSCGCTTATTGATATGC
		Illu6_ITS4ngs	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGNNNNNWTTCCTSCGCTTATTGATATGC

Primers used as per (Tedersoo et al., 2015). Frame-shifts are several random nucleotides (4, 5, 6, or 8) added between the primer sequence and the Illumina adapters to prevent interference during sequencing.

Supplemental Tables S3. PCR reagents and programs for the amplifications of 16S rRNA gene and ITS2 regions of the total DNA of 20 labneh Ambaris samples

16S rRNA gene		ITS2 region	
Reagents	Volume per 50 µL reaction (µL)	Reagents	Volume per 50 µL reaction (µL)
Buffer 10X	5	Buffer 10X	5
dNTP (10 mM)	1	dNTP (10 mM)	1
PCR1-16SV3F (10µM)	1	Primer F- ITS3tagmix1 (20µM)	1.25
PCR1-16SV4R (10µM)	1	Primer R- ITS4ngs (20µM)	1.25
Taq MTP	0.5	Taq MTP	0.5
Ultra pure H_2O	39.5	Ultra pure H_2O	39
DNA adjusted to 10 ng/µl	2	DNA adjusted to 10 ng/µl	2

16S rRNA gene			ITS2 region		
Temperature	Time	Number of cycles	Temperature	Time	Number of cycles
94°C	1 min	1	95°C	15 min	1
94°C	60s	30	95°C	30s	30
55°C	60s		55°C	30s	
72°C	60s		72°C	60s	
72°C	10 min	1	72°C	10 min	1
4°C	infinite	1	4°C	infinite	1

Supplemental Table S4. Physicochemical characteristics of the 20 Labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) studied

Sample code	Salt content (%)	Humidity (%)	Salt-to-moisture (SM %)	Fat content	Dry matter content (%)	Moisture Content on a Fat Free Basis (MFFB %)	Protein content (%)	pH
LA-1	2.38	66.56	3.58	17.4	33.44	80.58	12.15	3.35
LA-2	1.01	71.27	1.42	15	28.73	83.85	11.20	3.31
LA-3	0.69	65.35	1.06	20.3	34.65	81.99	11.87	3.45
LA-4	3.05	70.65	4.32	12	29.35	80.28	7.03	3.20
LA-5	6.62	55.87	11.85	22.3	44.13	71.90	12.53	3.33
LA-6	2.85	57.49	4.96	24.2	42.51	75.84	14.67	3.86
LA-7	0.8	69.91	1.14	16.9	30.09	84.13	10.48	4.14
LA-8	1.84	73.61	2.50	9.6	26.39	81.43	12.29	3.33
LA-9	1.39	73.15	1.90	13.5	26.85	84.57	10.63	3.27
LA-10	1.01	64.51	1.57	19.8	35.49	80.44	12.63	3.19
LA-11	0.52	74.59	0.70	13.5	25.41	86.23	8.78	3.65
LA-12	2.12	63.3	3.35	20.3	36.7	79.42	13.74	3.29
LA-13	1.68	62.26	2.70	21.3	37.74	79.11	14.93	2.92
LA-14	2.47	56.37	4.38	26.2	43.63	76.38	13.94	3.17
LA-15	3.2	67.66	4.73	17.4	32.34	81.91	9.43	3.35
LA-16	2.96	63.74	4.64	19.3	36.26	78.98	13.20	3.30
LA-17	5.27	67.28	7.83	12.5	32.72	76.89	11.98	3.67
LA-18	10.99	61.21	17.95	11.1	38.79	68.85	13.58	3.83
LA-19	2.96	64.1	4.62	18.4	35.9	78.55	13.84	3.37
LA-20	1.48	52.83	2.80	30.5	47.17	76.01	14.52	3.42

Supplemental Table S5. Bacterial metrics of alpha diversity indices for 20 labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20)

Sample code	Richness	Chao1	Shannon	InvSimpson
LA-1	34	36	0.41	1.14
LA-2	37	37	1.11	1.76
LA-3	22	22	1.23	2.2
LA-4	45	46.5	1.74	3.67
LA-5	72	72.86	2.49	6.57
LA-6	45	45.5	1.59	2.87
LA-7	16	16	1.42	2.54
LA-8	24	24.5	0.52	1.21
LA-9	23	23.5	1.48	2.85
LA-10	16	19.33	0.54	1.38
LA-11	5	5	0.12	1.04
LA-12	23	23	1.06	2.16
LA-13	14	14	0.39	1.16
LA-14	27	27	0.48	1.22
LA-15	42	42.5	1.74	3.37
LA-16	21	21	1.22	2.06
LA-17	42	42.75	1.41	2.19
LA-18	50	50.5	2.44	7.93
LA-19	16	16	0.82	1.7
LA-20	32	33	1.58	2.33

Supplemental Table S6. Fungal metrics of alpha diversity indices for 20 labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20)

Sample code	Richness	Chao1	Shannon	InvSimpson
LA-1	19	19	0.72	1.52
LA-2	16	16	0.59	1.33
LA-3	17	17	0.61	1.33
LA-4	22	22	0.94	1.69
LA-5	12	12	0.74	1.8
LA-6	7	7	0.08	1.03
LA-8	13	13	1.03	2.32
LA-9	13	13	0.34	1.17
LA-10	12	12	1.34	2.72
LA-12	20	21	1.11	2.4
LA-13	9	9	1.24	2.93
LA-14	22	22	1.47	3.41
LA-15	11	11	0.57	1.44
LA-16	12	12	0.58	1.42
LA-17	7	7	0.24	1.1
LA-18	11	11	0.48	1.34
LA-19	8	8	0.37	1.17
LA-20	8	8	0.33	1.15

Supplemental Table S7. Frequencies of the main cited attributes given by panelists during Pivot Profiling sensory sessions to describe labneh Ambaris samples (LA-1 to LA20). The samples were described as less "*X*" than the pivot (- columns) and more "*Y*" than the pivot (+ columns)

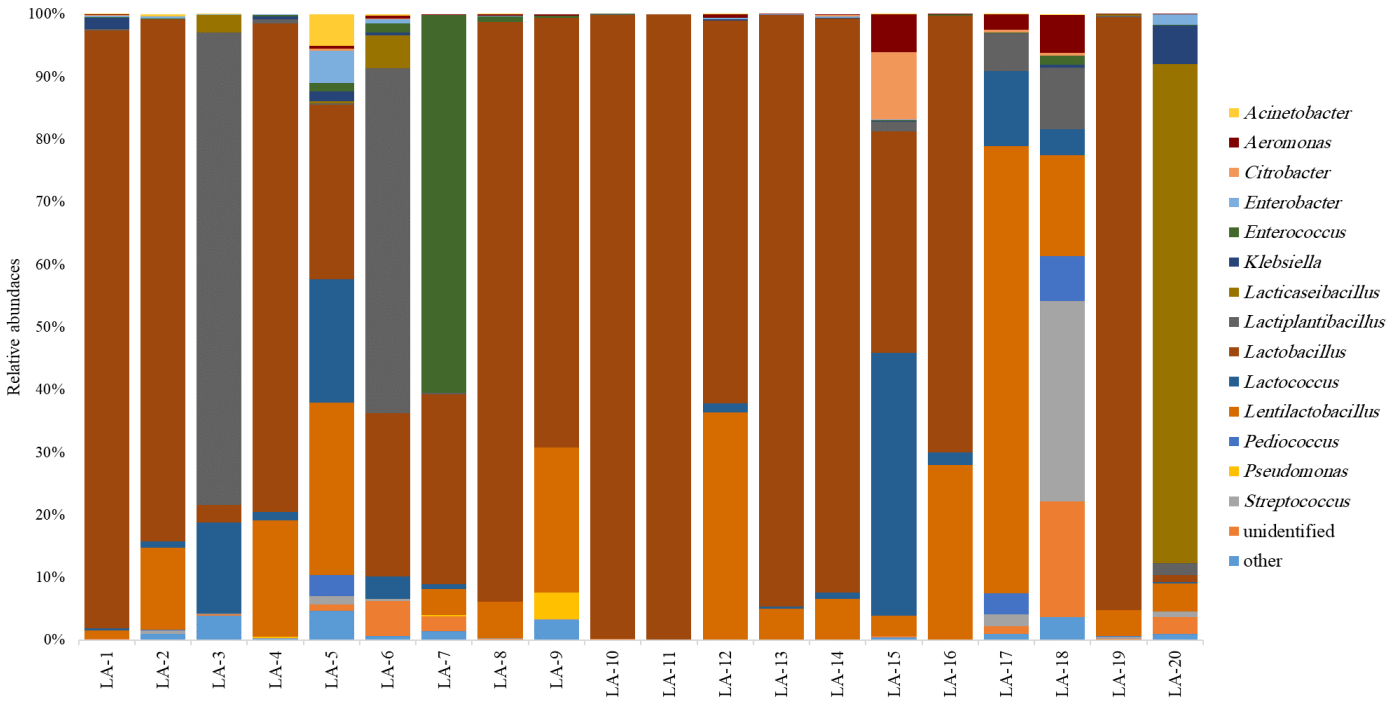
	LA-2		LA-3		LA-5		LA-6		LA-8		LA-9		LA-10		LA-11		LA-13		LA-14		LA-15		LA-16		LA-19		LA-20		
Attributes	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	Cited totally
acidic	20	4	12	30	26	6	26	0	20	12	12	20	10	22	20	4	2	20	10	22	24	14	8	20	20	14	24	2	424
granulated texture	10	18	24	0	6	36	2	26	14	18	30	6	22	0	14	18	20	8	20	10	18	10	10	18	8	18	6	22	412
white	0	20	6	24	2	30	22	2	0	22	10	12	14	4	0	22	2	6	10	4	0	38	10	18	10	18	4	14	324
goat smell	8	6	8	20	4	20	2	18	6	20	8	22	6	18	8	16	6	14	10	8	8	20	8	12	10	6	8	16	316
salty	10	12	14	4	6	24	16	8	22	0	20	4	18	0	6	14	10	6	18	6	10	12	16	4	8	14	12	4	298
acidic smell	14	8	12	8	16	14	22	6	14	8	10	10	10	8	12	2	10	8	12	6	16	6	14	6	10	14	18	4	298
beige	18	0	12	8	22	4	0	18	18	0	4	12	4	16	14	0	4	8	2	12	26	0	12	10	12	12	16	6	270
granulated visually	8	10	14	0	2	18	0	26	10	8	12	2	14	0	8	2	22	0	10	4	12	0	10	2	4	12	12	14	236
melting	8	6	0	26	10	0	12	8	2	10	0	14	0	22	2	6	2	18	2	18	2	22	8	8	2	6	10	2	226
goat flavor	2	8	8	8	8	2	8	8	8	4	10	0	4	10	6	6	10	8	4	4	6	12	4	8	6	8	6	2	178
humid	6	0	4	8	8	0	10	2	0	16	0	24	0	14	2	10	0	10	2	6	2	12	6	4	4	8	6	4	168
shiny	0	12	0	12	0	2	0	0	0	22	0	14	0	6	0	12	0	2	2	4	0	10	0	4	0	0	0	2	104
bitter	0	8	2	0	0	8	0	14	0	2	0	16	0	2	0	8	0	4	0	8	0	2	0	2	2	4	0	8	90
fresh smell	2	0	0	4	4	2	8	4	2	2	2	6	4	4	0	2	2	2	0	4	2	2	0	8	0	0	0	2	68
fatty	0	0	4	2	2	0	4	0	2	0	4	0	4	0	6	0	2	0	2	2	2	0	2	0	4	0	6	0	48

Supplemental Table S8. Correlation matrix between sensory scores generated by classical descriptive sensory analysis and physicochemical characteristics of 15 labneh Ambaris samples

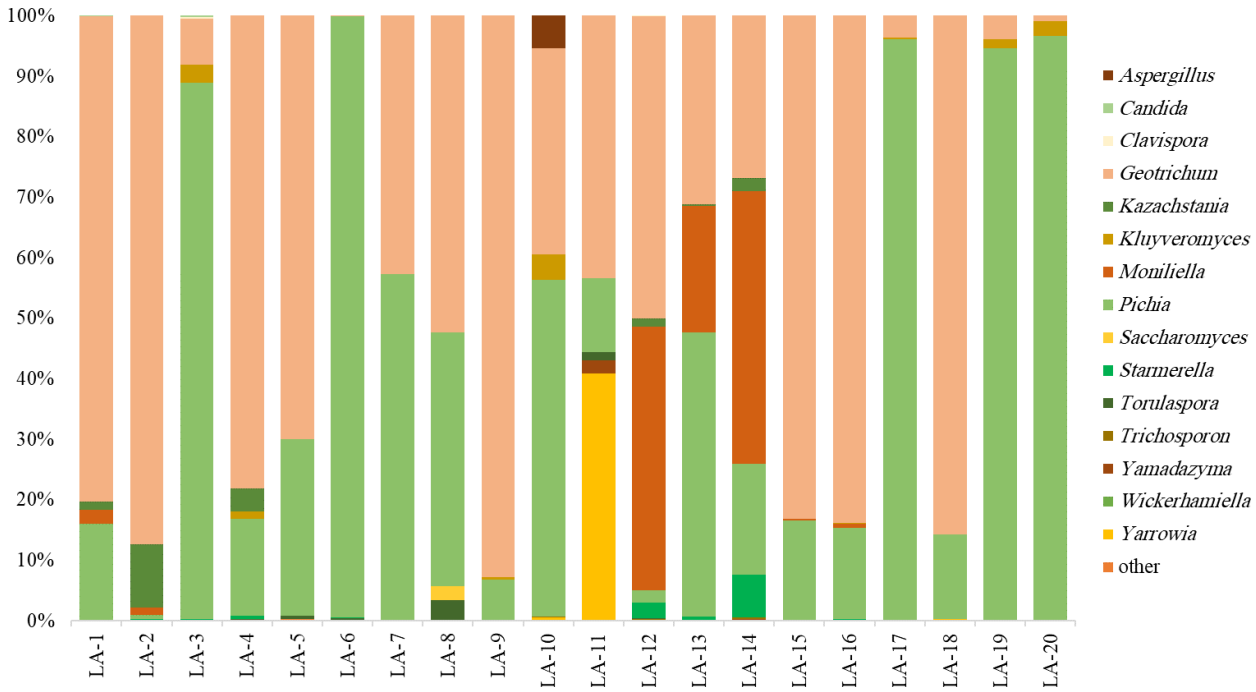
	Melting	Humid	Acidic	Shiny	Goat flavor	Fatty	Goat smell	Salty	Color intensity	Granulated texture	Salt content (%)	Fat content	Humidity (%)	Protein content (%)	pH
Melting		**0.796**	0.446	0.354	0.077	0.154	0.011	-0.458	-0.151	**-0.895**	**-0.717**	-0.152	0.348	-0.195	-0.292
Humid			**0.579**	**0.740**	-0.109	-0.123	-0.223	-0.271	-0.455	**-0.603**	**-0.522**	**-0.553**	**0.659**	**-0.546**	-0.288
Acidic				0.224	0.320	0.134	-0.157	0.166	-0.130	-0.355	0.116	-0.189	0.147	-0.015	**-0.565**
Shiny					-0.092	-0.219	-0.282	0.070	**-0.598**	-0.066	-0.248	**-0.825**	**0.852**	**-0.855**	-0.041
Goat taste						0.374	-0.047	**0.541**	0.015	-0.050	0.170	0.096	-0.056	-0.060	-0.390
Fatty							**0.592**	0.006	0.435	-0.064	0.021	0.146	-0.153	0.348	-0.062
Goat smell								-0.378	**0.576**	0.003	-0.120	0.231	-0.236	**0.539**	-0.141
Salty									-0.150	**0.544**	**0.767**	-0.039	-0.112	-0.267	-0.043
Color intensity										-0.011	0.211	**0.641**	**-0.677**	**0.696**	-0.163
Granulated texture											**0.654**	-0.171	-0.048	-0.007	0.305
Salt content (%)												0.245	-0.485	0.196	-0.007
Fat content													**-0.953**	**0.667**	0.012
Humidity (%)														**-0.744**	0.014
Protein content (%)															-0.203
pH															

Only discriminating descriptors are shown

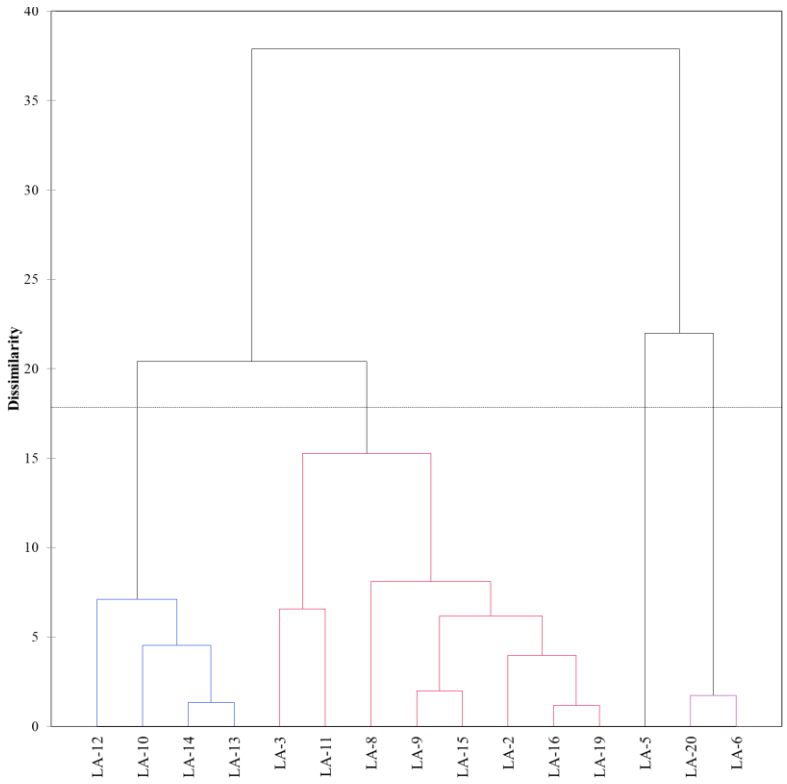
Values in bold are significantly different than 0 with a significant alpha level 0.05



Supplemental Figure S1. Analysis of bacterial communities in labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) by sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Distribution of the major 15 bacterial genera



Supplemental Figure S2. Analysis of fungal communities in labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) by Sequencing of the ITS2 region. Distribution of the major 15 fungal genera



Supplemental Figure S3. Dendrograms showing the classification of labneh Ambaris samples (LA-1 to LA-20) based on the sensory notes generated by classical descriptive analysis

Résultat II

Comparaison des communautés microbiennes de labneh Ambaris fabriqués avec des laits crus ou pasteurisés.

Reine Abi Khalil, Christel Couderc, Sophie Yvon, Gwenaelle Jard, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Hélène Tormo*, et Marie-José Ayoub*.

* *Ces auteurs ont participé à part égale pour ce travail.*

Publié dans *"Foods"*. DOI: 10.3390/foods11233874

Contexte et Objectifs : Le labneh Ambaris est un produit laitier libanais traditionnellement fabriqué à partir de lait cru de chèvre. Récemment, des variantes du produit authentique ont commencé à s'imposer, notamment l'utilisation de lait pasteurisé par crainte de contamination par des pathogènes. Le lait cru, par ses microorganismes indigènes, contribue aux caractéristiques technologiques et sensorielles des produits laitiers. On peut donc se poser la question sur l'effet de la pasteurisation sur la composition microbienne du labneh Ambaris.

Démarche expérimentale : Afin de pouvoir répondre à cette question, 12 échantillons de labneh Ambaris, au cours de la fermentation, ont été collectés chez des producteurs différents, dont six étaient fabriqués avec du lait cru de chèvre et les six autres avec du lait pasteurisé artisanalement. Leurs compositions microbiennes ont été analysées par méthode culture-indépendante : le métabarcoding. Pour ceci, la région V3-V4 du gène qui code l'ARNr 16S et la région ITS2 de l'ADNr ont été séquencées pour l'identification et la comparaison des communautés bactériennes et fongiques respectivement.

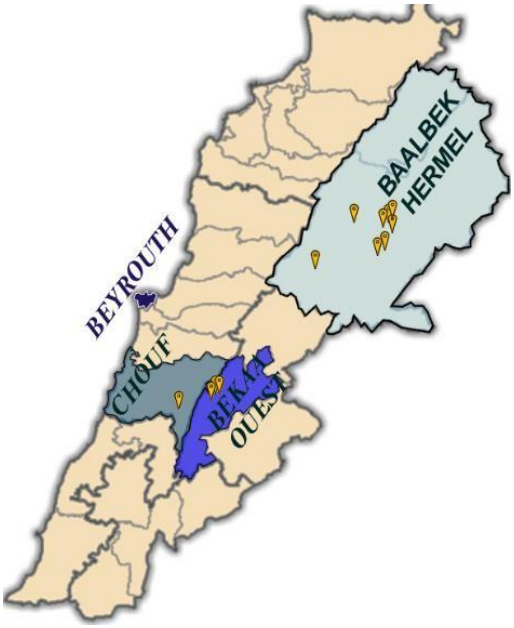


Figure 15. Carte du Liban montrant les régions desquelles les échantillons en cours de fermentation de la campagne de 2020 ont été collectés. Les 12 producteurs (6 laits crus et 6 laits pasteurisés) sont référés sur la carte par des points jaunes.

Résultats : Les échantillons présentaient une grande diversité bactérienne et fongique et ceci n'était pas lié au fait que le lait avait été pasteurisé ou non. Après clusterisation des échantillons sur la base de leur composition microbienne, ils étaient regroupés selon leurs espèces dominantes, quel que soit le lait utilisé. De plus, aucun pathogène lié au lait cru a été retrouvé mais des espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* ont été détectées dans tous les échantillons de lait cru avec des abondances plus élevées que dans les échantillons de lait pasteurisé.

Conclusions et perspectives : Comme démontré dans le Résultat I, les compositions microbiennes des échantillons de labneh Ambaris étaient très diverses. Cependant, cette variation semble être minime ou sans rapport avec le fait que le lait utilisé pour la production soit pasteurisé ou cru. D'autres facteurs, tels que la flore résidente ainsi que les pratiques de fabrication pourraient être proposés comme influençant les compositions microbiennes.

Mots clés : lait cru, labneh Ambaris, pasteurisation, métabarcoding, diversité microbienne.

foods

MDPI

Communication

Artisanal Household Milk Pasteurization Is Not a Determining Factor in Structuring the Microbial Communities of Labneh Ambaris: A Pilot Study

Reine Abi Khalil [1,2], Christel Couderc [2], Sophie Yvon [2,3], Gwenaelle Jard [2], Delphine Sicard [4], Frédéric Bigey [4], Rabih El Rammouz [5], Pierre Abi Nakhoul [1], Hélène Eutamène [2,3], Hélène Tormo [2,*,†] and Marie-José Ayoub [1,*,†]

1 Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon
2 Département Sciences de l'agroalimentaire et de la Nutrition, Université de Toulouse, INP EI-Purpan, 75 voie du TOEIC, BP 57611, CEDEX 3, F-31076 Toulouse, France
3 Toxalim, UMR 1331, INRA, INP-ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse, 31027 Toulouse, France
4 INRAE, Institute Agro Montpellier, SPO, University Montpellier, 34060 Montpellier, France
5 Department of Animal Production, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon
* Correspondence: helene.tormo@purpan.fr (H.T.); mayoub@ul.edu.lb (M.-J.A.)
† These authors contributed equally to this work.

check for updates

Citation: Abi Khalil, R.; Couderc, C.; Yvon, S.; Jard, G.; Sicard, D.; Bigey, F.; El Rammouz, R.; Abi Nakhoul, P.; Eutamène, H.; Tormo, H.; et al. Artisanal Household Milk Pasteurization Is Not a Determining Factor in Structuring the Microbial Communities of Labneh Ambaris: A Pilot Study. *Foods* **2022**, *11*, 3874. https://doi.org/10.3390/foods11233874

Academic Editor: Manuel Castillo Zambudio

Received: 8 September 2022
Accepted: 23 November 2022
Published: 1 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 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/).

Abstract: Labneh Ambaris is a traditional Lebanese dairy product traditionally made using raw goat's milk in earthenware jars, but recently the use of artisanally pasteurized milk was introduced for safety reasons. In this study, 12 samples of labneh Ambaris were studied, six made using raw goat's milk and six others using artisanally pasteurized goat's milk. These samples were collected during fermentation and their microbial compositions were analyzed. The 16S V3–V4 and the ITS2 regions of the rDNA were sequenced by DNA metabarcoding analyses for the identification and comparison of bacterial and fungal communities, respectively. The samples had high microbial diversity but differences in samples microbiota were unrelated to whether or not milk was pasteurized. The samples were consequently clustered on the basis of their dominant bacterial or fungal species, regardless of the milk used. Concerning bacterial communities, samples were clustered into 3 groups, one with a higher abundance of *Lactobacillus helveticus*, another with *Lactobacillus kefiranofaciens* as the dominant bacterial species, and the third with *Lentilactobacillus sp.* as the most abundant species. Species belonging to the *Enterobacteriaceae* family were detected in higher abundance in all raw milk samples than in artisanally pasteurized milk samples. As for fungal communities, the samples were clustered into two groups, one dominated by *Geotrichum candidum* and the other by *Pichia kudriavzevii*.

Keywords: labneh Ambaris; raw milk; artisanal pasteurization; microbial diversity; DNA metabarcoding

1. Introduction

Traditional dairy products have been produced around the world for thousands of years. Their quality and characteristics are determined by several factors closely related to their terroir of origin, such as the climatic conditions, the type of animal feed as well as the ancestral manufacturing practices. They are much appreciated by consumers due to their unique tastes and aromas. Unlike industrial dairy products, traditional ones are usually produced in small dairies or at household level using raw milk, which results in high microbial diversity and the preservation of indigenous milk microbiota [1–3]. However, the safety of raw milk dairy products and their potential risks to humans upon consumption have been extensively studied, and several diseases or outbreaks related to the consumption of dairy products contaminated by pathogens have been reported [4,5].

Pasteurization is widely used in the production of dairy products. Its main purpose is to improve milk hygiene by the inactivation of pathogenic microorganisms that could be present and to lower the overall microbial load [6,7]. It was determined in previous studies that the indigenous microbiota of raw milks contribute to the sensory qualities of raw milk dairy products, providing them with more pronounced and unique sensory characteristics [3,8]. On the other hand, it is reported that dairy products made with pasteurized milk can have lower aromatic complexity due to their lower microbial diversity and richness [9].

To study microbial diversity, culture-dependent microbiological methods are traditionally used. These methods use selective and nutritive growth media to enumerate and isolate microorganisms. While this is useful for tracking viable and cultivable microorganisms, culture-dependent methods have limited abilities to detect rare and difficult-to-culture species [10,11]. In recent years, culture-independent methods have become popular in the study of microbial diversity. These techniques rely on DNA analyses based on molecular methods with high throughput sequencing (HTS), such as DNA metabarcoding. The latter uses universally targeted molecular markers (barcodes) shared by various taxonomic groups (16S for bacteria and ITS2 for fungi). HTS methods deliver deeper information on both dominant and rare species which gives a more global vision of the microbial diversity in food matrices compared to culture-dependent methods [10–12]. Many recent studies have used this method to characterize and identify microbial populations in fermented milks [13–16].

Labneh Ambaris is a traditional fermented milk product made in rural areas in Lebanon. It is typically produced by spontaneous fermentation of raw goat's milk with coarse salt in special earthenware jars. A distinguishing feature of its production process is the regular addition of milk and salt after each coagulation and whey drainage until the jars are full of coagulum [17,18]. Due to food safety concerns, some producers have been artisanally pasteurizing the milk in their households for their productions. To our knowledge, no published data comparing the microbiota (both bacteria and fungi) of labneh Ambaris produced using raw or pasteurized goat's milk using metabarcoding analysis are available in the literature. Therefore, the aim of this work was to study the impact of artisanal household milk pasteurization using a DNA metabarcoding approach to analyze the microbial composition and diversity of labneh Ambaris samples produced in 12 different households using raw or artisanally pasteurized goat's milk.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Twelve labneh Ambaris samples were each collected from a producer in Lebanon. All of them were made by spontaneous fermentations in earthenware jars without the addition of starters. Six were made using raw goat's milk and the other six using pasteurized goat's milk. Artisanal household pasteurization was applied by the producers, in which milk was heated until it reached boiling temperature, held for a maximum of 5 min, and then allowed to cool at room temperature. Labneh Ambaris productions were carried out at room temperature. Samples were collected from their production jars during the mid-fermentation stage (at minimum, 2 months after the beginning of fermentation) and they were ready to be consumed at this stage. They were frozen at −20 °C to be later submitted for DNA metabarcoding sequencing and physicochemical analyses. Raw milk samples (RMSs) were codified as La-R1 to La-R6 and artisanally pasteurized milk samples (PMSs) were codified as La-P1 to La-P6.

2.2. pH Measruments

The pH values were recorded in triplicates at room temperature using a calibrated pH meter (HQ11 HD, HACH, Manchester, UK). An ANOVA statistical test was applied to the data grouped according to the milk type (RMS, PMS) using XLSTAT (Addinsoft, 2022, Paris, France).

2.3. DNA Extraction, Metabarcoding Sequencing and Bioinformatics Analyses

Total DNA was extracted using the DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentrations were then determined using a nanodrop spectrophotometer (NanoDrop 2000/2000c, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and were adjusted to 10 ng/µL. Mock communities (a mix of equimolar DNA concentrations (10 ng/µL) of several known species) were added for bacterial and fungal sequencing. The bacterial mock was composed of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lentilactobacillus parabuchneri*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, and *Lactococcus lactis*. Similarly, the fungal mock was composed of *Kluveromyces marxianus*, *Kazachstania exigua*, *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia terricola*, *Candida parapsilosis*, and *Debaryomyces hansenii*.

The bacterial and fungal diversities were evaluated by DNA metabarcoding sequencing of the amplified V3–V4 region of the 16S rDNA for bacteria (amplicon size of 426 bp) and the ITS2 region for fungi (amplicon sizes between 187 bp and 367 bp). For Illumina MiSeq sequencing, PCR conditions were used as described by von Gastrow et al. [19]. Briefly, the primers used to amplify the V3-V4 region were 16SV3 Forward (5′-TACGGRAGGCAGCAG-3′) and 16SV4 Reverse (5′-TACCAGGGTATCTAATCCT-3′), and the primers for the ITS2 region were ITS3 tagmix1 Forward (5′-CTAGACTCGTCATCGATGAAGAACGCAG-3′) and ITS4ngs Reverse (5′-TTCCTSCGCTTATTGATATGC-3′). Illumina tails were added to the primers along with frameshifts (sequences of 4 to 8 random nucleotides). The resulting PCR amplicons were then amplified in a second PCR to incorporate the dual-indexed adaptors for each sample. All amplicons were purified after each PCR, quantified and then pooled together to form the library. The mix was then sequenced by following an Illumina MiSeq protocol, generating 300 bp paired-end reads.

The resulting sequences were analyzed using two pipelines. The pre-processing steps were carried out using the DADA2 package version 1.14.1 in R program (version 3.6.1, R Core Team, Vienna, Austria). This resulted in amplicon sequence variant (ASV) tables. Taxonomic affiliations using the DAIRYdb database version 1.1.2 [20] for 16S rRNA and the UNITE database version 8.2 [21] for ITS2 sequences were determined using FROGS version 3.2.2 [22]. Multi-affiliations were checked using affiliation Explorer [23]. ASVs with abundances of less than 0.5% of all sequences were excluded from the analyses because they were not reproduced between runs, as described by Paës et al. [24]. ASV tables were then rarefied while creating the Phyloseq Object with FROGSSTAT Phyloseq Import Data (Galaxy Version 3.2.2) before assessing the samples diversities. Species diversity within each sample was estimated using α-diversity indices (richness and Shannon) using the FROGGSTAT Phyloseq Alpha Diversity tool (Galaxy Version 3.2.2). The species diversity between the RMS and PMS communities (β-diversity) was estimated by Bray–Curtis dissimilarity indices using the FROGGSTAT Phyloseq Beta Diversity tool (Galaxy Version 3.2.2). MANOVA was then performed using FROGSSTAT Phyloseq Multivariate Analysis of Variance (Galaxy Version 3.2.2) on both bacterial and fungal matrices to detect the existence of significant differences between communities based on the milk type (RMS, PMS) as the experimental variable. Hierarchical clustering of the 12 samples based on the Ward linkage method and Bray–Curtis indices was then applied and visualized using the FROGSSTAT Phyloseq Sample Clustering tool (Galaxy Version 3.2.2).

3. Results

3.1. pH

The details of the recorded pH values are shown in Table1. All values were lower than four. No significant differences existed between the pH values of the raw milk samples (RMS group) and the artisanally pasteurized milk samples (PMS group), at a 95% confidence interval.

Table 1. Details of the pH values and alpha diversity indices collected for 12 labneh Ambaris samples, 6 made using raw goat's milk (RMS) and 6 other using artisanally pasteurized goat's milk (PMS).

Sample Code	Milk Type	pH Values	Bacterial Richness Indices	Bacterial Shannon Indices	Fungal Richness Indices	Fungal Shannon Indices
La-R1	RMS	3.50 ± 0.02	6	1.03	3	0.07
La-R2	RMS	3.01 ± 0.02	12	0.41	2	0.15
La-R3	RMS	3.99 ± 0.02	13	1.51	3	0.66
La-R4	RMS	3.53 ± 0.03	10	1.16	3	0.37
La-R5	RMS	3.58 ± 0.01	10	1.49	3	0.18
La-R6	RMS	3.33 ± 0.02	11	0.38	2	0.16
La-P1	PMS	3.54 ± 0.01	13	1.31	2	0.44
La-P2	PMS	3.73 ± 0.01	13	0.74	4	1.09
La-P3	PMS	3.66 ± 0.01	11	1.4	1	0.00
La-P4	PMS	3.46 ± 0.01	13	0.84	2	0.39
La-P5	PMS	3.66 ± 0.01	12	1.97	2	0.41
La-P6	PMS	3.43 ± 0.01	7	0.78	3	0.20

3.2. Bacterial Communities

The 16S rDNA analysis resulted in the identification of 2 phyla, 6 families, 11 genera and 15 species. Some species could not be identified at the genus level, but they all belonged to the Enterobacteriaceae family. It was noticeable that these species were detected in all RMSs in higher abundances (minimum 0.06% in La-R6 up to 12.65% in La-R4, with three out of the six RMSs having >6% relative abundance) than in PMSs (ranging from not detected to a maximum of 1.18% in sample La-P5, with all PMSs ≤ 2%). No *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* or *Brucella* sp. were detected within the 12 samples. Species richness for the 12 samples was assessed using two alpha diversity indices. Based on the 21 ASVs remaining after filtering at 0.5% relative abundance, most samples had similar richness indices ranging between 10 and 13 ASVs representing 8 to 11 species, except for La-R1 (6 ASVs representing 4 species), and La-P6 (7 ASVs each representing a species). The richness within each sample was also assessed using the Shannon index, which showed that La-P5 (with a Shannon value of 1.97, the highest value among the samples) had relative abundances distributed between several bacterial species (Figure1). The lowest values were recorded for La-R6 and La-R2 (Shannon indices of 0.38 and 0.41, respectively), both dominated by *L. kefiranofaciens* with more than 85% relative abundance. The details of the bacterial alpha diversity indices are shown in Table1.

The MANOVA statistical analysis applied to Bray–Curtis dissimilarity indices showed no significant differences between bacterial communities according to the milk type used for production (RMS vs PMS). All samples were clustered into 3 groups by hierarchical ascendant classification (HAC) based on Bray–Curtis distance matrices using Ward's linkage method (Figure1). Clustering was independent of the milk heat treatment. The samples constituting the first group, Group A (La-P5, La-R1, La-R4, and La-R5), had *L. helveticus* and *Lactiplantibacillus* sp. in higher abundances within their compositions than other samples. The species *L. kefiranofaciens* was not detected in any of these samples and *Lentilactobacillus* sp. was detected at a very low relative abundance (0.92%) in one sample only, La-P5. Sample La-R1 was dominated by *Lacticaseibacillus rhamnosus* at 72.36% relative abundance. As for the second group (Group B), it included samples La-P1, La-R6, and La-P6 which had *L. kefiranofaciens* as the dominant bacterial species at more than 67% relative abundance within each sample. In Group C, samples La-R3, La-P3, and La-P4 were all dominated by *Lentilactobacillus* sp., which was present at more than 68% relative abundances. Sample La-P2 was included in the same group since it contained *Lentilactobacillus* sp. (16.53% relative abundance). Although the bacterial composition of sample La-R2 was closer to that of Group B, it was ordinated in a single branch within Group C. This may be explained by the presence of *L. garvieae* in La-R2 (0.1% relative abundance), as for the samples in Group C where its abundance ranged from 0.03% to 2.95%, noting that this species was not detected

in any of the samples of Group B. The species *Lactococcus lactis* was detected in 11 out of the 12 samples with relative abundances ranging from 0.02% to 11.37%. *Lactiplantibacillus* sp. was detected in all 12 samples. The species *Lacticaseibacillus rhamnosus* was detected in four RMSs at abundances varying from 1.34% to 72.36%, whereas it was only detected in two PMSs at very low abundances (0.02% and 0.03%).

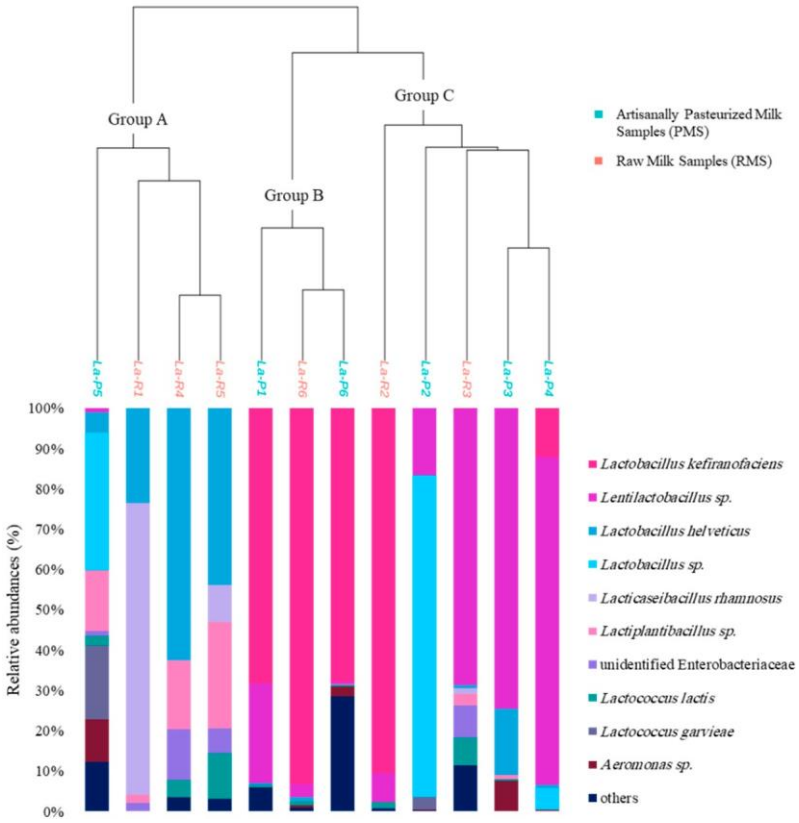


Figure 1. Analysis of bacterial communities in 12 labneh Ambaris samples (6 made with raw goat's milk (RMSs) and 6 made with artisanally pasteurized goat's milk (PMSs)) by DNA metabarcoding sequencing of the 16S rDNA V3-V4 region. The hierarchical ascendant classification (HAC) plot is based on Bray–Curtis dissimilarity matrices and the distribution of the major 10 bacterial species within each sample.

3.3. Fungal Communities

The ITS2 sequencing analysis resulted in the detection of one phylum, three families, four genera and five species. Independently of the type of milk used, less diversity existed concerning fungal compositions compared to bacterial compositions and it was clear that most of the samples were dominated by one of two fungal genera, *Geotrichum* or *Pichia*. Within the identified species, *Pichia kudriavzevii* and *Geotrichum candidum* were the most abundant, representing 49.13% and 48.12% of the total number of sequences, respectively. As shown in Figure2, *G. candidum* and *P. kudriavzevii* were detected in all 12 samples at varying relative abundances. In addition, *T. delbrueckii* was detected in five samples (three RMSs and two PMSs) with relative abundances ranging from 0.02%% to 41.45%. *K. marxianus* was detected in three samples; the relative abundances were 0.46% and 1.19% in La-R3 and La-R1, respectively, and its relative abundance amounted to 43.75% in sample La-P2. Once the ASVs with abundances lower than 0.5% of the total sequences were discarded, only five fungal ASVs remained and the fungal species richness for the 12 samples was assessed using the richness and Shannon alpha diversity indices as it was done for bacteria. Based on the number of ASVs within each sample, the most diverse sample was La-P2, with a richness index of four representing four species within its composition, whereas the least diverse sample was La-P3 with only one remaining ASV detected, corresponding to *P. kudriavzevii*. The richness within each sample was also assessed using the Shannon index, whose value was highest in sample La-P2 (value 1.09) where relative abundances were

distributed between three fungal species (Figure2). The value of the Shannon index was lowest in La-P3 (value 0), which was dominated by one species, *P. kudriavzevii*, at 99.2% relative abundance. It was noticeable that sample La-R1 had a high richness index but a very low Shannon index (0.07), which can be explained by the dominance of *P. kudriavzevii* at 95.8% of relative abundance.

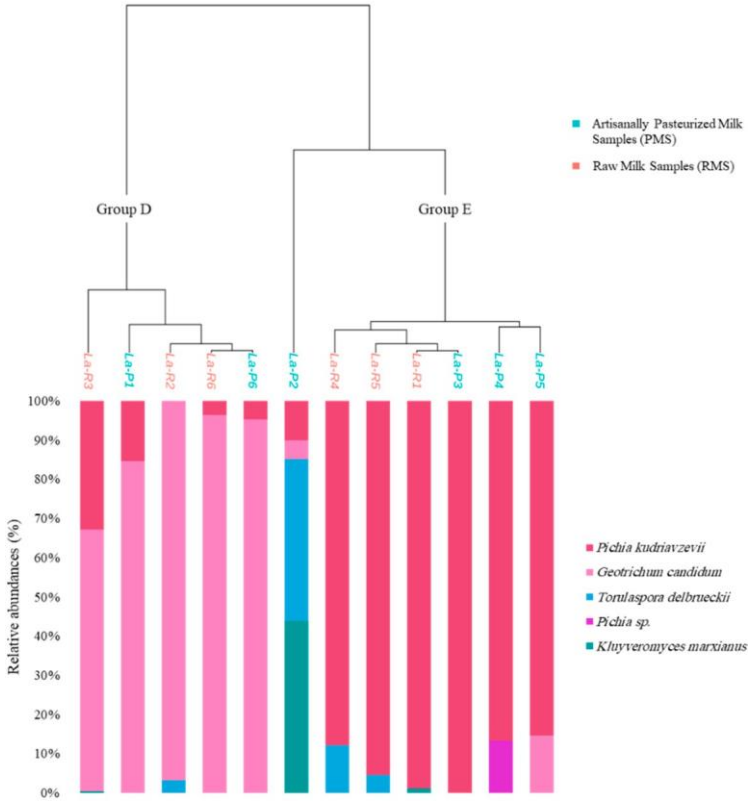


Figure 2. Analysis of fungal communities in 12 labneh Ambaris samples (6 made with raw goat's milk (RMSs) and 6 made with artisanally pasteurized goat's milk (PMSs)) by DNA metabarcoding sequencing of the ITS2 region. The hierarchical ascendant classification (HAC) plot is based on Bray–Curtis dissimilarity matrices and the distribution of the 5 remaining fungal species within each sample.

The MANOVA statistical analysis applied to the Bray–Curtis dissimilarity indices showed that there were no significant differences between fungal communities according to the milk heat treatment used for production (RMSs vs. PMSs). The samples were clustered into two main groups using a hierarchical ascendant classification (HAC) based on the Bray–Curtis distance matrix and Ward's linkage method (Figure2). The first group, Group D (La-R3, La-P1, La-R2, La-R6 and La-P6), was dominated by the species *G. candidum* at more than 65% relative abundance within each sample. The second group, Group E (La-R4, La-R5, La-R1, La-P3, La-P4, La-P5), was dominated by *P. kudriavzevii* at more than 83% relative abundance. The sample La-P2 was co-dominated by the species *K. marxianus* (43.75% relative abundance) and *T. delbrueckii* (41.45% relative abundance) and therefore was not clustered with any of the other two groups.

4. Discussion

Labneh Ambaris is a fermented milk product in which coagulation occurs mostly after the production of lactic acid from lactose fermentation by lactic acid bacteria. It is traditionally made with only raw goat's milk and coarse salt. However, many households and producers have recently begun to replace raw milk with pasteurized milk, mostly due to food safety concerns. In this pilot study, the microbial compositions of 12 labneh Ambaris samples (six made using raw milk and six others using pasteurized milk) collected during the mid-fermentation stage were compared using DNA metabarcoding analyses to check whether artisanal milk pasteurization applied at the household level influences the

microbial composition and diversity of Ambaris. Our preliminary findings revealed that the microbial compositions of labneh Ambaris were highly diverse, independently of the milk being artisanally pasteurized or raw. Our results also showed that *Enterobacteriaceae* species were present in all the samples studied, whether made of raw or pasteurized milk, although with varying abundances. *Dairy products made from pasteurized milk are usually inoculated with starter cultures to initiate fermentation after the native microbiota of the milk has been deactivated* [25]. *In our case, no starter cultures were added to our labneh Ambaris samples prepared with artisanally pasteurized milk (PMSs). Nonetheless, milk coagulation occurred at very low pH values similar to those of raw milk samples (RMSs)*.

Despite the fact that raw milk pasteurization reduces pathogens and indigenous bacterial and fungal loads [6,26,27], the fungal and bacterial communities of labneh Ambaris samples made from pasteurized and raw milk were largely comparable, although they were diverse. In contrast, the results of two recent studies demonstrated that cheeses (Gouda and Belgian soft-cheese) made with pasteurized milks had lower microbial diversity (richness) than ones made with raw milk [8,28]. Several factors may explain these contradictory observations. Indeed, the cheeses in these two studies were made under controlled industrial conditions and starter cultures were added to allow milk coagulation, whereas the labneh Ambaris samples in this study were artisanally made and the pasteurization parameters were not fully controlled. In addition, some microbial species can still survive the artisanal heat treatment since heat sensitivity varies with genus and species [26,29]. The initial microbial load of raw milk also plays a role in determining the remaining load of microorganisms after pasteurization [30]. *In many developing Middle Eastern countries including Lebanon, hand-milking is mainly practiced with small ruminants, which results in long milking times* [4]. *Furthermore, milk is kept at room temperature until milking is finished and only then it is transported and used, which could result in high initial microbial loads in the raw milk. Consequently, artisanal pasteurization practiced at the household level on raw milk with relatively high microbial loads could allow microorganisms to remain in the matrix* [2]. *To confirm this hypothesis, it would be interesting to enumerate microbial groups in milk that is handled that way before and after pasteurization is applied*.

On the other hand, the presence of microorganisms in the samples could be due to contaminations that occurred after heat treatments and that originated from the surrounding production environment [8]. Various studies have found that the microbial species that colonize production facilities and the air in the manufacturing areas have a significant impact on the microbial compositions of dairy products [31–33]. A study showed that the same yeast species were detected in cheese and in the environment of its production facility, although at varying abundances [34]. It would be interesting to identify the microbial populations that are present in the production environment to confirm this hypothesis.

Furthermore, the persistence of microorganisms from one production season to the following could inoculate the new productions and therefore explain the presence of the same major bacterial and yeast species within raw milk samples (RMSs) and artisanally pasteurized milk samples (PMSs). Microorganisms, especially non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) that are dominant in labneh Ambaris, could be transferred from the dairy equipment used, mainly the earthenware jars, where they could have persisted from previous productions through biofilm formation [29,35]. These structured communities of self-preserved microorganisms could adhere to the inner surfaces of the earthenware jars and remain until the following season. Then, when the conditions are favorable for growth, the microbial cells previously encapsulated in their matrix would be dispersed into the freshly added milk [36]. Extracellular exopolysaccharides (EPS) are key components for the formation of biofilms. They have roles in cell-to-cell and cell-to-surface adhesions [37,38]. Several species have been described to produce EPS, such as *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. lactis* and *L. brevis* [39,40]; all of them found dominantly in all our labneh Ambaris samples. Studies have shown that inside wooden vats used for the production of Italian PDO cheeses, LAB biofilms were formed from the previous productions [41]. Such biofilms could thus be a vector of microorganisms and contribute to their dissemination and inoculation into the following productions [42]. It would consequently be interesting to verify if the same phenomenon takes place in earthenware jars.

Enterobacteriaceae species were found in all RMSs and were more abundant in RMSs than in PMSs. Raw milk used in the production of labneh Ambaris RMSs may harbor high bacterial loads of active *Enterobacteriaceae* species that could proliferate during production, as was recently shown during production of raw milk Ambaris [18]. In contrast, in PMSs, these microorganisms should have been deactivated after milk heating. However, these species have also been discovered in PMSs, suggesting that their presence could be the consequence of cross-contaminations. Indeed, during the manufacturing process milk is regularly added to the jars and there are several instances of human intervention; these are different factors that can contribute to the presence of these species [43]. Insufficient artisanal pasteurization and high initial loads could also be contributing factors as explained before. Nevertheless, we must raise the fact that the high abundances detected in RMSs with our methodological approach do not imply that the *Enterobacteriaceae* species were viable in our samples; therefore, further studies considering culture-dependent methods could help to improve our characterization.

Interestingly, no dairy pathogens such as *Salmonella sp*., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* [4,5] were detected in RMSs nor in PMSs, suggesting that labneh Ambaris may not be a favorable matrix for pathogens growth even when it is made using raw milk. However, other studies have shown the occurrence of contaminated products [17]. Consequently, further studies are needed to elucidate the roles that physico-chemical and microbiological compositions might play in ensuring labneh Ambaris safety regarding pathogens.

We herein proposed that many factors, such as the house microbiota, the processing practices, and the presence of microorganisms on utensils and materials possibly affect the microbial diversity of labneh Ambaris. To be able to prove the contributing effect of each of the proposed factors, a large-scale field study could be conducted after our pilot study, in which a larger number of samples would be collected. In addition, studies in controlled laboratory conditions rather than field conditions could be considered. Furthermore, and even if microbial compositions were not influenced by the milk type used, studies should be made to determine if the sensory properties of labneh Ambaris could be affected by pasteurization, which could change the unique qualities of this food product, which is a potential candidate for a Lebanese quality protection label.

In conclusion, our findings revealed that artisanal household milk pasteurization is not a determining factor in structuring the microbial diversity of labneh Ambaris, a traditional fermented milk product from Lebanon. In addition, the microbial compositions of labneh Ambaris samples were highly diverse. However, this variation appears to be minimal or unrelated to whether goat's milk is artisanally pasteurized or raw.

Author Contributions: Conceptualization, M.-J.A., P.A.N., H.T., H.E. and R.A.K.; methodology, R.A.K., D.S. and F.B.; software, R.A.K., D.S. and F.B.; validation, S.Y., C.C., G.J., D.S., F.B., R.E.R., P.A.N., H.E., H.T. and M.-J.A.; formal analysis, R.A.K., D.S., F.B. and C.C.; investigation, R.A.K., C.C., P.A.N., H.E., H.T. and M.-J.A.; resources, P.A.N., H.E., H.T., M.-J.A., D.S. and F.B.; data curation, R.A.K., H.E., H.T., M.-J.A., D.S. and F.B.; writing—original draft preparation, R.A.K., C.C., H.E., H.T. and M.-J.A.; writing—review and editing, R.A.K., S.Y., C.C., G.J., D.S., F.B., R.E.R., P.A.N., H.E., H.T. and M.-J.A.; visualization, R.A.K., H.E., H.T., M.-J.A., D.S. and F.B.; supervision, H.E., H.T., M.-J.A., R.E.R. and P.A.N.; project administration, H.E., H.T., M.-J.A., R.E.R. and P.A.N.; funding acquisition, H.E., H.T., M.-J.A. and P.A.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was partially funded by a grant from the Scientific Research Projects Program of the Lebanese University, Beirut, Lebanon.

Data Availability Statement: The sequencing data generated in this study were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under accession number PRJEB52591.

Acknowledgments: We would like to thank Sylvain Santoni (AGAP, University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier SupAgro, 34000 Montpellier, France) for conducting the Illumina MiSeq DNA metabarcoding sequencing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mladenović, K.G.; Grujović, M.Ž.; Kiš, M.; Furmeg, S.; Tkalec, V.J.; Stefanović, O.D.; Kocić-Tanackov, S.D. *Enterobacteriaceae* in Food Safety with an Emphasis on Raw Milk and Meat. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*, 8615–8627. [CrossRef] [PubMed]
2. Rashtchi, P.; Bazmi, A.; Noshirvani, N.; Moosavy, M.H. Comparison of the Microbial, Physicochemical, and Sensorial Properties of Raw and Pasteurized Lighvan Cheeses during Ripening Time. *Food Sci. Nutr.* **2021**, *9*, 5527–5535. [CrossRef] [PubMed]
3. Westling, M.; Danielsson-Tham, M.-L.; Jass, J.; Nilsen, A.; Öström, Å.; Tham, W. Contribution of *Enterobacteriaceae* to Sensory Characteristics in Soft Cheeses Made from Raw Milk. *Procedia Food Sci.* **2016**, *7*, 17–20. [CrossRef]
4. Costanzo, N.; Ceniti, C.; Santoro, A.; Clausi, M.T.; Casalinuovo, F. Foodborne Pathogen Assessment in Raw Milk Cheeses. *Int. J. Food Sci.* **2020**, *2020*, 3616713. [CrossRef] [PubMed]
5. Gonzales-Barron, U.; Gonçalves-Tenório, A.; Rodrigues, V.; Cadavez, V. Foodborne Pathogens in Raw Milk and Cheese of Sheep and Goat Origin: A Meta-Analysis Approach. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *18*, 7–13. [CrossRef]
6. Novella-Rodríguez, S.; Veciana-Nogués, M.T.; Roig-Sagués, A.X.; Trujillo-Mesa, A.J.; Vidal-Carou, M.C. Evaluation of Biogenic Amines and Microbial Counts throughout the Ripening of Goat Cheeses from Pasteurized and Raw Milk. *J. Dairy Res.* **2004**, *71*, 245–252. [CrossRef] [PubMed]
7. Yoon, Y.; Lee, S.; Choi, K.-H. Microbial Benefits and Risks of Raw Milk Cheese. *Food Control* **2016**, *63*, 201–215. [CrossRef]
8. Salazar, J.K.; Carstens, C.K.; Ramachandran, P.; Shazer, A.G.; Narula, S.S.; Reed, E.; Ottesen, A.; Schill, K.M. Metagenomics of Pasteurized and Unpasteurized Gouda Cheese Using Targeted 16S RDNA Sequencing. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 189. [CrossRef]
9. Ocak, E.; Javidipour, I.; Tuncturk, Y. Volatile Compounds of Van Herby Cheeses Produced with Raw and Pasteurized Milks from Different Species. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 4315–4323. [CrossRef]
10. 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. [CrossRef]
11. Yeluri, J.B.R.; McSweeney, P.L.H.; Sheehan, J.J.; Cotter, P.D. Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1020. [CrossRef] [PubMed]
12. Zago, M.; Bardelli, T.; Rossetti, L.; Nazzicari, N.; Carminati, D.; Galli, A.; Giraffa, G. Evaluation of Bacterial Communities of Grana Padano Cheese by DNA Metabarcoding and DNA Fingerprinting Analysis. *Food Microbiol.* **2021**, *93*, 103613. [CrossRef] [PubMed]
13. de Almeida Brasiel, P.G.; Dutra Medeiros, J.; Barbosa Ferreira Machado, A.; Schuchter Ferreira, M.; Gouveia Peluzio, M.D.C.; Potente Dutra Luquetti, S.C. Microbial Community Dynamics of Fermented Kefir Beverages Changes over Time. *Int. J. Dairy Technol.* **2021**, *74*, 324–331. [CrossRef]
14. Groenenboom, A.E.; Shindano, J.; Cheepa, N.; Smid, E.J.; Schoustra, S.E. Microbial Population Dynamics during Traditional Production of Mabisi, a Spontaneous Fermented Milk Product from Zambia: A Field Trial. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *36*, 184. [CrossRef]
15. Kazou, M.; Grafakou, A.; Tsakalidou, E.; Georgalaki, M. Zooming Into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 621069. [CrossRef] [PubMed]
16. Korsak, N.; Taminiau, B.; Leclercq, M.; Nezer, C.; Crevecoeur, S.; Ferauche, C.; Detry, E.; Delcenserie, V.; Daube, G. Short Communication: Evaluation of the Microbiota of Kefir Samples Using Metagenetic Analysis Targeting the 16S and 26S Ribosomal DNA Fragments. *J. Dairy Sci.* **2015**, *98*, 3684–3689. [CrossRef]
17. Abi Khalil, R.; Yvon, S.; Couderc, C.; Belahcen, L.; Jard, G.; Sicard, D.; Bigey, F.; El Rammouz, R.; Abi Nakhoul, P.; Eutamène, H.; et al. Microbial Communities and Main Features of Labneh Ambaris, a Traditional Lebanese Fermented Goat's Milk Product. *J. Dairy Sci.* **2022**, in press.
18. Ayoub, M.-J.; Bechara, P.; Habchi, M.; Hosri, R.; Akl, M.; Haj Hassan, S.; Abi Nakhoul, P. Raw Goat's Milk Fermented Anbaris from Lebanon: Insights into the Microbial Dynamics and Chemical Changes Occurring during Artisanal Production, with a Focus on Yeasts. *J. Dairy Res.* **2022**, *89*, 1–9. [CrossRef]
19. von Gastrow, L.; Madec, M.-N.; Chuat, V.; Lubac, S.; Morinière, C.; Lé, S.; Santoni, S.; Sicard, D.; Valence, F. Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter. *Microorganisms* **2020**, *8*, 982. [CrossRef]

20. Meola, M.; Rifa, E.; Shani, N.; Delbès, C.; Berthoud, H.; Chassard, C. DAIRYdb: A Manually Curated Reference Database for Improved Taxonomy Annotation of 16S RRNA Gene Sequences from Dairy Products. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 560. [CrossRef]
21. Nilsson, R.H.; Larsson, K.-H.; Taylor, A.F.S.; Bengtsson-Palme, J.; Jeppesen, T.S.; Schigel, D.; Kennedy, P.; Picard, K.; Glöckner, F.O.; Tedersoo, L.; et al. The UNITE Database for Molecular Identification of Fungi: Handling Dark Taxa and Parallel Taxonomic Classifications. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D259–D264. [CrossRef] [PubMed]
22. Escudié, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1287–1294. [CrossRef] [PubMed]
23. Mariadassou, M. AffiliationExplorer 2021. Available online:https://shiny.migale.inrae.fr/app/affiliationexplorer(accessed on 8 September 2022).
24. Paës, C.; Gidenne, T.; Bébin, K.; Duperray, J.; Gohier, C.; Guené-Grand, E.; Rebours, G.; Bouchez, O.; Barilly, C.; Aymard, P.; et al. Early Introduction of Solid Feeds: Ingestion Level Matters More Than Prebiotic Supplementation for Shaping Gut Microbiota. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 261. [CrossRef]
25. Rezaei, A.; Alirezalu, K.; Damirchi, S.A.; Hesari, J.; Papademas, P.; Domínguez, R.; Lorenzo, J.M.; Yaghoubi, M. Effect of Pasteurization and Ripening Temperature on Chemical and Sensory Characteristics of Traditional Motal Cheese. *Fermentation* **2020**, *6*, 95. [CrossRef]
26. Grappin, R.; Beuvier, E. Possible Implications of Milk Pasteurization on the Manufacture and Sensory Quality of Ripened Cheese. *Int. Dairy J.* **1997**, *7*, 751–761. [CrossRef]
27. Garnier, L.; Valence, F.; Mounier, J. Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update. *Microorganisms* **2017**, *5*, 42. [CrossRef] [PubMed]
28. 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. [CrossRef]
29. Casey, M.G.; Häni, J.P.; Gruskovnjak, J.; Schaeren, W.; Wechsler, D. Characterisation of the Non-Starter Lactic Acid Bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO Cheese. *Le Lait* **2006**, *86*, 407–414. [CrossRef]
30. Sarkar, S. Microbiological Considerations: Pasteurized Milk. *Int. J. Dairy Sci.* **2015**, *10*, 206–218. [CrossRef]
31. McHugh, A.J.; Yap, M.; Crispie, F.; Feehily, C.; Hill, C.; Cotter, P.D. Microbiome-Based Environmental Monitoring of a Dairy Processing Facility Highlights the Challenges Associated with Low Microbial-Load Samples. *Npj. Sci. Food* **2021**, *5*, 4. [CrossRef]
32. Michailidou, S.; Pavlou, E.; Pasentsis, K.; Rhoades, J.; Likotrafiti, E.; Argiriou, A. Microbial Profiles of Greek PDO Cheeses Assessed with Amplicon Metabarcoding. *Food Microbiol.* **2021**, *99*, 103836. [CrossRef] [PubMed]
33. Quintana, Á.R.; Seseña, S.; Garzón, A.; Arias, R. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals* **2020**, *10*, 526. [CrossRef
34. Fröhlich-Wyder, M.-T.; Arias-Roth, E.; Jakob, E. Cheese Yeasts. *Yeast* **2019**, *36*, 129–141. [CrossRef] [PubMed]
35. Hickey, C.D.; Sheehan, J.J.; Wilkinson, M.G.; Auty, M.A.E. Growth and Location of Bacterial Colonies within Dairy Foods Using Microscopy Techniques: A Review. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 99. [CrossRef] [PubMed]
36. Alonso, V.P.P.; Kabuki, D.Y. Formation and Dispersal of Biofilms in Dairy Substrates. *Int. J. Dairy Technol.* **2019**, *72*, 472–478. [CrossRef]
37. Anand, S.; Singh, D.; Avadhanula, M.; Marka, S. Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 18–33. [CrossRef] [PubMed]
38. Salas-Jara, M.J.; Ilabaca, A.; Vega, M.; García, A. Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* **2016**, *4*, 35. [CrossRef]
39. Korcz, E.; Varga, L. Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria: Techno-Functional Application in the Food Industry. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *110*, 375–384. [CrossRef]
40. Prete, R.; Alam, M.K.; Perpetuini, G.; Perla, C.; Pittia, P.; Corsetti, A. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides Producers: A Sustainable Tool for Functional Foods. *Foods* **2021**, *10*, 1653. [CrossRef]
41. Cruciata, M.; Gaglio, R.; Scatassa, M.L.; Sala, G.; Cardamone, C.; Palmeri, M.; Moschetti, G.; La Mantia, T.; Settanni, L. Formation and Characterization of Early Bacterial Biofilms on Different Wood Typologies Applied in Dairy Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02107-17. [CrossRef]
42. Montel, M.-C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional Cheeses: Rich and Diverse Microbiota with Associated Benefits. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *177*, 136–154. [CrossRef] [PubMed]
43. Psoni, L.; Tzanetakis, N.; Litopoulou-Tzanetaki, E. Characteristics of Batzos Cheese Made from Raw, Pasteurized and/or Pasteurized Standardized Goat Milk and a Native Culture. *Food Control* **2006**, *17*, 533–539. [CrossRef]

Résultat III

Etude de la dynamique des communautés microbiennes durant la fermentation dans deux jarres en terre cuite.

Reine Abi Khalil, Christel Couderc, Sophie Yvon, Delphine Sicard, Frédéric Bigey, Rabih El Rammouz, Pierre Abi Nakhoul, Hélène Eutamène, Marie-José Ayoub* et Hélène Tormo*.

* *Ces auteurs ont participé à part égale pour ce travail.*

Article scientifique soumis dans « *International Journal of Food Microbiology* ».

Contexte et Objectifs : Partant des résultats de la première partie (Résultat I), une grande diversité de microorganismes a été détectée dans l'ensemble des 20 échantillons de labneh Ambaris. Ces microorganismes ont été retrouvés sur des produits en fin de fermentation. Cette 3ème partie vise à étudier l'implantation et l'évolution des microorganismes au cours du procédé de fabrication. Une éventuelle contribution des flores résiduelles de la jarre en terre cuite a également été explorée.

Démarche expérimentale : Deux productions simultanées ont été suivies dans deux jarres différentes chez un producteur; la première ayant déjà été utilisée durant des saisons précédentes pour la production de labneh Ambaris et la deuxième complètement nouvelle. Des échantillons de laits crus et de laits fermentés ont été régulièrement collectés des deux jarres. Différentes analyses physicochimiques, microbiologiques et sensorielles ont été faites, afin de comparer les paramètres évoluant au cours du temps, tout en regardant les différences des dynamiques microbiennes entre les deux jarres.

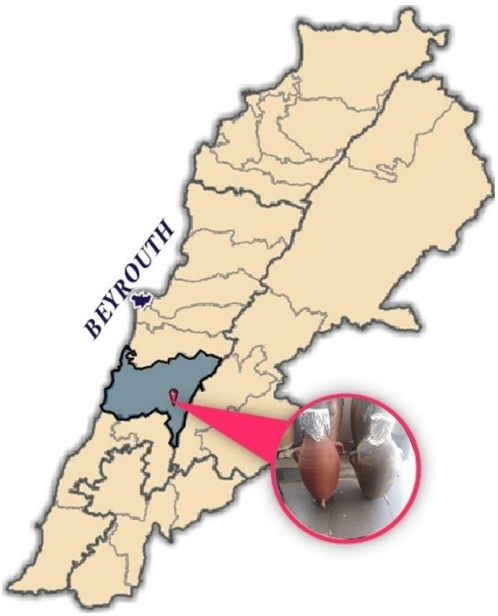


Figure 16. Le producteur sélectionné pour la campagne d'échantillonnage de 2021 chez lequel nous avons comparé les suivis de fermentation dans deux jarres, une nouvelle et une utilisée.

Résultats : *L. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus sp.* et *L. lactis* ont été identifiées comme les espèces bactériennes les plus dominantes à l'aide de l'approche de métabarcoding 16S. *Geotrichum candidum* et *Pichia kudriavzevii* ont été identifiées comme les espèces majoritaires de levure tout au long de la fermentation. Sur les milieux de culture, *Lentilactobacillus kefiri*, *Lentilactobacillus diolivorans* et *Lactobacillus kefiranofaciens* ont été majoritairement identifiées. Nos résultats ont montré que les microorganismes dominants identifiés au sein du labneh Ambaris s'installent précocement dans la matrice et y restent jusqu'à la fin de la maturation avec des abondances variables selon le stade de fermentation tout au long du procédé. Les charges microbiennes ont augmenté durant la 1ère étape de la fermentation accompagnées par une baisse importante du pH, puis elles sont restées stables en milieu de la fermentation et ont diminué au cours de la maturation. L'origine de ces populations microbiennes pourrait être, outre les laits crus utilisés, la flore résiduelle dans les jarres en terre cuite restante des productions précédentes. Ces microorganismes résiduels peuvent avoir accéléré le début de la fermentation dans la jarre ancienne par rapport à la jarre nouvelle. Les communautés microbiennes et l'acidité du lactosérum et des laits fermentés étaient comparables.

Conclusions et perspectives : les microorganismes majoritaires qui constituent le labneh Ambaris s'installent précocement dans le produit et évoluent tout au long du procédé de fabrication. L'origine de ces microorganismes peut être, en plus du lait cru ajouté, la flore résidente dans l'exploitation.

Mots clés : évolution microbienne, flore résidente, fermentation du lait.

Microbial dynamics during labneh Ambaris production in earthenware jars

Reine Abi Khalil[1,2], Christel Couderc[2], Sophie Yvon[2,3], Delphine Sicard[4], Frédéric Bigey[4], Gwenaelle Jard[2], Rabih El Rammouz[5], Pierre Abi Nakhoul[1], Hélène Eutamène[2,3], Marie-José Ayoub[1,*] and Hélène Tormo[2,*].

*These authors contributed equally to this paper

Article soumis dans *« International Journal of Food Microbiology».*

[1]Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon

[2]Département des sciences de l'agroalimentaire et de la nutrition, INP EI-Purpan, Université de Toulouse; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse cedex 3, France.

[3]Toxalim UMR 1331, INRA, INP- ENVT, INP-PURPAN, Université de Toulouse, Toulouse, France

[4]SPO, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro Montpellier, Montpellier, France

[5]Department of Animal production, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon

Corresponding authors.

Hélène Tormo, Département des sciences de l'agroalimentaire et de la nutrition, INP EI-Purpan, Université de Toulouse; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse cedex 3, France, TEL : +33 7 62 06 94 72 E-mail : helene.tormo@purpan.fr.

And

Marie-José Ayoub, Department of Food Sciences and Technologies, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut 14-6573, Lebanon. TEL: +961 3 375 305. E-mail: mayoub@ul.edu.lb.

Abstract

Microbial dynamics in a food matrix mainly results from the various microbial populations' responses to modifications in the physicochemical parameters of the matrix as well as interactions between the existing populations. This work focused on the study of microbial dynamics during labneh Ambaris production at different fermentation stages. This was assessed in a used jar and a new one to explore the possible impact of the residual microbiota in contributing to the distinctive identity of the final product. DNA metabarcoding of the ITS2 region as well as the V3-V4 region of the 16S rRNA genes was used to characterize the fungal and bacterial communities respectively. Viable bacterial isolates were also identified by Sanger sequencing of the V1-V4 region of the 16S rRNA gene. Physicochemical analyses and a sensory discriminating triangular test were also done. Our results showed that the dominant microorganisms identified within labneh Ambaris (*Lactobacillus kefiranofaciens, Lentilactobacillus kefiri, Lactococcus lactis, Geotrichum candidum, Pichia kudriavzevii* and *Starmerella sp*.) settle early in the product and remain until the end of maturation with varying abundances throughout fermentation. Microbial counts increased during early fermentation stage, remained stable during mid fermentation and declined during maturation. While microbial compositions were globally comparable between the two jars during mid fermentation and maturation stages, differences between the two jars were mainly detected during early fermentation stage (D0 till D10). Our results suggested the possible presence of residual microorganisms in the

used jar remaining from previous productions that inoculated the milk and took rapidly over fermentation. Neither coliforms nor *Enterobacteriaceae* were detected in their viable state starting D7 in both jars.

Keywords: microbial dynamics, house microbiota, milk fermentation, DNA metabarcoding.

1. Introduction

Fermented milks result from the activities of microbial communities that could either naturally inoculate milk (spontaneous fermentation) or be intentionally added, generally by "back-slopping" method (Kim et al., 2018; Lucey, 2016; Titapiccolo et al., 2011). Dairy products obtained by spontaneous fermentation are colonized by indigenous microbial communities, which could have several origins such as the milk, the production utensils, the surrounding dairy environment, and the human interventions. Some studies demonstrated that specific traditional containers such as wooden vats and calabashes exert a key role in the production of Italian and French PDO cheeses and Zambian fermented milk respectively. Interestingly, all these containers harbor biofilms that participate in the fermentation process and in the organoleptic signature of the final product (Calasso et al., 2016; Carpino et al., 2017; Didienne et al., 2012; Groenenboom et al., 2020). Spontaneous fermentations often result in highly diversified microbial communities encompassing several bacterial and fungal species (Casey et al., 2006; Groenenboom et al., 2020; Hickey et al., 2015; McHugh et al., 2021; Michailidou et al., 2021; Quintana et al., 2020; Zhong et al., 2016). Microbial communities are groups of populations that coexist in the same habitat (Burman and Bengtsson-Palme, 2021; Giraffa, 2004; Konopka, 2009). The ability of these populations to colonize and survive in the food matrix is the result of their responses to various abiotic factors, such as the change in the physicochemical conditions of their habitat (pH, salt content, and water activity) and biotic factors such as their interactions with one another (Giraffa, 2004; Groenenboom et al., 2020; Montel et al., 2014; Penland et al., 2021).

Labneh Ambaris is a traditional fermented raw goat's milk product. It is usually made at household level in Lebanese rural regions using a typical production process in special

earthenware jars. Briefly, the production process of labneh Ambaris lasts from 2 to 5 months and requires different steps characterized by regular whey drainages and additions of raw milks with coarse salt. In a previous study of ours (Abi Khalil et al., 2022a) we identified the microbial communities of labneh Ambaris samples collected at the end of maturation phase. However, and even though a recent study followed Ambaris production, mainly focusing on cultivable yeasts (Ayoub et al., 2022), the presence, dynamics as well as the possible origins of labneh Ambaris microbial communities throughout fermentation were not fully explored. The earthenware jars used for the production of labneh Ambaris withstand productions for several seasons but producers have to renew them regularly. While such traditional products are mainly sought after for their typical sensory characteristics which arise from the microbial communities' activities, producers wonder if the replacement of their jars risks provoking their products to lose their typicality. Therefore, the main objective of our study was to explore the physicochemical characteristics and microbial dynamics during labneh Ambaris production from the initial raw milk till the final product throughout 3 stages: early fermentation, mid-fermentation and maturation. Two productions were explored in parallel, one in an earthenware jar that was used for several production seasonsand another one that has never been used, in order to verify if any residual flora could affect the microbial populations of labneh Ambaris. Culture-dependent and independent microbiological methods, in addition to physicochemical parameters, were studied throughout production and a sensory discriminating test was used to assess if any differences could be detected between the two finished products.

2. Materials and methods

2.1. Labneh Ambaris production and sampling

The selected producer for our study manufactures labneh Ambaris was selected according to the traditional production process. The production facility is located in Chouf district in Lebanon. Two labneh Ambaris productions were initiated simultaneously from June till October 2021, each in a distinct but comparable earthenware jars (in terms of capacity, shape and material). The first one had already been used for labneh Ambaris production

during previous seasons (referred to as used jar) while the second one was new (referred to as new jar). Throughout the production process, all samples were collected from both jars at the same time for comparisons. Details of the production process as well as the collected samples are presented in Supplemental Figure S1. With each raw milk addition, a fixed quantity of 500 g of coarse salt were added to each of the jars. The production process of labneh Ambaris was divided into three stages. 1) early fermentation stage from D0 till D10 where raw goat's milk and coarse salt were added to the jar at D0 and left to ferment without interventions till the first whey drainage was done at D10 indicating the first formation of coagulum and the end of this stage, 2) mid fermentation stage, from D10 till D93, characterized by regular whey drainages and additions of raw milks with coarse salt and 3) maturation stage which starts after the last whey drainage (from D93 till D103) and ends when the product is to be transferred out of the jar for long term conservation.

All fermented milks collected from both jars were subjected to microbiological enumeration, pH measurements and salt contents determination. The initial raw milk (RM-D0) was subjected to microbiological enumeration and pH measurement. All collected samples (fermented milks and raw milks) were analyzed by culture-independent microbial analysis. Culture-dependent analyses were done for samples collected from both earthenware jars for the following fermentation days: D0, D2, D4, D10, D47, and D100. The choice was based on the pH values measured during each stage. Sensory analysis was done for the finished products at D103 for both jars. The detailed analytical approach is shown in Figure 1.

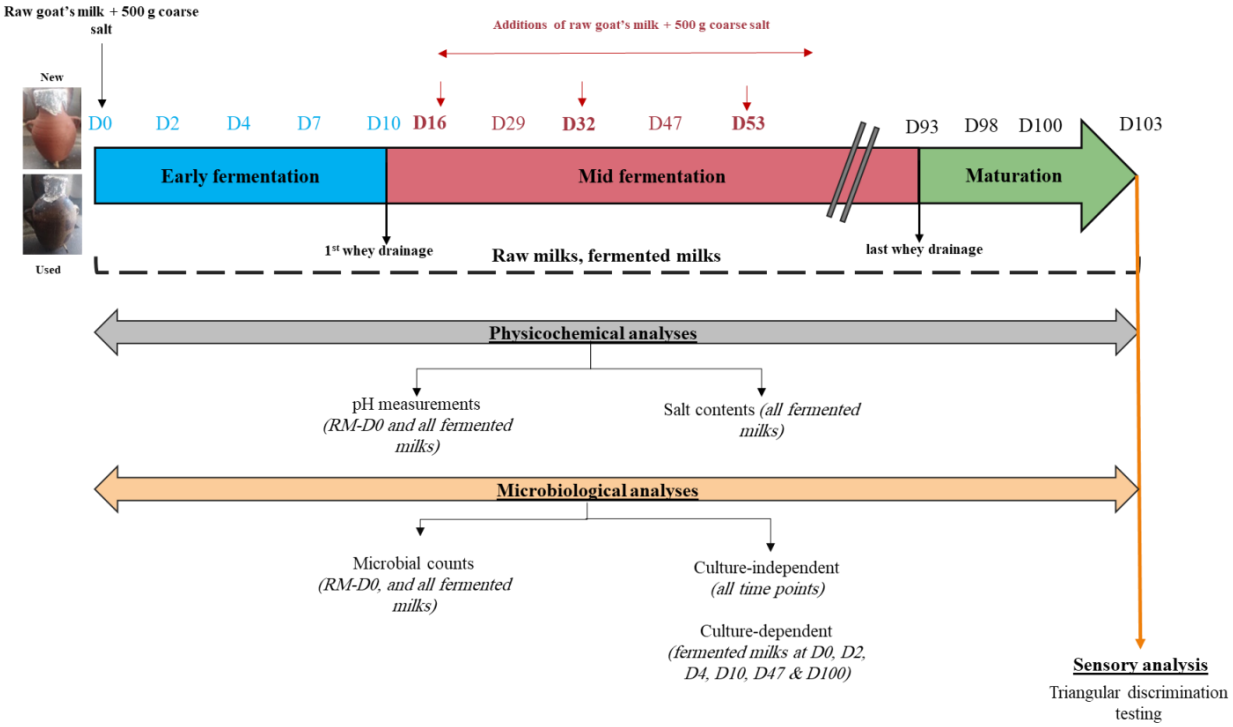


Figure 2. Analytical approach for the analyses of 2 labneh Ambaris productions during fermentation, one made in a used earthenware jar and the other in a new one.

2.2. Physicochemical analyses

The pH values were recorded at room temperature for all fermented milks and the initial raw milk RM-D0, using a calibrated pH meter (HQ11 HD, HACH, United Kingdom). Salt contents (%) were analyzed for all fermented milks according to NF EN ISO 5943.

2.3. Microbiological analyses

2.3.1. Microbial enumeration

To enumerate microorganisms, the collected samples were directly placed at 4°C and used for the preparation of appropriate 10-fold decimal dilutions in sterile buffered peptone water (Scharlau, Spain). The diluted suspensions were plated on five nutritive and selective media: PCA for total mesophilic aerobic flora, MRS for mesophilic lactobacilli, YPD for

Yeast and molds (supplemented with 8 ml/L penicillin-streptomycin antibiotic solution 100X, BioWest, France), VRBG for *Enterobacteriaceae* and VRBL for coliforms. PCA and MRS media were incubated at 30 °C for 72 hours, YPD at 25 °C for 5 days and VRBG and VRBL at 37 °C for 24 hours. Results were expressed as log cfu/g of fermented milk samples and log cfu/ml of raw milk samples. After plating, sterile glycerol (20% [vol/vol]) was added to one of the two initial 10-fold dilutions and kept at -20 °C for bacterial species identification on culture dependent media described below.

2.3.2. Microbial enumeration

2.3.2.1. Enumeration, isolation and identification of presumptive lactobacilli

The viable presumptive lactobacilli in the fermented milks were identified throughout fermentation in both earthenware jars based on the method described by Zanirati et al., (2015) with modifications. Briefly, serial dilutions were plated on MRS agar (Biokar, France) dissolved in lactic whey (lwMRS, pH 5.5) supplemented with natamycine (18 mg/ml of Delvo®Cid Instant, DSM, The Netherlands). The plates were then incubated at 30 °C for 14 days in a microaerophilic controlled atmosphere (BD GasPak EZ Campy Gas generating Pouch System, BD (Beton, Dickinson and Company, USA) containing between 5 and 15% oxygen. After incubation, the resulting colonies were enumerated and 10% from plates with 30 to 300 colonies were isolated based on different morphologies. The isolated colonies were then cultivated in MRS broth (Biokar, France) at 30 °C for 48h. The bacterial isolates were then purified 3 times on MRS agar (Biokar, France) supplemented with natamycine (18 mg/ml of Delvo®Cid Instant, DSM, The Netherlands) and then were subjected to Gram and catalase tests to identify the presumptive lactic acid bacteria (LAB)

as Gram-positive, catalase-negative. All of the isolated purified colonies were stored at -20°C in MRS broth (Biokar, France) supplemented with 20% sterile mixture of glycerol (15%) and skim milk (85%).

2.3.2.2. LAB identification using 16S rRNA gene sequencing

The chosen purified isolates (146 isolates), representing all different morphologies, were cultured by inoculation 50 µl of conserved tube in 5 ml of MRS broth and incubated at 30 °C for 48h. Then, 1 ml of the overnight cultures were placed in a sterile tube and centrifuged to remove the broth. The bacterial pellet was then suspended in 200 µl sterile deionized PCR-grade water and vortexed to mix. The resulting suspension was used as the DNA for subsequent colony PCR. For the isolates where negative colony PCRs were obtained, DNA extractions were done using DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Germany). Presumptive LAB were then identified by sequencing of the V1-V4 region of the 16S rRNA gene. For each PCR tube representing one bacterial strain, the mix was made as follows: 1 µL DNA, 15.75 µl deionized water, 5 µl Q5 buffer reaction 5X (New England Biolabs, Ipswich, England), 0.5 µL dNTPS 10 mM, 1.25 µl Forward primer 10 µM (5' – GAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'), 1.25 µl reverse primer 10 µM (5' – TGGACTACCAGGGTATCTAAT - 3') and 0.25 µl High-fidelity Taq polymerase (New England Biolabs, Ipswich, England). PCR was performed with the following amplification program: 98 °C for 5 min, 30 cycles at 98 ° for 10 s, 63 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min. the resulting PCR products of approximately 806 bp were then purified before sequencing according to the method of Sanger et al. (Sanger et al., 1977). The

sequences were then determined using BLASTN program with the standard databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.3.2.3. Culture-independent analysis: DNA extraction, metabarcoding sequencing and bioinformatics

The DNA metabarcoding analyses were performed as described by (Abi Khalil et al., 2022a). Briefly, total DNA was extracted using the DNeasy PowerFood Microbial Kit (Qiagen Hilden, Germany). DNA concentrations were then adjusted to 10 ng/µL. Mock communities (a mix of equimolar DNA concentrations 10 ng/µL of several known species) were added for bacterial and fungal sequencing supplemented with the species *Geotrichum candidum* in the fungal mock.

The bacterial and fungal diversities were evaluated by DNA metabarcoding sequencing of the amplified V3 – V4 region of the 16S rRNA gene for bacteria and ITS2 region for fungi. These regions were amplified and sequenced by Illumina MiSeq as described in our previous study (Abi Khalil et al., 2022a). All amplicons were purified, quantified and then pooled together to constitute the library which was then sequenced with an Illumina MiSeq protocol, generating 300 bp paired-end reads. The resulting sequences were analyzed consecutively using the DADA2 (Callahan et al., 2016) and FROGS (Escudié et al., 2018). The pre-processing steps were carried out using DADA2 package version 1.14.1 in R program version 3.6.1. This resulted in Amplicon Sequence Variants (**ASVs**) tables. Taxonomic affiliations using DAIRYdb database version 2.0 (Meola et al., 2019) for 16S rRNA gene and UNITE database version 8.2 (Nilsson et al., 2019) for ITS2 sequences was done using FROGS version 3.2.2 (Escudié et al., 2018). Multi-affiliations were then checked using the affiliation Explorer (Mariadassou, 2021). Bacterial and fungal ASVs

tables were rarefied while creating the Phyloseq Objects with FROGSSTAT Phyloseq Import Data (Galaxy Version 3.2.2) before assessing the samples' diversities. Species diversity within each sample was estimated by the α-diversity indices "richness", and Shannon using FROGGSTAT Phyloseq Alpha Diversity tool (Galaxy Version 3.2.2). Bray-Curtis dissimilarity indices were used to estimate species diversity between the samples. These indices were calculated using FROGGSTAT Phyloseq Beta Diversity tool (Galaxy Version 3.2.2). Hierarchical clustering of the fermented milks of both jars based on Ward linkage method and Bray-Curtis matrix was then applied and visualized using FROGSSTAT Phyloseq Sample Clustering tool (Galaxy Version 3.2.2).

2.4. Sensory triangular testing

A triangular test was performed to determine whether there are sensorial differences between labneh Ambaris produced in used and new jars. Twenty-five panelists, 15 women and 10 men between the ages of 24 and 65, were chosen. Panelists were informed about the products' nature and provided written consent to take part in the analysis.

Before serving the panelists, the refrigerated samples were kept at room temperature. Finished labneh Ambaris samples (U-D103 and N-D103) were coded with 3-digit random codes and approximately five g of each sample was presented to the panelists at the same time. For every panelist, three samples were presented: one sample that was repeated twice next to the remaining one and panelists were asked to choose the different/odd sample. They were asked to cleanse their palates with a small piece of Lebanese bread (pita) then with room temperature water between samples.

Statistical tests. According to ISO 4120:2021 norm - sensory analysis methodology -

triangle test, a minimum of 17 correct answers are required for a panel of 25 judges to say that the two samples are not significantly different with a confidence interval of 99.99%.

3. Results

3.1. Evolution of the pH values and salt contents during labneh Ambaris production

During early fermentation stage (D0 till D10), pH measurements in both jars showed a rapid decrease at D2 with slightly lower values in the used jar compared to the new one (3.55 units vs. 3.79 units respectively (Figure 2A). Values continued to drop until reaching 3.35 and 3.51 values at D10 for the used and the new jar respectively. The pH values continued to decrease at the beginning of the mid fermentation stage until reaching minimum similar values at D29 (3.14 for the used and 3.19 for the new) and then remained almost stable during this stage. During maturation stage (from D93 till D103), a slight increase was observed in both jars with final pH values of around 3.33 units.

Salt contents (Figure 2B) were higher in the new jar than in the used one. The values in both jars increased gradually until reaching their maximum at D47 for the used jar with 7% and at D93 for the new jar with 7.75%. The values then decreased until reaching D103 with 2.75% and 3.79% for the used and the new jars respectively in the end products.

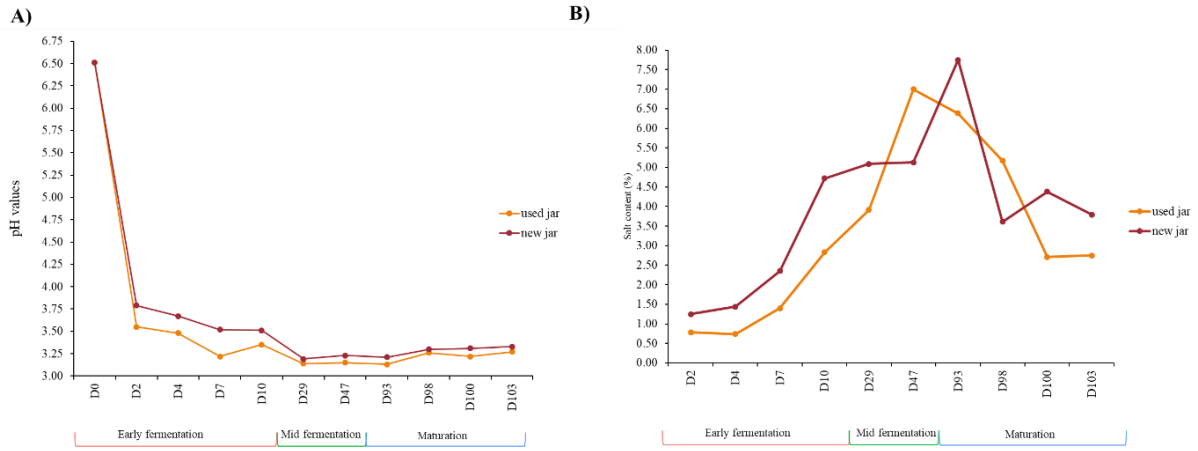


Figure 3. Evolution of the pH values (A) and salt contents (B) of labneh Ambaris samples collected throughout production from two earthenware jars: one used and one new.

3.2. Microbial dynamics during labneh Ambaris production

3.2.1. Overtime variation of microbial counts

Microbial populations' counts were monitored on 5 nutritive and selective media from D0 till D103 during labneh Ambaris productions made in a used and a new earthenware jars. The microbial counts obtained are detailed in Supplemental Table S2. The initial raw milk RM-D0 used to start both productions harbored high total mesophilic aerobic flora as well as yeasts and fungal populations (6.26 $\log_{10}$ cfu/g and 6.00 $\log_{10}$ cfu/g respectively). Lower counts of presumptive lactobacilli were detected with 4.46 $\log_{10}$ cfu/g. Bacterial species belonging to the *Enterobacteriaceae* family as well as coliforms were detected in comparable concentrations with 4.72 $\log_{10}$ cfu/g and 4.82 $\log_{10}$ cfu/g respectively in RM-D0. The groups of microorganisms presented in Figure 3 followed mainly the same trend in both jars. For the three microbial groups total mesophilic aerobic flora (Figure 3A), the presumptive lactobacilli (Figure 3B) and yeasts and molds (Figure 3C), during the early fermentation stage, microbial counts increased in both jars with noticeable fluctuations.

The values remained globally stable during the mid-fermentation stage and showed a decrease during maturation stage. Concerning the species belonging to the *Enterobacteriaceae* family and coliforms, counts were 2 logs higher in the used jar at D2 vs. the new one (Supplemental Table S2). Coliforms were not detected in their viable state starting D4 in the used jar samples and D7 for the new one whereas the species belonging to the *Enterobacteriaceae* were not detected in both jars starting D7.

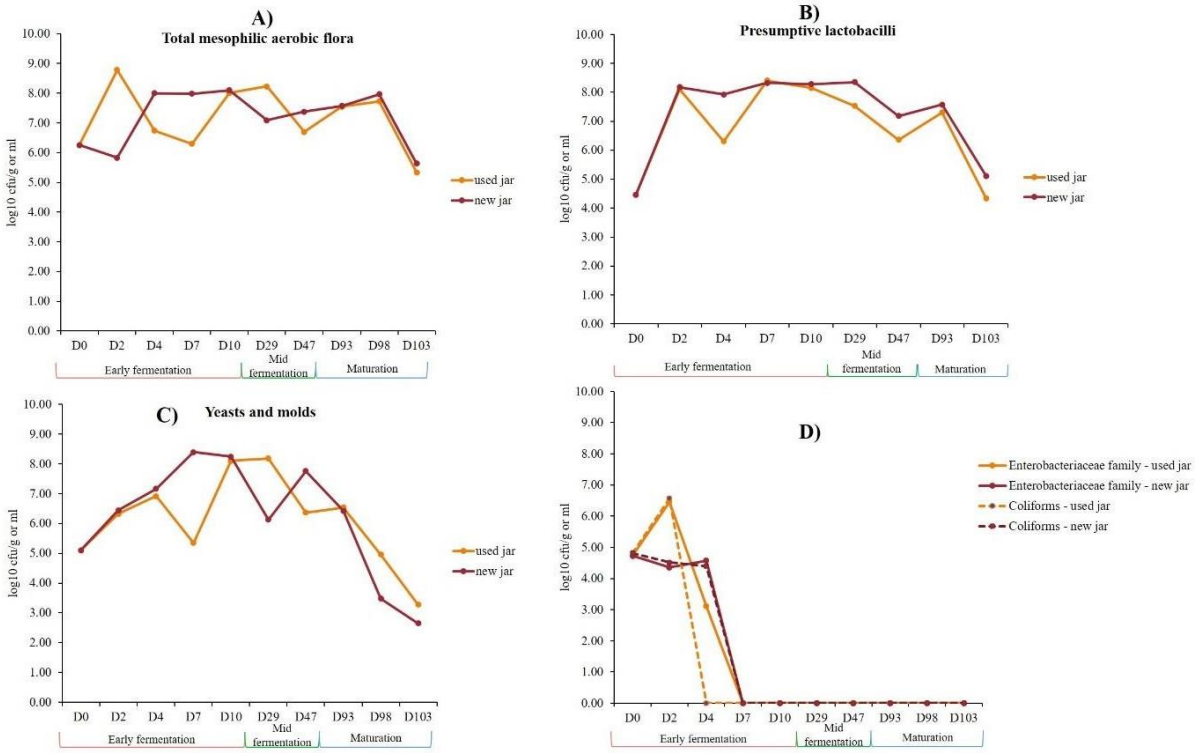


Figure 4. Microbial counts obtained on five nutritive and selective media for A) Total aerobic mesophilic flora, B) presumptive lactobacilli, C) yeasts and molds, D) *Enterobacteriaceae* family and coliforms, during production of labneh Ambaris from D0 until D103.

3.2.2. Microbial diversity dynamics throughout fermentation stages: α and β indices

The V3-V4 region of the 16S rRNA gene and the ITS2 sequencing analyses resulted, after quality filtering, denoising and merging, in a total of 1,209,227 reads with an average of 50,384 reads per sample for 16S and 514,220 reads with an average of 21,425 reads per sample for ITS2. Final sequences (811,644 reads for 16S and 509,662 reads for ITS2) were then clustered into 509 and 50 Amplicon Sequences Variants (ASVs) for 16S and ITS2 respectively after chimera removal. After normalization by rarefaction, 20,204 and 9663 sequences were kept per sample for 16S and ITS2 respectively. Alpha diversity indices were calculated based on ASVs tables for the fermented milks collected from both earthenware jars from D2 to D103 as well as the initial raw milk RM-D0 to investigate the bacterial and fungal diversity dynamics during production in each jar as well as to compare the microbial dynamics of the two jars one to another (Figure 4).

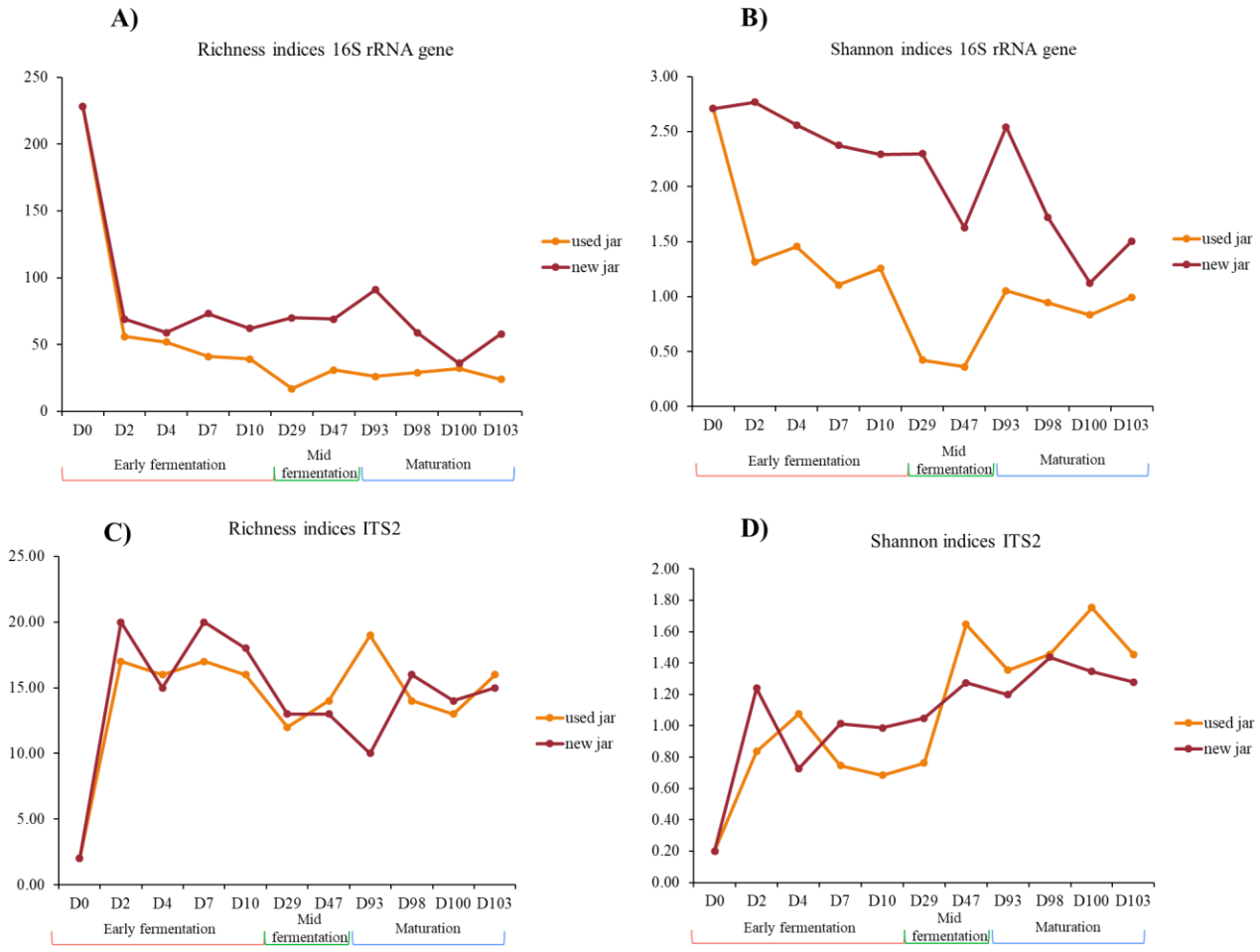


Figure 5. Bacterial (A and B) and fungal (C and D) metrics of alpha diversity indices for labneh Ambaris samples collected at different production stages from two earthenware jars used and new.

Concerning bacterial metrics, the raw milk (RM-D0) showed the highest richness index with 228 ASVs (Figure 4A) representing 103 species. The richness indices greatly dropped within 2 days of fermentation in both jars and remained stable from early fermentation till maturation stages (Figure 4A). The indices of the samples collected from the used and the new jar showed mainly similar trends during fermentation with slightly lower indices in the used than the new one. Indeed, by the end of mid-fermentation at D47, richness indices were almost double in the new jar (62 ASVs representing 42 species) than the used one (31

ASVs representing 21 species). The differences remained almost the same between both jars until the end of maturation stage where 18 species and 37 species were detected in U-D103 and N-D103 respectively. The highest Shannon indices were recorded for the initial raw milk RM-D0 with a value of 2.71. Same as for the richness indices, Shannon indices showed an overall decrease during fermentation in both jars. Overall, lower Shannon indices were observed in the used jar samples throughout all fermentation stages with their minimum in mid-fermentation D29 and D47 (0.42 and 0.36 respectively vs 2.30 and 1.63 for N-D29 and N-D47 respectively) meaning that during this stage, the samples were mostly dominated by few bacterial species. Higher Shannon indices were recorded for the new jar samples, with their maximum at D2 and D4 of fermentation (2.77 and 2.56 respectively vs 1.31 and 1.45 for U-D2 and U-D4) meaning that higher bacterial diversity was observed in the new jar samples compared to the used jar one mostly during the early fermentation stage.

As for the fungal metrics, they followed opposite trends compared to bacterial ones. The richness indices greatly increased following D2 of fermentation (from 2 in RM-D0 to 17 and 20 in U-D2 and N-D2 respectively). No particular changes were noted between the stages of fermentations within the same jar and the indices showed the same trends when comparing the 2 jars together (Figure 4C). Slightly higher indices for the samples collected from the new jar were recorded, except for D93, where the richness index for U-D93 was 19 vs. 10 for N-D93. As for Shannon indices, the values increased during fermentation in both jars. The minimum values were recorded for samples N-D4 and U-D10 with 0.72 and 0.68 respectively each mainly dominated by one fungal species. The maximum values were recorded for samples N-D98 and U-D100 with 1.44 and 1.75 respectively.

Based on Bray-Curtis dissimilarity indices for bacterial, the Hierarchical Ascendant Classification (HAC) revealed that fermented milks were mainly clustered according to the fermentation stages (Figure 5). The bacterial clustering showed that during early fermentation stage, the new jar samples clustered together and remotely from the used jar samples that constituted a group of their own, meaning that the bacterial abundances were different at this stage between the 2 jars. As the fermentation went on, samples of the used and the new jar were clustered in the same group for the mid-fermentation stage except for sample N-D29. For the end of fermentation stage (maturation), samples were clustered together independently of the jar, showing that the bacterial abundances were similar for the 2 jars especially for samples collected at D98, D100 and D103 (Figure 5A). For fungal communities, clustering according to fermentation stage was less obvious than that of the bacterial communities (Figure 5B). However, samples collected from the used jar during maturation stage clustered together. Additionally, most samples collected from both jars during the early stages of fermentation were pooled together (N-D2, U-D2, U-D7, U-D10 and N-D4). Samples taken in the middle of the fermentation process were dispersed among the other samples.

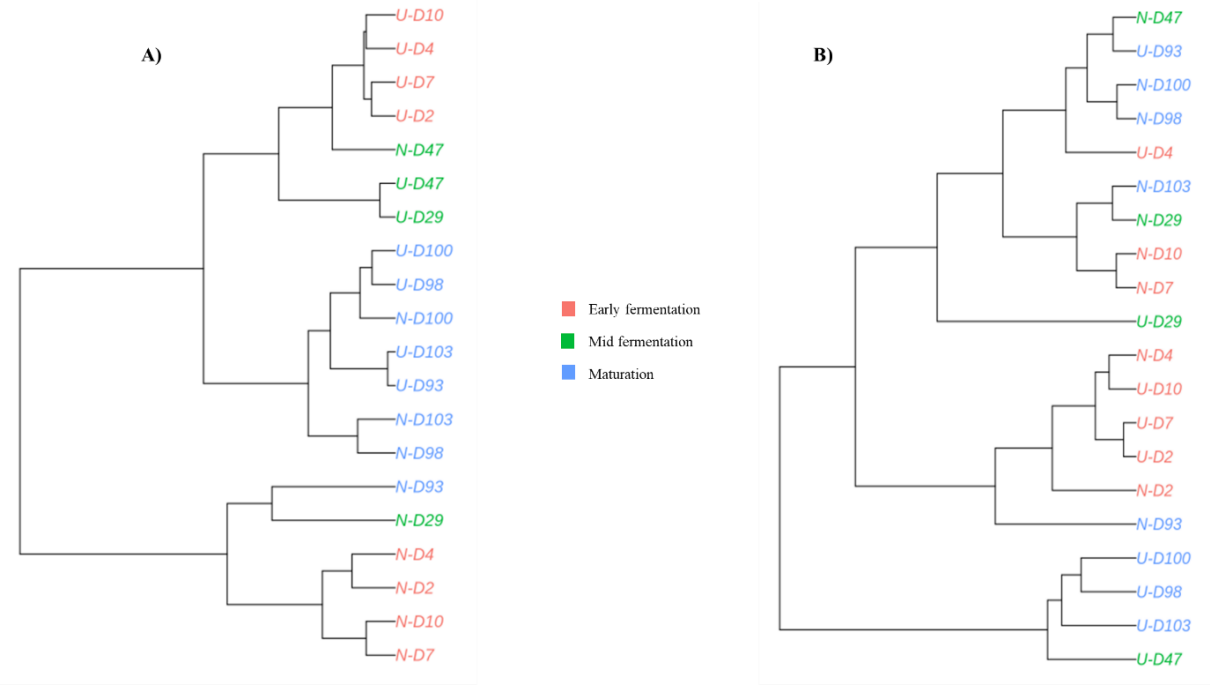


Figure 6. Hierarchical Ascendant Classification (HAC) based on Bray-Curtis dissimilarity indices for bacterial (A) and fungal (B) communities of labneh Ambaris samples collected from a used - U and a new - N earthenware jar throughout production. Samples are color coded according to the fermentation stages: pink for early fermentation (D2 to D10), green for mid fermentation (D29 to D47) and blue for maturation (D93 to D103).

3.2.3. Microbial dynamics and species identification throughout fermentation

Bacterial compositions analyzed by DNA metabarcoding, showed that raw milk samples were dominated by the bacterial genera *Enterobacter* (22.84% of total sequences), *Chryseobacterium* (16.00%), *Acinetobacter* (11.46%), *Mycoplasma* (9.44%) and *Enterococcus* (8.72%). Concerning all the fermented milk samples, the most abundant bacterial genera were *Lactobacillus* (62.73% of total sequences), followed by *Lentilactobacillus* (17.87%), *Lactococcus* (7.78%), *Citrobacter* (2.17%) and *Enterobacter* (2.02%). Some species of *Lentilactobacillus* genus could not be identified and gave several options when blasted into the actual databases: *kefiri/otakiensis/sunkii* or

hilgardii/diolivorans. The three bacterial species *L. kefiranofaciens, Lentilactobacillus sp.* and *L. lactis* were present in almost all the samples but with varying abundances. It was noticeable that the bacterial composition of raw milks differed from that of the fermented milks (Figure 6). The 10 most abundant bacterial species within the raw milks and fermented milks of each jar are illustrated in Figure 6. As for the culture-dependent method, a total of 146 bacterial isolates were collected from the raw and fermented milks from both jars and were identified based on the current databases. *L. kefiri* was the dominant species in both jars throughout the production process. It was either accompanied by *L. kefiranofaciens,* or *Lentilactobacillus diolivorans* or both at the same time. The identified bacterial isolates selected from the initial raw milk RM-D0 and at some points throughout fermentation (D0, D2, D4, D7, D10, D47 and D100) are presented in Supplemental Table S2.

Concerning the fungal communities, regardless of the jar, the most abundant fungal genera were *Geotrichum* (55.54% of total sequences), followed by *Pichia* (20.60%), *Starmerella* (10.12%), and *Moniliella* (9.53%). Raw milk samples were dominated by *Geotrichum* with 77.56% of total sequences, followed by *Diutina* (9.07%) and *Starmerella* (3.58%) genera. It was noticeable that neither *Pichia kudriavzevii* nor *Moniliella sp.* were detected in any of the added raw milks while they were present in the fermented milks. The 10 most abundant fungal species within the raw and fermented milks of each jar are illustrated in Figure 7.

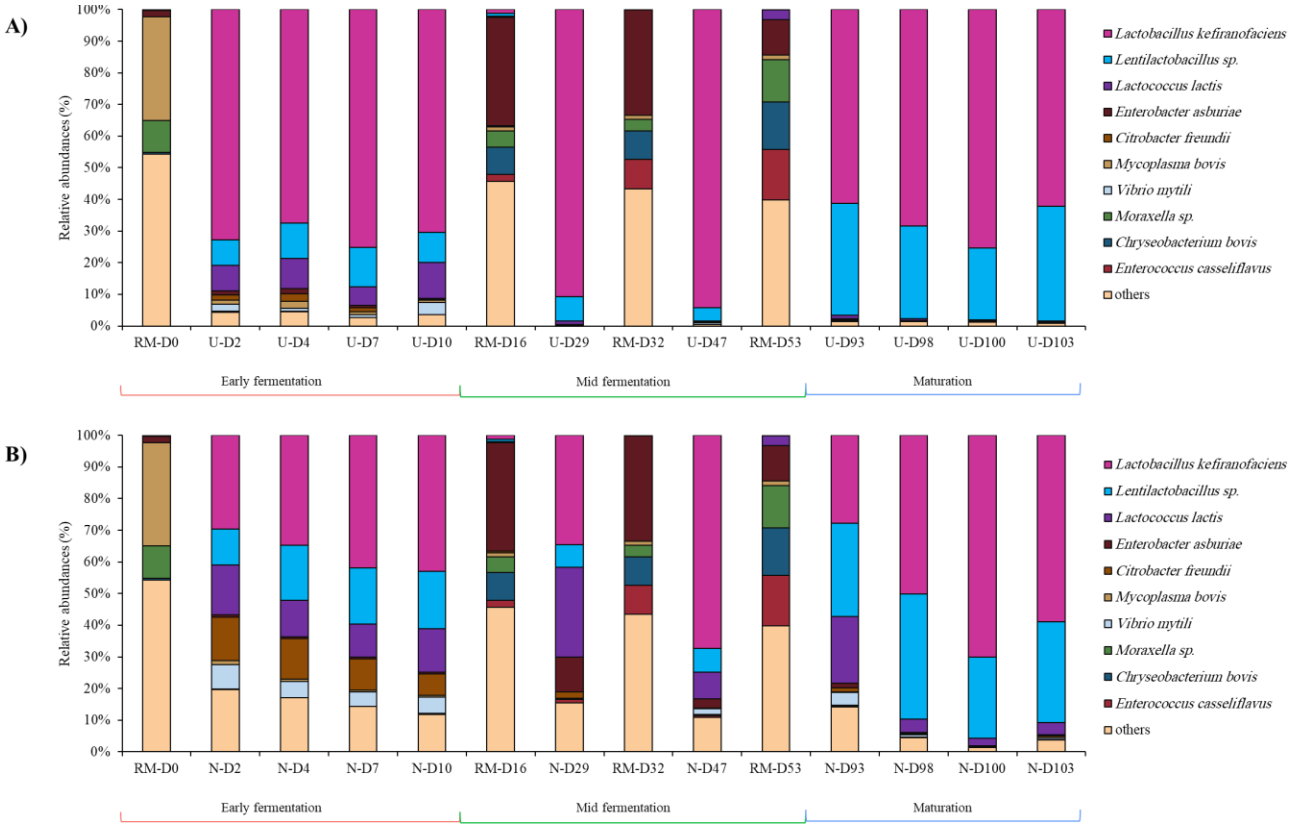


Figure 7. Bacterial communities' dynamics in labneh Ambaris samples collected during production from 2 earthenware jars, one used - U (A) and one new - N (B), in addition to the raw milks added during production by sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene.

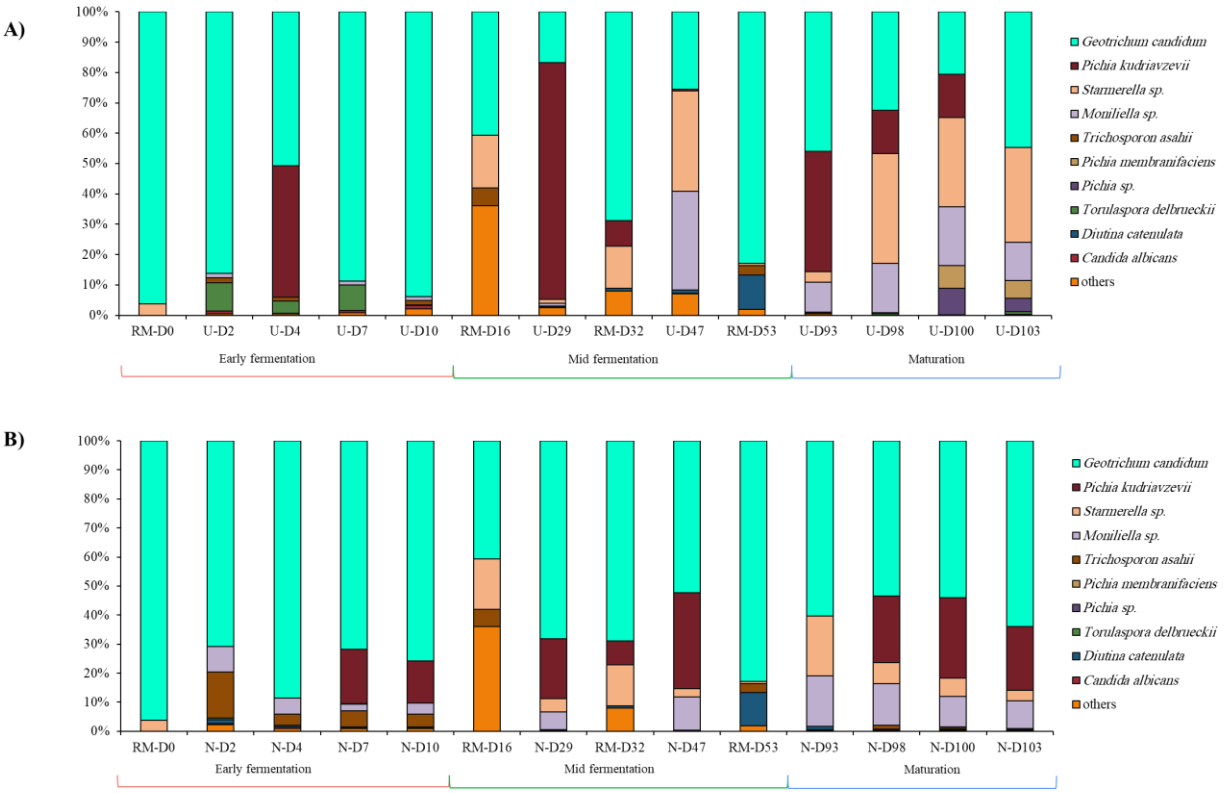


Figure 8. Fungal communities' dynamics in labneh Ambaris samples collected during production from 2 earthenware jars, one used - U (A) and one new - N (B), in addition to the raw milks added during production by sequencing of the ITS2 region.

Early fermentation stage

During this stage (D0 till D10), bacterial compositions within each jar had similar compositions and relative abundances between the time points. When compared one to another, the used and the new jar samples showed differences mainly in the relative abundances of the detected species. The initial raw milk RM-D0 was dominated by the bacterial species *Mycoplasma bovis*, *Chryseobacterium indoltheticum* and *Acinetobacter johnsonii* (presented in the "others" in Figure 6). *L. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus sp.*were detected in very low abundances in RM-D0 (0.19% and 0.05% respectively) and *L. lactis* was not detected at all, but their relative abundances quickly increased within 2 days

of fermentation in both jars. *L. kefiranofaciens* quickly became the dominant species within the used jar from D0 till D2 and remained as such until D10, whereas it was detected in much lower percentages in the new jar (72.89% in U-D2 vs. 29.69% in N-D2) during this fermentation stage. *Lentilactobacillus sp.* and *L. lactis* were present in both jars with comparable relative abundances. *Citrobacter freundii* was detected in higher abundances in the new jar samples at D2 (1.65% relative abundance in U-D2 vs 13.78% relative abundance in N-D2) and these abundances remained higher in the new jar during this fermentation stage. As for the identified isolates, the microbial counts were identical in both jars for all stages except U-D7 where no counts were detected (Supplemental Table S3). More than 50% of the isolates in RM-D0 were either identified as *Enterococcus faecium* or co-assigned to the *Enterococcus durans* species. The remaining 50% of the isolates were identified as *Lentilactobacillus kefiri*. This specie was the main identified one during the early fermentation stage, noting that it was present at all time points always representing a minimum of 50% of the identified isolates except for D10 where it was in comparable presence along with *L. kefiranofaciens* in both jars.

Concerning fungal communities analyzed by DNA metabarcoding, the initial raw milk RM-D0 was dominated by *Geotrichum candidum* with more than 96% of relative abundance and *Starmerella sp.* with 3.8% relative abundance. *G. candidum* was the dominant fungal species in all fermented milks during early fermentation stage with almost stable abundances between time points within the same jar. During the early fermentation stage, *Torulaspora delbrueckii* was detected in higher abundances in the used jar samples (9.32% in U-D2) compared to the new one (0.62% in N-D2). Whereas *Trichosporon asahii*

had higher relative abundances in the new jar samples compared to the used one (15.87% in N-D2 vs 1.77% in U-D2). *Moniliella sp.* was detected in almost all fermented milks starting D2. *Pichia kudriavzevii* was sporadically detected during this stage in samples U-D4, N-D7 and N-D10 (Figure 7).

Mid-fermentation stage

Throughout this stage (includes samples collected at D29 and D47), the bacterial composition and relative abundances in the new jar samples changed from one time point to the other according to the addition of raw milks that were dominated by *Enterobacter asburiae* and other Gram negative bacteria. Indeed, after each addition of raw milk, *Enterobacter asburiae*'s relative abundances increased in the new jar samples compared to the used one (11.03% in N-D29 vs. 0.13% in U-D29). Contrarily, the compositions of the used jar samples were mostly stable during this stage with always *L. kefiranofaciens* as the dominant species (more than 90% relative abundances in U-D29 and U-D47) accompanied by *Lentilactobacillus sp.* (Figure 6A). The species *L. lactis* was almost not detected in the used jar samples during mid fermentation stage whereas it was present in the new jar samples with 28% and 7.6% relative abundances at N-D29 and N-D47 respectively. As for the identified isolates from D47 samples, *L. kefiri* was still the dominant identified species in U-D47 with 84.62% of identified isolates whereas *L. kefiranofaciens* was the abundant one in N-D47 with 47% of isolates (Supplemental Table S3).

As for fungal communities identified by DNA metabarcoding during this stage, *G. candidum* was identified in all samples with varying abundances and in the added raw

milks with high abundances. *P. kudriavzevii* was detected in a very high abundance in U-D29 (almost 78% relative abundance) but not in the previous time point U-D10, noting that it was not detected in RM-D16. *Starmerella sp.* was detected for the first time in mid fermentation samples of both jars whereas it was not in early fermentation stage.

Maturation stage

Overall, the bacterial compositions of both jar samples were comparable during this stage, except for the abundance of *L. lactis* that showed high values in the new jar samples (especially N-D93 with 21.06%) while it was not detected in the used jar samples. Apart from *L. lactis* in the new jar, the bacterial species *L. kefiranofaciens* and *Lentilactobacillus sp.* dominated the samples during this stage. On lwMRS culturing media, *L. kefiri* was still the dominant species identified along with *L. kefiranofaciens* (in U-D100) and *L. kefiranofaciens* and *L. diolivorans* (in N-D100).

Concerning fungal communities, the composition of samples collected from both jars were comparable and almost stable till the end of fermentation. Overall, the same fungal species were identified in both jars during the maturation stage except for *P. kudriavzevii* that was not detected in the final product U-D103 but was present in N-D103 with 21.97% relative abundance and *Pichia membranifaciens* species that was detected for the first time in samples U-D100 and U-D103 (Figure 7).

3.3.Sensory triangular test: discrimination between used and new jars

Out of the 25 judges, 11 gave correct answers (< 17 correct answers) and were able to choose the different sample whereas the remaining 14 could not. This means that the labneh Ambaris products made in the new and the used jars were not significantly different in terms of sensory features a with a 99.99% confidence interval.

4. Discussion

The traditional production of labneh Ambaris is a long process that takes place in earthenware jars, lasts for more than two months and requires regular additions of raw goat's milk and coarse salt. In this study, we followed and compared the physicochemical and microbial dynamics occurring in two earthenware jars, throughout the production process of labneh Ambaris. While one of the jars had already been used in previous productions, the other one was new. However, the production processes of Ambaris were similar in both jars and the same milks as well as salt quantities were regularly added to the jars. At the end of maturation stage, discriminating sensory analysis was performed to detect if any differences might exist between the two end products. Our results showed that the physicochemical parameters and microbial communities followed different trends according to the production stage (early, mid and maturation) in both jars. A few differences were noticed between the used and the new jar’s microbial compositions and physicochemical parameters, mainly during the early fermentation stage. However, as the process went on, the ecosystems seemed to stabilize and differences between the two jars receded which led to end-products having comparable characteristics.

Our study confirmed that high acidity characterizes labneh Ambaris, whether during its production, or in the finished products as shown in previous recent studies where the pH values varied between 2.92 and 4.13 units (Abi Khalil et al., 2022a; Abi Khalil et al., 2022b; Ayoub et al., 2022). Very rapidly (within two days of fermentation), there was a sharp decline in pH in both jars that matched the rapid increase in microbial counts, including presumptive lactobacilli and yeasts, and is consistent with previous observations made during production of labneh Ambaris (Ayoub et al., 2022). These low pH values could be attributed to various associations between microbial species, like that of *L. kefiranofaciens* and *L. lactis*, which dominated the samples early during fermentation. Wang et al., (2021) demonstrated that these species in co-cultures resulted in lower pH values than those achieved with each species alone. In addition, the association of lactic acid bacteria and yeasts, such as *P. kudriavzevii* which was a dominant species within our samples, could also contribute to the low pH values obtained as it has been recently demonstrated (Xiao et al., 2020). The pH values remained stable during mid-fermentation which was concurrent with the stability observed in the microbial counts and is also consistent with previous observations (Ayoub et al., 2022). During maturation stage, the slight rise in the pH values in both jars could suggest that organic acids would be metabolized by fungi such as *G. candidum* which predominated in our samples during all production stages (Boutrou et al., 2006; Fröhlich-Wyder et al., 2019).

Coarse salt that was placed at D0 in each jar was gradually dissolving into the fermented milks during early fermentation stage, which explains the increase in salt contents even though no salt additions were made during this stage. Salt contents in labneh Ambaris were shown to be highly dependent on the quantities added by the producer during the process

(Ayoub et al., 2022). This explains the varying but globally increasing salt contents detected during mid fermentation stage as regular whey drainages and additions of milks with increasing coarse salt contents were made by the producer. As the maturation phase began on D93, and since no salt was further added during this stage while whey was drained till the end of the process, a gradual decrease in salt concentrations of fermented milks was observed. Due to salt's ability to dissolve in liquid media, some of it is expelled in the drained whey, while the remaining is kept in the trapped whey in curds.

A drastic decline in bacterial diversity was observed within two days of fermentation from 228 ASVs in RM-D0 to 56 ASVs and 69 ASVs in U-D2 and N-D2 respectively. Our results showed that raw milk used at D0 was mostly dominated by Gram negative bacteria compared to lesser detected lactic acid bacteria. Raw milk can harbor a wide diversity of microorganisms from different origins (Frétin et al., 2018; Montel et al., 2014) but only the species that can withstand the physicochemical characteristics of labneh Ambaris will be selected to remain and thrive within the product. No viable coliforms nor *Enterobacteriaceae* species were detected on the culturing media starting D7 of fermentation for the two jars, despite the fact that raw milks added to both jars, throughout the production, harbored a significant amount of *Enterobacteriaceae* species. The relatively prolonged contact time in high acidity and salt content conditions in labneh Ambaris could regulate these microorganisms growth and activity (Bourdichon et al., 2021; Groenenboom et al., 2020; Tornadijo et al., 2001), especially that milk additions were not frequent during the process (only three were required) which did not regularly feed *Enterobacteriaceae* or coliforms into the system contrarily to what was observed in another Ambaris production where numerous milk additions contributed to high

Enterobacteriaceae contamination throughout fermentation (Ayoub et al., 2022). In addition, LAB are known to have inhibitory effects on bacteria, especially *Enterobacteriaceae* species by the secretion of bacteriocins (Chen et al., 2019) and other antibacterial compounds like peroxides, alcohols, and carbon dioxide (Bourdichon et al., 2021; Vardjan et al., 2013). Consequently, and while Gram negative bacteria, including *Enterobacteriaceae* and coliforms were the major group detected in raw milk at D0, their quick decline explains the drastic drop of bacterial diversity during the early stage of labneh Ambaris fermentation and might have hidden any diversification that might have occurred in relation to other bacterial species, such as LAB species. Bacterial diversity then remained stable during mid fermentation and maturation stages in relation to LAB species that had stabilized and became established in the samples. On the other hand, the diversity of yeasts and molds increased importantly, almost doubling, in both jars within 2 days of fermentation in comparison to the initial raw milk (2 AVSs in RM-D0 to 17 ASVs and 20 ASVs in U-D2 and N-D2 respectively). Yeasts, that aren't usually as numerous as bacteria in raw milk (Quigley et al., 2013), might have originated from other sources to enrich the product. The low pH and high salt conditions, well tolerated by yeasts (Boutrou et al., 2006; Fleet, 1990; Fröhlich-Wyder et al., 2019; Quigley et al., 2013), should have then allowed them to thrive and be maintained during the production.

The dominant bacterial (*L. kefiranofaciens*, *L. kefiri* and *L. lactis*) and fungal (*G. candidum*, *P. kudriavzevii* and *Starmerella sp.*) species that were detected rapidly in the fermented milks were not all detected in the raw milk used at D0. Only *L. kefiri*, *L. kefiranofaciens*, *G. candidum* and *Starmerella sp.* were identified in the initial raw milk at very low percentages. Additionally, during mid fermentation and maturation stages, *Moniliella sp.*

was detected in high abundances in the fermented milks while it never appeared in the raw milks. Furthermore, DNA metabarcoding revealed a much higher abundance of *L. kefiranofaciens* in the used jar than in the new jar as early as D2 (which was accompanied by slightly lower pH values) while both jars had comparable viable counts of presumptive lactobacilli. These observations might suggest that other sources than raw milk contribute to inoculating the fermented milks. It has been shown that microorganisms could be introduced into dairy products from an in-house microbiota already established within the production environment (on utensils for example) or from human interventions (Fröhlich-Wyder et al., 2019; McHugh et al., 2021; Michailidou et al., 2021; Oberg et al., 2022). Interestingly, an observation reported in a previous study of ours might consolidate the hypothesis of an established in-house flora. Indeed, in the study by Abi Khalil et al., (2022a), three labneh Ambaris samples were collected during a previous production season from the same producer's facility where the current productions of this study were conducted. Results of that study had shown that out of all collected samples from 17 different producers, a unique and distinctive presence of *Moniliella sp.* was recorded within all samples collected from this same producer. In our case, one of the in-house sources of inoculation might be the inner surface of the used jars. Indeed, through the development of biofilms, microorganisms, such as *L. kefiranofaciens* (more abundant in the used jar since the start of fermentation), can remain from earlier productions on the inner surfaces of the containers and when the conditions are ideal for growth, the microbial cells enclosed in their matrix can be released into the recently added milk (Alonso and Kabuki, 2019; Casey et al., 2006; Hickey et al., 2015).

After early fermentation stage, the dominant bacterial (*L. kefiranofaciens, L. kefiri* and *L. lactis*) and fungal (*G. candidum, P. kudriavzevii* and *Starmerella sp.*) species remained rather stable until the end of maturation stage even if some variations in abundances were recorded. Once fermentation was initiated, it can be assumed that these dominant microorganisms, already installed in high numbers in the previous coagulum remaining in the jars after whey drainage, act as natural starters that rapidly initiate the fermentation of the newly added milks and dominate the matrix. All precautions taken, due to the different production processes between the two products types, this phenomenon of inoculation of new milks can recall the one that occurs in kefir, a popular fermented milk, where kefir grains are used as natural starters that initiate new fermentations and are then collected again at the end of fermentation to inoculate the following batch.

Even though both culture-dependent and independent methods successfully identified the two dominant bacterial species present at high abundances in both jars, some discrepancies were found between the two approaches. *L. kefiri* was the most frequently found species on lwMRS media, whereas *L. kefiranofaciens* was the dominant species in almost all samples using DNA metabarcoding. Due to its demanding growth conditions, *L. kefiranofaciens* cannot be easily grown through conventional methods (Georgalaki et al., 2021). However, the two methods are also complementary. Indeed, the culture-dependent method may allow us to suppose that the co-assigned *Lentilactobacillus sp.* that couldn't be identified with DNA metabarcoding technique could be the species *kefiri* or/and *diolivorans*. Using the culture-dependent approach, a large collection of indigenous bacterial isolates was constituted. Therefore, characterizing these strains could help to

better understand their metabolic potential, and maybe use them to constitute starter cultures for Ambaris.

It is undeniable that dairy products' sensory characteristics are strongly determined by the microbial populations they harbor. The fact that both productions of labneh Ambaris had very similar microbial compositions (especially after the early fermentation stage) could explain that no significant differences were detected between the used and new jars' finished labneh Ambaris samples. Even if the new jar was 1% higher in salt contents, this was not a discriminating factor for the panelists. Salt-acid interactions occur in the human palate upon food consumption. Many studies have shown that acidity inhibits salty taste (DeSimone and Lyall, 2006; Liem et al., 2011), knowing that both labneh Ambaris samples had a similar pH of 3.3 units. To complete this first sensorial result, it could be interesting to study the aromatic compounds in labneh Ambaris and their relationship with the microbial populations present in it.

Despite the differences recorded between the two fermentations, such as the salt contents or the use of a new jar, the microbial ecosystems were found to be similar at the end of production. To confirm or deny the impact of the jar's age on the microbial profiles in this production facility, these first findings deserve to be repeated. It would also be interesting to extend this work to other production facilities. Indeed, as shown in our previous study, the microbial profiles of labneh Ambaris at the end of maturation can vary from one facility to another (Abi Khalil et al., 2022a). Thus, to go further in the study of microbial dynamics over time, especially their function, the construction of simplified synthetic consortia can be proposed to better decipher the functioning of these communities. This approach aims

to constitute a mix of several species (bacterial and fungal) in controlled conditions, allowing the study of their interactions and functions.

5. Conclusions

Overall, our results highlighted the microbial dynamics during labneh Ambaris production using both culture-dependent and independent microbiological methods. *L. kefiranofaciens, L. kefiri, L. lactis, G. candidum, P. kudriavzevii* and *Starmerella sp.* were identified as the dominant bacterial and fungal species. They settled early in labneh Ambaris and remained until the end of the process although with varying abundances according to the fermentation stage (early, mid and maturation). Differences in the bacterial compositions and their establishment within the ecosystem were recorded between the used and the new jar, especially during early fermentation stage, in addition to the presence of species in the fermented milks but not in the raw milks added. It might be supposed that the origin of the microbial populations can be, in addition to the raw milks used, the house microbiota mainly represented by the residual flora persisting in the earthenware jars from previous productions. As the fermentation went on, the systems seemed to stabilize and differences between the two jars were decreasing to obtain comparable characteristics in the end products with no detectable differences in their sensorial profiles.

6. Data availability

The sequencing data generated in this study were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) under accession number PRJEB57561.

7. Funding

This work was partially funded by a Grant from the Scientific Research Projects Program of the Lebanese University (Beirut, Lebanon).

8. Declaration of competing interest

The authors have not stated any conflicts of interest.

9. Acknowledgments

The authors would like to thank Abla Majed, the labneh Ambaris producer where the study was conducted. The authors would like to also thank Loubnah Belahcen for her assistance with the sensory analysis data treatment. Sylvain Santoni (AGAP, University of Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier SupAgro, 34000 Montpellier, France) is also appreciated for helping with the Illumina MiSeq DNA metabarcoding sequencing.

10. References

Abi Khalil, R, Yvon, S., Couderc, C., Belahcen, L., Jard, G., Sicard, D., Bigey, F., El Rammouz, R., Abi Nakhoul, P., Eutamène, H., Tormo, H., Ayoub, M.-J., 2022a. Microbial communities and main features of labneh Ambaris, a traditional Lebanese fermented goat's milk product. J. Dairy Sci. 106. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22275

Abi Khalil, R., Couderc, C., Yvon, S., Jard, G., Sicard, D., Bigey, F., El Rammouz, R., Abi Nakhoul, P., Eutamène, H., Tormo, H., Ayoub, M.-J., 2022b. Artisanal Household Milk Pasteurization Is Not a Determining Factor in Structuring the Microbial Communities of Labneh Ambaris: A Pilot Study. Foods 11, 3874. https://doi.org/10.3390/foods11233874

Alonso, V.P.P., Kabuki, D.Y., 2019. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. Int. J. Dairy Technol. 72, 472–478. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12587

Ayoub, M.-J., Bechara, P., Habchi, M., Hosry, R., Akl, M., Haj Hassan, S., Abi Nakhoul,

P., 2022. Raw goat's milk fermented Anbaris from Lebanon: insights into the microbial dynamics and chemical changes occurring during artisanal production, with a focus on yeasts. J. Dairy Res. 1–9. https://doi.org/10.1017/S002202992200067X

Bourdichon, F., Arias, E., Babuchowski, A., Bückle, A., Bello, F.D., Dubois, A., Fontana, A., Fritz, D., Kemperman, R., Laulund, S., McAuliffe, O., Miks, M.H., Papademas, P., Patrone, V., Sharma, D.K., Sliwinski, E., Stanton, C., Von Ah, U., Yao, S., Morelli, L., 2021. The forgotten role of food cultures. FEMS Microbiol. Lett. 368, fnab085. https://doi.org/10.1093/femsle/fnab085

Boutrou, R., Kerriou, L., Gassi, J.-Y., 2006. Contribution of *Geotrichum candidum* to the proteolysis of soft cheese. Int. Dairy J. 16, 775–783. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.007

Burman, E., Bengtsson-Palme, J., 2021. Microbial Community Interactions Are Sensitive to Small Changes in Temperature. Front. Microbiol. 12.

Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis, M., Gobbetti, M., 2016. Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. Food Microbiol. 54, 115–126. https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.008

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods 13, 581–583. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

Carpino, S., Randazzo, C.L., Pino, A., Russo, N., Rapisarda, T., Belvedere, G., Caggia, C., 2017. Influence of PDO Ragusano cheese biofilm microbiota on flavour compounds formation. Food Microbiol. 61, 126–135. https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.006

Casey, M.G., Häni, J.P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W., Wechsler, D., 2006. Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. Le Lait 86, 407–414. https://doi.org/10.1051/lait:2006020

Chen, C.-C., Lai, C.-C., Huang, H.-L., Huang, W.-Y., Toh, H.-S., Weng, T.-C., Chuang, Y.-C., Lu, Y.-C., Tang, H.-J., 2019. Antimicrobial Activity of Lactobacillus Species Against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. Front. Microbiol. 10:789. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789.

DeSimone, J.A., Lyall, V., 2006. Taste Receptors in the Gastrointestinal Tract III. Salty and sour taste: sensing of sodium and protons by the tongue. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 291, G1005–G1010. https://doi.org/10.1152/ajpgi.00235.2006

Didienne, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S., Montel, M.-C., 2012. Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. Int. J. Food Microbiol. 156,91–101. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.007

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

Fleet, G.H., 1990. Yeasts in dairy products. J. Appl. Bacteriol. 68, 199–211. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02566.x

Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V.-M., Pomiès, D., Ferlay, A., Montel, M.-C., Delbès, C., 2018. Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. Sci. Rep. 8, 200. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18447-y

Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., Jakob, E., 2019. Cheese yeasts. Yeast 36, 129–141. https://doi.org/10.1002/yea.3368

Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Anastasiou, R., Kazou, M., Tsakalidou, E., 2021. *Lactobacillus kefiranofaciens*: From Isolation and Taxonomy to Probiotic Properties and Applications. Microorganisms 9, 2158. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102158

Giraffa, G., 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation: Table 1. FEMS Microbiol. Rev. 28, 251–260. https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.10.005

Groenenboom, A.E., Shindano, J., Cheepa, N., Smid, E.J., Schoustra, S.E., 2020. Microbial population dynamics during traditional production of Mabisi, a spontaneous fermented milk product from Zambia: a field trial. World J. Microbiol. Biotechnol. 36, 184. https://doi.org/10.1007/s11274-020-02957-5

Hickey, C.D., Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G., Auty, M.A.E., 2015. Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. Front. Microbiol. 6. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00099

Kim, D.-H., Jeong, D., Song, K.-Y., Kang, I.-B., Kim, H., Seo, K.-H., 2018. Culture supernatant produced by *Lactobacillus kefiri* from kefir inhibits the growth of Cronobacter sakazakii. J. Dairy Res. 85, 98–103. https://doi.org/10.1017/S0022029917000802

Konopka, A., 2009. What is microbial community ecology? ISME J. 3, 1223–1230. https://doi.org/10.1038/ismej.2009.88

Liem, D.G., Miremadi, F., Keast, R.S.J., 2011. Reducing Sodium in Foods: The Effect on Flavor. Nutrients 3, 694–711. https://doi.org/10.3390/nu3060694

Lucey, J., 2016. Acid Coagulation of Milk. pp. 309–328. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_12

Mariadassou, M., 2021. affiliationExplorer. Accessed July, 2022. https://shiny.migale.inrae.fr/app/affiliationexplorer.

McHugh, A.J., Yap, M., Crispie, F., Feehily, C., Hill, C., Cotter, P.D., 2021. Microbiome-based environmental monitoring of a dairy processing facility highlights the

challenges associated with low microbial-load samples. Npj Sci. Food 5, 4. https://doi.org/10.1038/s41538-021-00087-2

Meola, M., Rifa, E., Shani, N., Delbès, C., Berthoud, H., Chassard, C., 2019. DAIRYdb: a manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. BMC Genomics 20, 560. https://doi.org/10.1186/s12864-019-5914-8

Michailidou, S., Pavlou, E., Pasentsis, K., Rhoades, J., Likotrafiti, E., Argiriou, A., 2021. Microbial profiles of Greek PDO cheeses assessed with amplicon metabarcoding. Food Microbiol. 99, 103836. https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103836

Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F., 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. Int .J. Food Microbiol. 177, 136–154. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019

Nilsson, R.H., Larsson, K.-H., Taylor, A.F.S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T.S., Schigel, D., Kennedy, P., Picard, K., Glöckner, F.O., Tedersoo, L., Saar, I., Kõljalg, U., Abarenkov, K., 2019. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. Nucleic Acids Res. 47, D259–D264. https://doi.org/10.1093/nar/gky1022

Oberg, T.S., McMahon, D.J., Culumber, M.D., McAuliffe, O., Oberg, C.J., 2022. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. J. Dairy Sci. 105, 2750–2770. https://doi.org/10.3168/jds.2021-21138

Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M., Deutsch, S.-M., 2021. Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. Int. J. Food Microbiol. 345, 109130. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109130

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol. Rev. 37, 664–698. https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030

Quintana, Á.R., Seseña, S., Garzón, A., Arias, R., 2020. Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. Animals 10, 526. https://doi.org/10.3390/ani10030526

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Titapiccolo, G.I., Corredig, M., Alexander, M., 2011. Acid coagulation behavior of homogenized milk: effect of interacting and non-interacting droplets observed by rheology and diffusing wave spectroscopy. Dairy Sci. Technol. 91, 185–201. https://doi.org/10.1007/s13594-011-0010-0

Tornadijo, M.E., Garcıa, M.C., Fresno, J.M., Carballo, J., 2001. Study of

Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. Food Microbiol. 18, 499–509. https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0423

Vardjan, T., Mohar Lorbeg, P., Rogelj, I., Čanžek Majhenič, A., 2013. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. J. Dairy Sci. 96, 2729–2736. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5829

Wang, S.-Y., Huang, R.-F., Ng, K.-S., Chen, Y.-P., Shiu, J.-S., Chen, M.-J., 2021. Co-Culture Strategy of *Lactobacillus kefiranofaciens* HL1 for Developing Functional Fermented Milk. Foods 10, 2098. https://doi.org/10.3390/foods10092098

Xiao, J., Chen, Y., Li, J., Shi, X., Deng, L., Wang, B., 2020. Evaluation of the Effect of Auxiliary Starter Yeasts with Enzyme Activities on Kazak Cheese Quality and Flavor. Front. Microbiol. 11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.614208.

Zanirati, D.F., Abatemarco, M., Sandes, S.H. de C., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C., Neumann, E., 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe 32, 70–76. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007

Zhong, Z., Hou, Q., Kwok, L., Yu, Z., Zheng, Y., Sun, Z., Menghe, B., Zhang, H., 2016. Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. J. Dairy Sci. 99, 7832–7841. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10825

SUPPLEMENTARY DATA

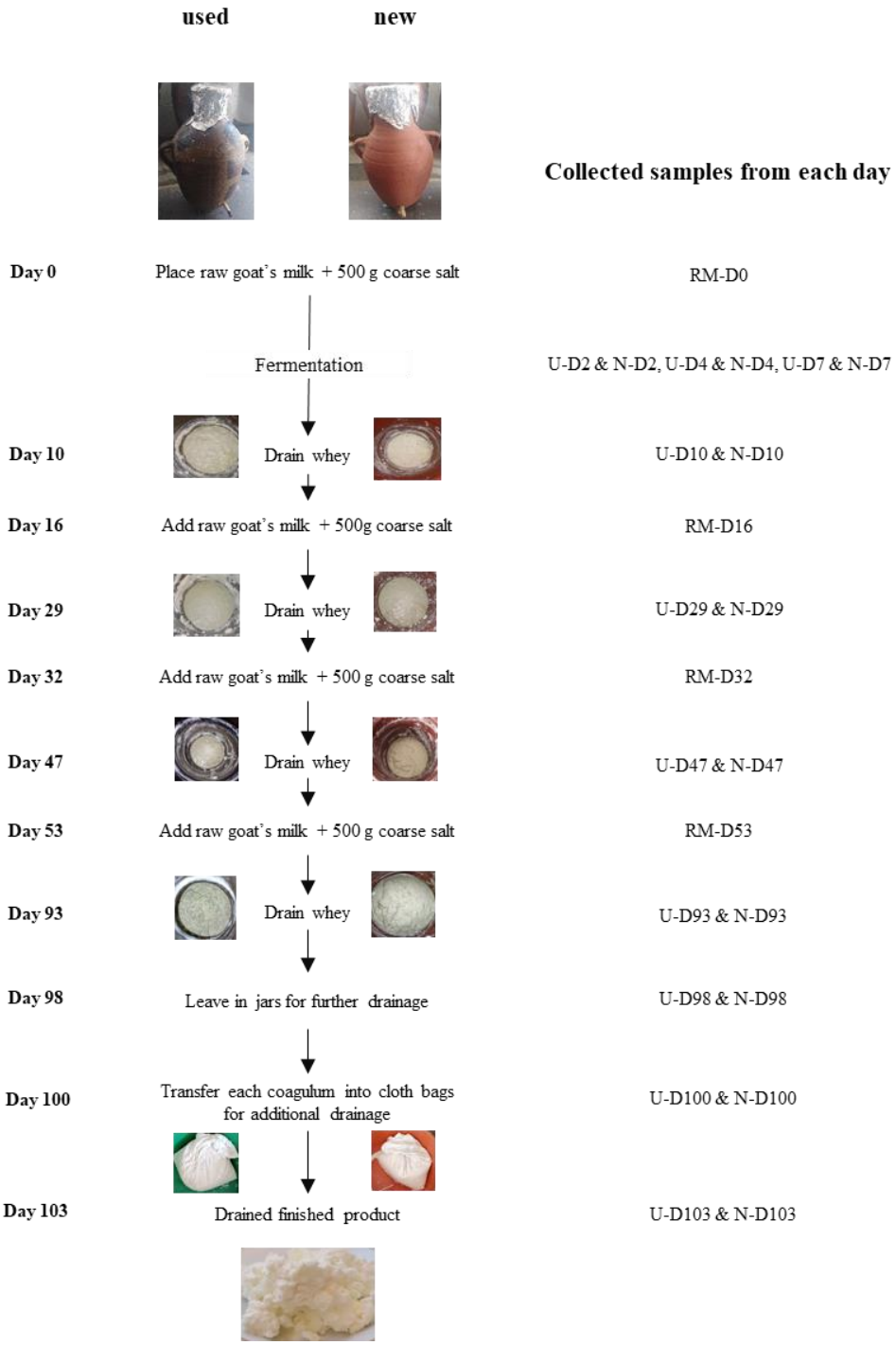


Figure 1. Detailed production process of two labneh Ambaris productions made in used and new earthenware jars along with the collected samples resulting from each step. RM codes followed by production days refer to raw milks added to both jars during productions. The fermented milks collected from the used and the new jars are coded as U or N respectively followed by the corresponding sampling day of production.

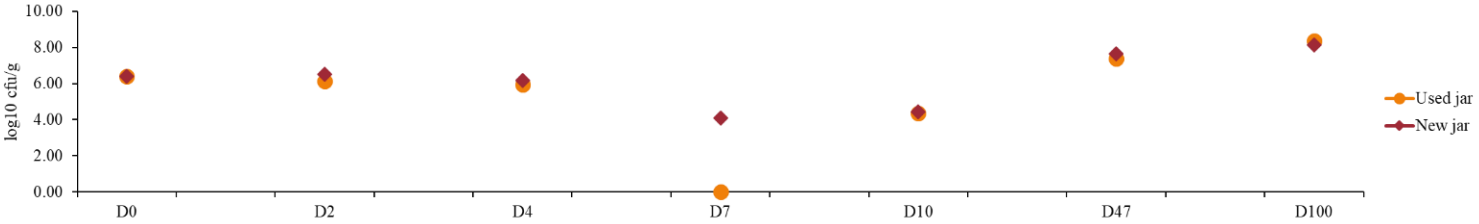
Supplemental Table S2. Microbial counts obtained on 5 nutritive and selective media during production of labneh Ambaris from D0 until the final products. Two productions were monitored, one made in a used jar and the second one made in a new jar. ND means not determined.

Sampling day	Samples	Total mesophilic aerobic flora (log_{10} cfu/g or ml)	Presumptive lactobacilli (log_{10} cfu/g or ml)	Yeasts and molds (log_{10} cfu/g or ml)	*Enterobacteriaceae* family (log_{10} cfu/g or ml)	Coliforms (log_{10} cfu/g or ml)
D0	RM-D0	6.26	4.46	5.10	4.72	4.82
D2	U-D2	8.79	8.1	6.32	6.45	6.57
	N-D2	5.83	8.18	6.44	4.35	4.51
D4	U-D4	6.74	6.31	6.91	3.11	<10
	N-D4	8	7.92	7.16	4.57	4.39
D7	U-D7	6.3	8.4	5.34	<10	<10
	N-D7	7.98	8.33	8.39	<10	<10
					<10	<10
D10	U-D10	8.01	8.16	8.11	<10	<10
	N-D10	8.1	8.28	8.24	<10	<10
					<10	<10
D29	U-D29	8.23	7.53	8.18	<10	<10
	N-D29	7.09	8.35	6.13	<10	<10
					<10	<10
D47	U-D47	6.7	6.36	6.37	<10	<10
	N-D47	7.38	7.18	7.76	<10	<10
					<10	<10
D93	U-D93	7.55	7.31	6.53	<10	<10
	N-D93	7.57	7.58	6.42	<10	<10
					<10	<10
D98	U-D98	7.73	ND	4.96	<10	<10
	N-D98	7.96	ND	3.48	<10	<10
					<10	<10
D103	U-D103	5.34	4.34	3.27	<10	<10
	N-D103	5.64	5.11	2.64	<10	<10

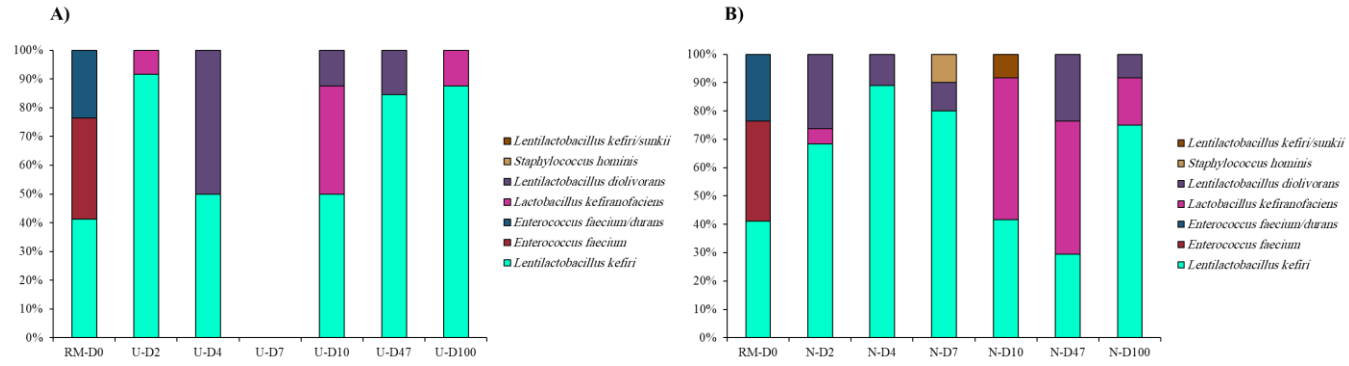
Supplemental Table S3. Microbial counts obtained on lwMRS media during production

of labneh Ambaris at different time points during fermentation in a used jar and a new jar.

	Microbial counts (log 10 cfu/g or ml)	
	Used jar	New jar
D0	6.39	6.39
D2	6.15	6.5
D4	5.95	6.16
D7	0	4.1
D10	4.36	4.44
D47	7.36	7.66
D100	8.35	8.13



Bacterial community dynamics in labneh Ambaris samples collected during production from 2 earthenware jars, one used - U (A) and one new - N (B), in addition to the initial raw milk by sequencing of the V1-V4 region of the 16S rRNA gene.



Discussion générale et perspectives

L'ensemble des travaux de cette thèse ont permis d'établir une véritable cartographie du labneh Ambaris tant sur les plans physicochimique et microbiologique que sur le plan sensoriel. Tout au long de ce travail, grâce à des approches « Next Generation Sequencing », un accent particulier a été mis sur l'étude des communautés microbiennes impliquées dans la réalisation et la structuration du labneh Ambaris. En premier lieu, nous avons décrit la nature et la diversité des espèces microbiennes présentes dans des produits finis de labneh Ambaris recueillis dans différentes exploitations. Les résultats issus de cette première phase de caractérisation nous ont amenés à explorer l'impact éventuel d'un traitement thermique du lait sur les communautés microbiennes présentes dans le produit durant sa fabrication. Enfin, un suivi de l'évolution des communautés microbiennes tout au long de la fermentation d'un lait cru de chèvre et jusqu'à l'obtention du produit fini a été réalisé sur deux jarres d'âge différent (l'une ancienne, ayant déjà servi lors de précédentes saisons et l'autre nouvelle). Ceci nous a permis d'explorer l'implantation des espèces microbiennes déterminantes tout au long du processus de fabrication ainsi que la contribution éventuelle des flores résiduelles de la jarre en terre cuite.

Pour la communauté scientifique, les approches méthodologiques multidisciplinaires utilisées au cours de cette thèse visant à une meilleure connaissance de la biodiversité qui structure un produit fermenté pourront servir de base dans la caractérisation des communautés microbiennes d'autres produits fermentés. A terme, nos travaux pourront également contribuer à une meilleure maitrise de la production du labneh Ambaris pour assurer une qualité sanitaire irréprochable du produit et une meilleure valorisation de ce dernier tant au niveau national qu'international.

1. Le labneh Ambaris : des caractéristiques communes et spécifiques selon les producteurs

La première partie des travaux a visé à créer une carte d'identité du labneh Ambaris en définissant ses propriétés physicochimiques, microbiologiques et sensorielles.

Afin d'atteindre cet objectif, 20 échantillons ont été collectés chez 17 producteurs répartis sur les 3 régions libanaises où la production du labneh Ambaris est la plus répandue. Plusieurs facteurs limitants nous ont empêché de collecter un nombre plus élevé d'échantillons pour augmenter la représentativité de notre échantillonnage : i) l'absence d'un recensement officiel des producteurs de labneh Ambaris (les productions se faisant majoritairement à domicile), ii) l'éloignement des régions productrices de la capitale Libanaise où les analyses ont été effectuées, et iii) le besoin de collecter les échantillons lors d'une même saison de production pour éviter une éventuelle variabilité saisonnière. Les différents échantillons collectés étaient tous fabriqués sur la même période de production (entre Août et Octobre de l'année 2020), les productions sont au lait de chèvre sans utilisation de ferments exogènes (caractéristiques des fabrications artisanales ancestrales). Dans cette étude, nous avons essayé d'inclure le plus de variabilité possible. En effet, outre le procédé traditionnel qui consiste à fermenter du lait de chèvre cru dans des jarres en terre cuite, des variantes du produit existent comme l'utilisation de lait pasteurisé ou de contenants en plastique ou en acier inoxydable pour la production. Nous avons donc inclus dans notre première étude, en plus des échantillons provenant du procédé traditionnel, des échantillons fabriqués avec du lait pasteurisé et d'autres dans des contenants non traditionnels.

Dans ce cadre, sur les 20 labneh Ambaris collectés chez 17 producteurs différents, nous avons identifié à la fois des caractéristiques communes et des divergences. Ces caractéristiques sont résumées dans la Figure 17 ci-dessous.

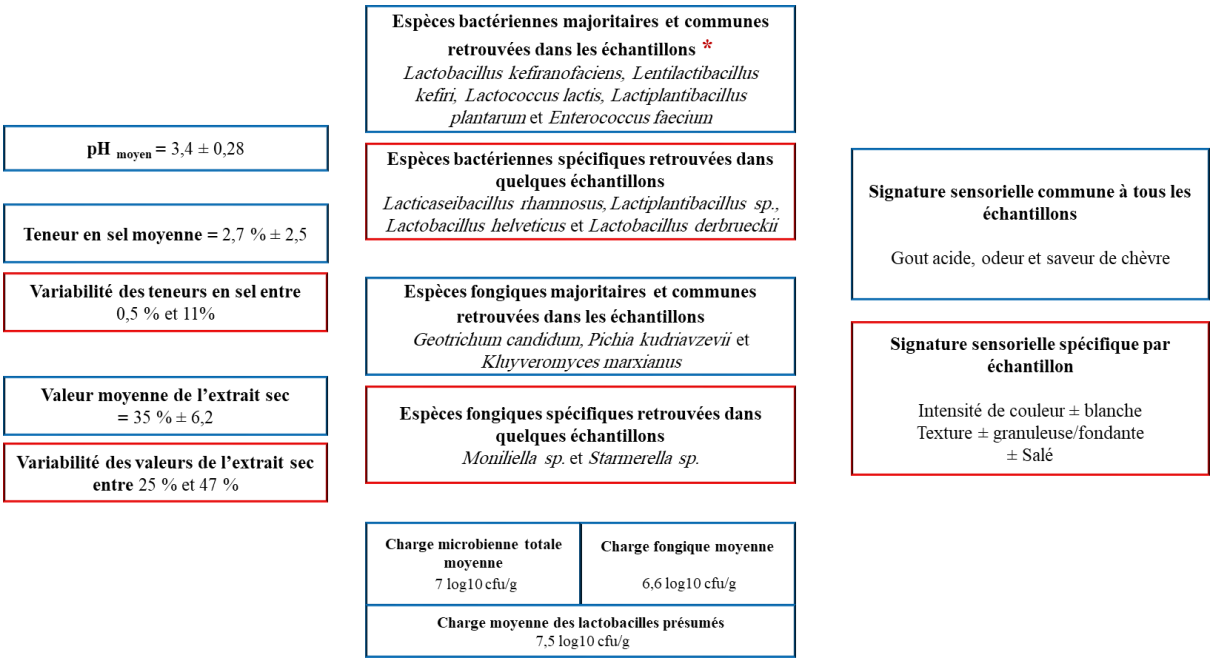


Figure 17. Caractéristiques communes et différences spécifiques rencontrées sur les 20 échantillons de labneh Ambaris collectés chez 17 producteurs.

(*) signifie que les espèces identifiées comme majoritaires sont issues des parties I et III des travaux de cette thèse et également de travaux mentionnés dans la communication orale au 23ème colloque du CBL (Abi Khalil *et al.*, 2022). Les rectangles bleus réfèrent aux caractéristiques communes et les rectangles rouges réfèrent aux caractéristiques différentes entre les labneh Ambaris.

L'analyse des différents paramètres physicochimiques a démontré que les échantillons étaient tous acides avec des valeurs de pH comprises entre 2,92 et 4,13 et une valeur moyenne de 3,40 ± 0,28. Ces valeurs de pH trouvées ici sur le labneh Ambaris sont conformes à celles obtenues par d'autres auteurs (Serhan and Mattar, 2013; Dimassi *et al.*, 2020a, b; Ayoub *et al.*, 2022). Ces faibles valeurs de pH sont dues à la production d'acide lactique par les microorganismes endogènes permettant ainsi d'atteindre le point isoélectrique des caséines (pH 4,6) et entrainant le caillage du lait. Par ailleurs, la prédominance et la diversité des bactéries lactiques non-starter (NSLAB) présentes dans le labneh Ambaris justifie ces faibles valeurs de pH obtenues. En effet, des études ont montré que les valeurs de pH des laits fermentés par des consortia d'espèces bactériennes ou des co-cultures d'espèces de bactéries lactiques comme *Lactobacillus kefiranofaciens* et *Lactococcus lactis* étaient drastiquement plus faibles que celles des laits fermentés par des souches individuelles telles que *L. kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri* et *Lentilactobacillus parakefiri* (Wang *et al.*, 2021; Duran *et al.*, 2022). Au sein de nos

échantillons, la présence concomitante et majoritaire d'espèces de bactéries lactiques telles que *L. lactis*, *L. kefiranofaciens*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. kefiri* ou *Lentilactobacillus diolivorans* pourrait donc jouer un rôle significatif dans les faibles valeurs de pH mesurées sur l'ensemble des échantillons collectés. Par ailleurs, comme démontré par Xiao *et al.*, (2020), l'association de bactéries lactiques à la présence de levures productrices d'acides organiques dans la matrice laitière, comme *K. marxianus* ou *P. kudriavzevii*, espèces majoritaires identifiées dans nos échantillons, pourrait également contribuer à abaisser le pH. Il serait intéressant de tester les profils acidifiants de certaines souches bactériennes issues des échantillons de labneh Ambaris, seules et en co-culture avec ces levures afin de vérifier cette hypothèse.

Le salage à façon tout au long de la fabrication du labneh Ambaris est une autre particularité du produit. Il se traduit par des teneurs en sel considérablement variables d'un échantillon à l'autre. Les valeurs obtenues dans notre première étude s'étendent de 0,5% à 11% avec une valeur moyenne de 2,7% pour les 20 échantillons. Ces teneurs en sel sont similaires aux résultats décrits dans d'autres études (Dimassi *et al.*, 2020a; Ayoub *et al.*, 2022). La grande variabilité de ce facteur est indéniablement liée aux pratiques de salage des producteurs. En effet, le labneh Ambaris étant un produit fabriqué de façon artisanale par des particuliers pour des consommations majoritairement familiales, le salage se fait arbitrairement, selon le goût du producteur et son propre jugement pour obtenir un produit fini dont il a hérité du savoir-faire. Dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre les teneurs en sel et la structuration des communautés microbiennes sur les produits finis. Ceci peut être expliqué par le nombre limité d'échantillons collectés ainsi que la multiplicité d'autres facteurs pouvant impacter la composition microbienne.

Les valeurs d'extrait sec présentent une grande variabilité entre les échantillons avec une valeur moyenne de 35% ± 6,2%. Cette même variabilité avait également été observée par Dimassi *et al.* (2020a). Ce paramètre est lié en partie à la composition biochimique du lait utilisé qui varie en fonction de nombreux facteurs tels que la saison, l'alimentation et la race de l'animal (Kljajevic *et al.*, 2018). Les pratiques de fabrication employées par les producteurs sont déterminantes pour les caractéristiques physico-chimiques et notamment les valeurs d'extrait sec. Selon les teneurs en sel employées par exemple, l'égouttage du

caillé par drainage du lactosérum dans la 2ième étape de fabrication du produit sera plus ou moins intense. D'autres part, au cours de la fermentation, une couche de moisissure peut se développer à la surface de la jarre. Certains producteurs peuvent éliminer une partie de cette strate supérieure du produit. Or, cette couche est riche en matière grasse. Cette pratique se rapporte à une étape d'écrémage plus ou moins importante qui diminue la teneur en matière grasse et par conséquent en matière sèche du produit.

Concernant l'aspect sensoriel, les travaux de cette thèse ont permis la constitution du premier dictionnaire ou lexique sensoriel lié au labneh Ambaris. Des dictionnaires sont disponibles pour des laits fermentés comme le yaourt grec (Desai *et al.*, 2013), le kéfir (Irigoyen, 2005), le Shanklish (Toufeili *et al.*, 1995), le Kishk (Toufeili *et al.*, 1998), le Laban (Chammas *et al.*, 2006) et le Labneh (Serhan *et al.*, 2016). Pour constituer notre propre dictionnaire spécifique au labneh Ambaris, nous avons utilisé une approche innovante qui consiste à générer des descripteurs sensoriels par des panélistes non-entrainés en utilisant la méthode Pivot proposée par Thuillier *et al.*, (2015). Les descripteurs sont ensuite triés pour établir le dictionnaire. Par la suite, ce dernier a servi comme base pour les analyses sensorielles descriptives classiques. La majorité des échantillons avaient un goût acide accompagné d'une odeur et d'une saveur de chèvre. L'acidité perçue dans l'analyse sensorielle est expliquée par les valeurs de pH très faibles des produits, et y est positivement corrélée. La présence d'odeur et de saveur de chèvre, peut principalement s'expliquer par la présence d'acides gras provenant du lait de chèvre (Watkins *et al.*, 2021). En effet, une corrélation positive a été démontrée entre les descripteurs « gras » et « odeur de chèvre ». Ce lexique créé durant cette thèse et décrit dans notre premier article, pourra être employé lors de futurs travaux de recherche et/ou par les producteurs lors de dégustations sensorielles. Il pourra également servir de référence dans la formation de panels experts.

Sur le plan microbiologique, nos travaux ont mis en lumière la présence d'une grande richesse et diversité microbienne dans le labneh Ambaris et ont permis de définir le microbiote-cœur qui compose ce produit. Une importante quantité de microorganismes viables dans les produits finis a été détectée pour l'ensemble des échantillons collectés. Des charges microbiennes moyennes de 7 log 10 UFC/g pour la flore mésophile aérobie,

de 7,5 log 10 UFC/g pour les lactobacilles présumés et 6,6 log 10 UFC/g pour la flore fongique ont été détectées. Les valeurs des charges microbiennes obtenues dans notre première étude sont en accord avec celles retrouvées dans d'autres études menées sur le labneh Ambaris (Serhan and Mattar, 2013; Tabet *et al.*, 2019; Dimassi *et al.*, 2020a; Ayoub *et al.*, 2022). Les espèces bactériennes majoritaires dans la totalité des échantillons retrouvées par metabarcoding sont des lactobacilles (*Lactobacillus kefiranofaciens* et *Lentilactobacillus kefiri* ou *diolivorans*) ainsi que *Lactococcus lactis*. Ces résultats sont en accord avec une pré-identification réalisée par des tests phénotypiques sur des isolats bactériens provenant de labneh Ambaris montrant la dominance de lactobacilles (Abiad *et al.*, 2022).

Dans notre étude, les espèces fongiques majoritaires identifiées sont *Geotrichum candidum*, *Pichia kudriavzevii* et *Kluyveromyces marxianus*. Ces deux dernières espèces avaient également été retrouvées comme majoritaires à toutes les étapes d'une production de labneh Ambaris par des méthodes moléculaires culture-dépendantes dans une précédente étude (Ayoub *et al.*, 2022). Ces espèces de levures sont rencontrées dans les fromages et certains laits fermentés traditionnels comme le kéfir de lait (Vieira *et al.*, 2021a). Leur richesse enzymatique (lipase et protéase notamment) contribue aux arômes de ces produits. Les levures sont connues pour leur contribution à la production de composés aromatiques dans les produits laitiers. *K. marxianus* a la capacité de métaboliser le lactose, le citrate et la matière grasse et produire une grande variété de métabolites secondaires (comme les acétaldéhydes, le dioxide de carbonne, et l'éthanol) qui contribuent à l'arôme des produits (Fleet, 1990; Fonseca *et al.*, 2008). *P. kudriavzevii*, incapable de fermenter le lactose, est retrouvée dans les grains de kéfir, les fromages et des aliments fermentés africains (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2002; Johansen *et al.*, 2019; Maïworé *et al.*, 2019). Cette levure possède une activité protéolytique importante engendrant une grande diversité d'arômes intéressants. Elle est retrouvée notamment dans les ferments d'affinage de certains fromages (comme les fromages artisanaux kazakh et le fromage Armada en Espagne). Lorsque les valeurs de pH sont faibles comme c'est le cas pour le labneh Ambaris, *P. kudriavzevii* peut former des biofilms (Fleet, 2011). Quant à *Geotrichum candidum*, cette espèce fait partie des ferments d'affinage utilisés dans les fromages (Boutrou and Guéguen, 2005; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). Cette espèce a une

croissance rapide et stimule le développement de communautés bactériennes en métabolisant les lactates. Elle joue également un rôle déterminant dans lecatabolisme des triglycérides et des caséines et intervient dans les qualités organoleptiqueset l'aspect des fromages. Ces levures rencontrées dans le labneh Ambariscontribuent donc probablement aux flaveurs et à la texture du produit.

L'identification des espèces bactériennes du labneh Ambaris a été complétée par des approches cultures-dépendantes afin d'évaluer la viabilité des espèces identifiées par metabarcoding. Des isolats bactériens (126) ont été purifiés des 20 échantillons étudiés. Une première identification, basée sur le séquençage par méthode Sanger de la région V1-V4 du gène qui code l'ARNr 16S a été réalisée pour ces 126 isolats (Sanger *et al.*, 1977). Les résultats ont montré une certaine convergence entre les deux approches puisque les espèces majoritaires en métabarcoding ont été retrouvées à l'état viable dans les échantillons. Mais des divergences ont aussi été notées. En effet, l'espèce *L. kefiranofaciens*, détectée majoritairement en métabarcoding, n'a pas été retrouvée sur milieux de culture durant la première partie des travaux. Ceci est explicable par le fait que cette espèce très exigeante nécessite pour sa croissance des conditions spécifiques, comme l'utilisation du lactosérum dans le milieu de culture et une incubation pendant quatorze jours en conditions micro aérophiles (Zanirati *et al.*, 2015; Georgalaki *et al.*, 2021). Cette même approche d'identification a été adoptée pour les suivis de fermentation, dans la 3èmepartie des travaux de la thèse, et nous a permis de récupérer des isolats de *L. kefiranofaciens* pour les ajouter à notre collection de souches.

Pour certains lactobacilles, le choix de séquencer la région V1-V4 de l'ADNr 16S n'a pas permis leur identification et a conduit à une multi-affiliation au rang de l'espèce sur les bases des données actuelles. Dans une partie de nos travaux, des amorces ciblant le gène *rpoB* ont été conçues et testées pour certaines espèces bactérienne multi-affiliées. Ce gène, se trouvant chez toutes les bactéries, code pour une petite sous-unité de l'ARN polymérase. Il possède des séquences conservées et d'autres variables, ce qui facilite la conception d'amorces spécifiques à des taxons bactériens et donc la discrimination des microorganismes jusqu'à l'espèce (Adékambi *et al.*, 2009; Vos *et al.*, 2012). En effet, Shevtsov *et al.*, (2011) ont montré que le gène *rpoB* était plus discriminant que le gène qui code l'ARNr 16S. La technique PASA et anti-PASA, utilisée en biologie moléculaire pour

distinguer des gènes ayant 1 nucléotide de différence, a été utilisée pour la conception des amorces (Sommer *et al.*, 1992). Des couples d'amorces pour certaines espèces multi-affiliées comme les espèces du groupe *plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*/*pentosus*/*paraplantarum*) et *Lacticaseibacillus rhamnosus* ont été conçus. A notre connaissance, cette approche n'a pas été utilisée auparavant dans la littérature pour l'identification des bactéries lactiques.

Bien que cette technique ait réussi à résoudre certaines multi-affiliations, et que les résultats préliminaires obtenus aient été encourageants, cette méthode doit être validée par des tests de sensibilité et de spécificité sur un nombre plus importants de souches et d'espèces. De plus, nous proposons également de séquencer l'amplicon du gène *rpoB* obtenu par chaque couple d'amorces pour une identification plus précise de l'espèce.

Les espèces majoritaires rencontrées dans ce produit sont également retrouvées en partie dans des produits laitiers fermentés comme d'autres laits fermentés de méditerranée orientale (Abi Khalil *et al.*, 2023), du kéfir et des fromages à coagulation lactique (chapitre II.1 de l'étude bibliographique). Ces produits ont la particularité d'avoir des valeurs de pH faibles en cours ou en fin du procédé de fabrication et d'utiliser des ferments naturels, ce qui expliquerait les similitudes de profils microbiens.

Sur le plan sanitaire, l'ensemble des échantillons collectés durant la première campagne d'échantillonnage en fin de fermentation sont dans la majorité des cas exempts de microorganismes pathogènes, d'entérobactéries et de coliformes (à l'exception d'un échantillon sur les 20 analysés qui contenait *E. coli* et deux autres échantillons d'un même producteur qui contenaient *Listeria monocytogene*s). Les effets inhibiteurs des bactéries lactiques sur les bactéries pathogènes ont été largement démontrés dans la littérature: capacité à abaisser le pH, sécrétion de bactériocines et d'autres substances antibactériennes telles que des peroxydes, des alcools et du dioxyde de carbone (Vardjan *et al.*, 2013; Ołdak *et al.*, 2020). Ainsi, le nombre conséquent de bactéries lactiques retrouvées dans le labneh Ambaris, comme *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lacticaseibacillus rhamnosus*, pourrait contribuer à la qualité sanitaire du produit, via la sécrétion de composés antimicrobiens par ces bactéries (Todorov and Dicks, 2006; Zacharof and Lovitt, 2012; da Silva Sabo *et al.*, 2014). Pour confirmer cette hypothèse, des challenges tests

pourront être réalisés, comme proposé par Kim *et al.*, (2016) en inoculant la matrice de labneh Ambaris par différents pathogènes tel que *E. coli*, *Salmonella spp.* ou *Listeria monocytogenes*.

Nos résultats ont donc montré que les échantillons de labneh Ambaris contenaient en grande partie des bactéries lactiques hétérofermentaires comme *L. kefiri, L. plantarum, L. lactis* et d'autres homofermentaires comme *L. rhamnosus, L. kefiranofaciens* et *L. helveticus* (Zheng *et al.*, 2020). Cette diversité d'espèce de bactéries lactiques ayant des voies métaboliques différentes impacte également les saveurs, arômes et texture des produits finis. La collection importante d'isolats bactériens issue de ces travaux de thèse (dont 300 isolats identifiés) constitue un matériel biologique important comprenant une diversité de bactéries couvrant plusieurs labneh Ambaris (producteurs et stades de fabrication différents). Ces bactéries, après identification et caractérisation de leurs propriétés métaboliques, pourront être utilisées pour l'analyse des fonctions et de la structuration des communautés en élaborant un consortium synthétique. La constitution d'une collection de levures serait également intéressante pour étudier leurs propriétés métaboliques, car les espèces détectées dans le labneh Ambaris peuvent supporter des conditions particulièrement stressantes de la matrice.

2. Dynamiques des communautés microbiennes tout au long des stades de fabrication

Les approches culture-dépendantes et indépendantes utilisées dans la première partie des travaux ont fourni une vision globale des communautés microbiennes des labneh Ambaris en fin de fermentation. Il s'est avéré que ce lait fermenté par des microorganismes endogènes se présente sous la forme d'un écosystème microbien complexe avec 160 taxons bactériens (dont 117 espèces bactériennes identifiées) et 36 taxons fongiques (dont 24 espèces fongiques identifiées) et dont la biodiversité est dépendante des exploitations. L'étude de l'installation et l'évolution des communautés microbiennes tout au long du processus de fabrication a été la suite logique de ce premier travail de caractérisation des produits finis. Pour cela, deux fabrications de labneh Ambaris ont été suivies chez un producteur parmi les 17 de la première étude. Dans son exploitation, localisée au Chouf,

deux productions de labneh Ambaris ont été suivies en parallèle dans deux jarres en terre cuite de capacité semblable. Les suivis des paramètres physicochimiques (pH et taux de sel), ainsi que des communautés microbiennes ont été faits du lait cru de départ (RM-D0) jusqu'aux produits en fin de maturation (D103).

Durant la 1ère étape (le 1er stade de la fermentation), le lait cru est placé avec du gros sel dans la jarre en terre cuite sans aucun ajout de ferment. Cette étape correspond à une fermentation spontanée. Le pH a drastiquement chuté 2 jours après la fermentation pour atteindre des valeurs inférieures à 3,8 pour les 2 jarres. Ceci était accompagné par une augmentation importante des charges microbiennes des lactobacilles présumés (de 4 log UFC/ml dans le lait RM-D0 à 8 log UFC/ml dans les 2 jarres à D2) ainsi que des levures (de 5 log UFC/ml dans le lait RM-D0 à 6,5 log UFC/ml dans les 2 jarres à D2) comme observé par Ayoub *et al.*, (2022). Ces faibles valeurs de pH pourraient être attribuées à l'activité microbienne provenant de diverses associations entre bactéries lactiques (Wang *et al.*, 2021) et entre bactéries lactiques et levures (Xiao *et al.*, 2020). Durant cette première étape, le système fermentait sans aucune intervention, pourtant les teneurs en sel augmentaient graduellement. Ceci peut s'expliquer par le fait que le gros sel initialement placé dans chaque jarre se dissolvait progressivement dans les laits fermentés entraînant ainsi l'augmentation de la teneur en sel même si aucun ajout n'a été effectué. Durant cette étape, les espèces bactériennes (*L. kefiranofaciens*, *L. kefiri* et *L. lactis*) et fongiques (*G. candidum*, *P. kudriavzevii* et *Starmerella sp.*) identifiées comme dominantes tout au long du procédé de fabrication se sont installées rapidement dans les laits fermentés. Notons que ces espèces ne sont pas toutes détectées dans le lait cru initial comme pour le cas de *L. lactis* et *P. kudriavzevii*.

Concernant les diversités bactériennes, une baisse drastique a été observée dans les deux jours suivants la fermentation allant de 228 ASV à 62 ASV deux jours après le début de la fermentation. Nos résultats ont montré que le lait cru était majoritairement dominé par des bactéries Gram négatives mais contenait également des bactéries lactiques en moindre proportion. Le lait cru peut abriter une grande diversité de microorganismes d'origines différentes (Quigley *et al.*, 2013; Montel *et al.*, 2014; Frétin *et al.*, 2018), mais seules les espèces adaptées aux conditions prévalent lors de la production seront sélectionnées pour rester et se développer au sein du produit. En revanche, la diversité des levures et

moisissures a augmenté de manière importante dans les deux jarres par rapport au lait cru initial allant de 2 ASV à 18 ASV deux jours après le début de la fermentation. Ces espèces retrouvées dans les laits fermentés pourraient provenir de l'environnement laitier (l'ambiance, la jarre ou le microbiote du producteur) Elles peuvent également être minoritaires dans le lait cru et se développer dans le lait fermenté acide et salé, y trouvant des conditions favorables au détriment d'autres microorganismes du lait sensibles à des acidités et salinités élevées (Fleet, 1990; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019).

Après 7 jours de fermentation, les échantillons de labneh Ambaris ne contenaient plus de coliformes viables et détectables sur les milieux de culture. Malgré l'ajout de lait dont la composition microbienne diffère des laits fermentés (majorité de bactéries Gram négatives), les profils microbiens des labneh Ambaris en cours de fermentation restaient stables. L'ensemble de ces données laisse supposer que la nature et les équilibres des espèces microbiennes établies dans le labneh Ambaris au cours et après la première étape de fermentation limitent le développement des bactéries Gram négatives dont certaines peuvent être pathogènes (comme *E. coli*, ou des espèces de *Salmonella*). Cette hypothèse est appuyée par de nombreuses études qui démontrent le rôle des bactéries lactiques dans l'inhibition des bactéries Gram négatives et des microorganismes pathogènes ainsi que les entérobactéries ((Vardjan *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019).

Concernant la 2ème étape du procédé qui dure 83 jours, elle est caractérisée par les soutirages des lactosérums ainsi que les ajouts réguliers de laits crus et de gros sel. Ceci correspond à un « pseudo » *back-slopping* durant lequel le caillé égoutté restant dans la jarre sert à inoculer et initier la fermentation suite à l'ajout de lait. Les teneurs en sel variables mais globalement croissantes dans le produit étaient probablement liées aux drainages réguliers du lactosérum (source de variabilité) et des ajouts de laits avec des quantités relatives élevées de gros sel (source d'augmentation). Durant cette étape et malgré les ajouts réguliers de laits crus et de sel, les communautés microbiennes sont restées globalement stables (nombre d'espèces, abondance et charges microbiennes). En effet, les mêmes espèces dominantes retrouvées dans l'étape 1 sont restées dans les échantillons (les espèces bactériennes *L. kefiranofaciens*, *L. kefiri* et *L. lactis* et fongiques *G. candidum*, *P. kudriavzevii* et *Starmerella sp.*). Une fois la fermentation initiée, on peut supposer que ces microorganismes dominants (déjà installés en grand nombre dans le caillé

précédent restant dans les jarres après égouttage du lactosérum) agissent comme des ferments naturels qui initient rapidement la fermentation des laits nouvellement ajoutés et dominent alors la matrice. La stabilisation des valeurs de pH au cours de cette étape est certainement liée à la stabilisation des communautés microbiennes.

La dernière étape, d'une durée de 10 jours, est caractérisée par un drainage du lactosérum sans aucun ajout ni de lait ni de gros sel. Durant cette étape, la très légère augmentation des valeurs de pH observée dans les deux jarres (de l'ordre de 0,1 unités dansles 2 jarres)) pourrait provenir d'un changement de la composition biochimique de la matrice et/ou de la résultante d'un métabolisme des levures et moisissures (catabolisme des acides organiques, protéolyse) (Fleet, 1990; Boutrou *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2013; Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). La diminution progressive des taux de sel lors de cette phasedoit être liée à la capacité du sel à se dissoudre dans les milieux liquides, ce qui fait qu'unepartie est expulsée dans le lactosérum égoutté, tandis que le reste est conservé dans le lactosérum piégé dans le caillé. Les communautés microbiennes déjà installées durant les étapes précédentes ont persisté jusqu'à la fin de la maturation. Mais les charges microbiennes ont commencé à diminuer en fin de maturation, probablement en relation avec les arrêts des ajouts des laits crus qui alimentaient le système avec des nouveaux nutriments et microorganismes.

Représentativité des échantillons de labneh Ambaris collectés pour les suivis de fermentation

Le procédé de fabrication du labneh Ambaris consiste en un remplissage de la jarre par un entassement des caillés tout au long de la production. Ceci pose la question de la représentativité des échantillons de laits fermentés collectés. En effet, au cours de la fermentation, la matrice qui se forme progressivement dans la jarre est hétérogène (caillé semi-solide avec lactosérums et laits liquides. Dimassi *et al.*, (2020b) ont montré de légères différences de certains paramètres physicochimiques pour trois niveaux de prélèvements du produit : la surface, le milieu et le fond de la jarre. Par exemple, un gradient croissant des valeurs d'extrait sec allant de 22,90% dans la couche en surface à 31,21% dans celle au fond a été noté. Dans le cas de notre étude, le prélèvement d'échantillons dans plusieurs niveaux de la jarre s'avérait délicat. En effet, plusieurs prélèvements peuvent déstructurer

la matrice et perturber la fermentation. Il est également impossible de discerner les strates qui se forment dans la jarre à cause de la nature opaque de la terre cuite. Notre approche de prélèvement a consisté à collecter les échantillons de laits ayant fermenté et caillé après le drainage du lactosérum en essayant, autant que possible, de se situer toujours au niveau du milieu de la jarre. Mais il nous fallait un moyen de valider notre approche. A cet effet, des échantillons de lactosérums ont été prélevés par l'orifice situé en partie basse de la jarre au même moment que la collecte des laits fermentés (ou caillés) correspondants. Les communautés microbiennes des lactosérums et les laits fermentés prélevés le même jour ont été analysées par métabarcoding et comparés. Des similitudes ont été observées entre les deux matrices pour les communautés bactériennes et fongiques comme l'illustrent les Figure 18 et Figure 19 ci-dessous.

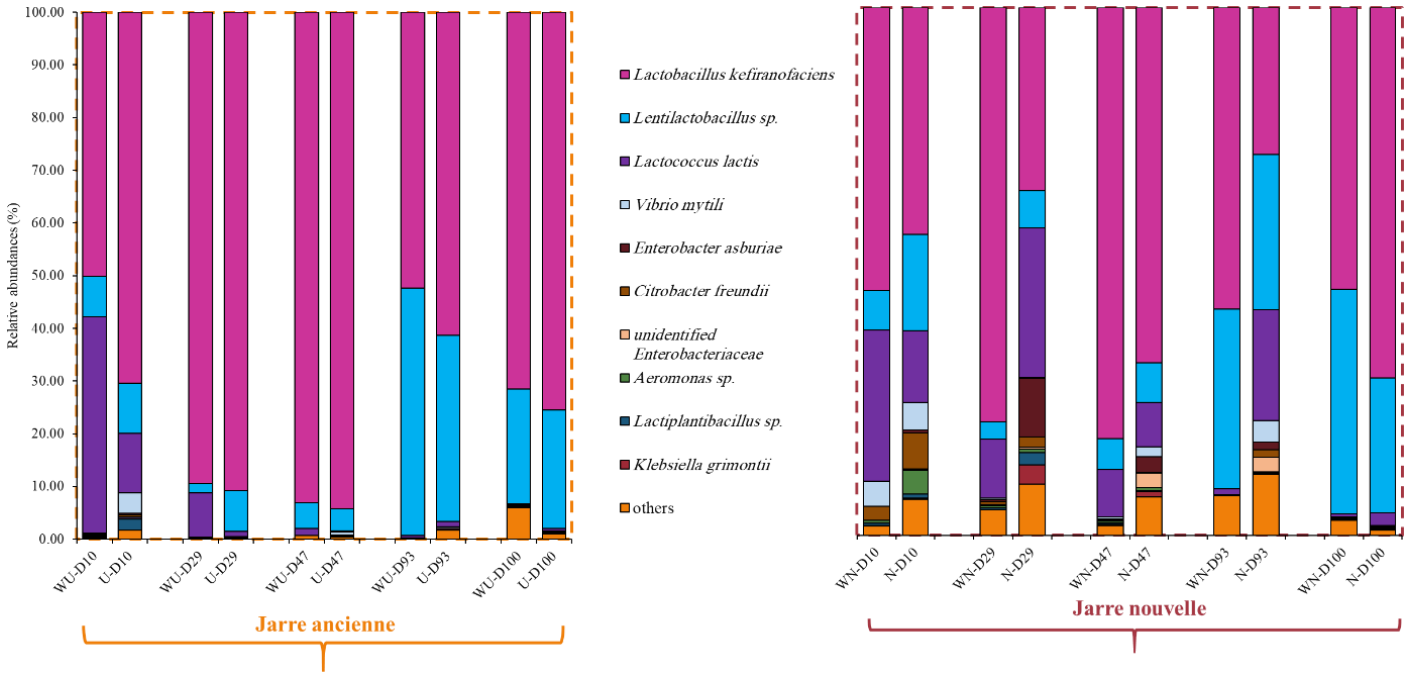


Figure 18. Evolution des communautés bactériennes dans le labneh Ambaris et les échantillons de lactosérum prélevés le même jour lors de la production à partir de 2 jarres en terre cuite, une ancienne et une neuve par séquençage de la région V3-V4 de l'ADNr 16S.

WN et WU correspondent aux lactosérum,U et N aux laits fermentés.

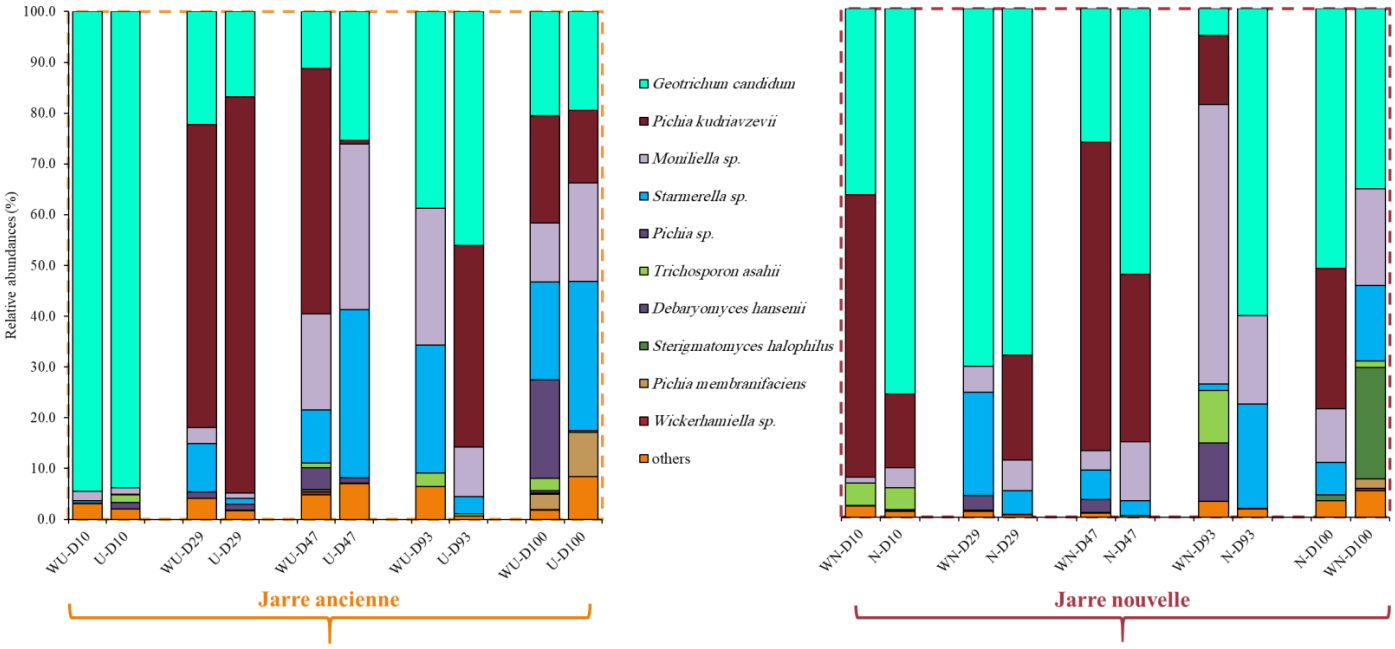


Figure 19. Evolution des communautés fongiques dans le labneh Ambaris et les échantillons de lactosérum prélevés le même jour lors de la production à partir de 2 jarres en terre cuite, une ancienne et une neuve par séquençage de la région ITS2.

WN et WU correspondent aux lactosérum,U et N aux laits fermentés.

3. Les sources potentielles de variabilité du produit

Malgré les caractéristiques communes partagées par la majorité des labneh Ambaris testés, une variabilité a été observée pour certains échantillons (Figure 17). Cette variabilité se manifestait par des teneurs en sel, des extraits secs, ainsi que certaines propriétés sensorielles distinctes. Les espèces microbiennes majoritaires différaient également des autres produits.

Dans la deuxième partie de nos travaux de thèse, nous avons donc cherché à comprendre l'impact de certains facteurs biotiques sur les communautés microbiennes duproduit. Nos objectifs premiers étaient d'identifier si un traitement thermique du lait pouvait expliquer les signatures particulières observées lors de notre première étude dans certains de nos échantillons. Nous avons ensuite exploré l'hypothèse de l'intervention des microflores résiduelles dans l'environnement de production.

Rôle du traitement thermique du lait

La pasteurisation permet de réduire de manière significative les charges microbiennes. De nombreuses études, portant notamment sur l'écosystème fromager ont montré que la pasteurisation du lait réduit la diversité microbienne des produits laitiers et impacte en retour la qualité sensorielle des produits (Berodier and Spinnler, 2011).

A notre connaissance, une seule étude ayant abordé ce sujet dans le cas du labneh Ambaris existe dans la littérature (Dimassi *et al.*, 2020b). Toutefois, cette dernière s'est uniquement centrée sur l'incidence d'un traitement thermique sur les propriétés physicochimiques (pH, acidité, taux d'humidité et activité de l'eau) du produit. Les auteurs y ont démontré que ces facteurs ne semblaient pas varier avec le traitement thermique du lait.

Nos résultats issus de la comparaison des compositions microbiennes de 6 échantillons de labneh Ambaris fabriqués à partir de laits crus *vs* 6 produits réalisés à partir de laits pasteurisés n'ont pas permis de mettre en évidence une différence des profils microbiens en liaison avec les traitements thermiques des laits. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. La méthode de pasteurisation du lait adoptée pour la production du labneh Ambaris est faite de façon artisanale. De ce fait, la pasteurisation ne répond pas à des barèmes définis et contrôlés. Ainsi une flore résiduelle du lait cru pourrait persister après la pasteurisation, notamment si le lait de départ est hautement chargé en microorganismes. L'environnement de production peut également permettre d'ensemencer le lait par des flores préétablies chez le producteur (Salazar *et al.*, 2018). Ce transfert de microorganismes dans le lait peut avoir lieu à différentes occasions notamment lorsque le producteur laisse refroidir le lait jusqu'à température ambiante dans la salle de production avant de l'utiliser pour la fabrication du labneh Ambaris. Dans la littérature, diverses études vont dans le sens de cette hypothèse et montrent que les espèces microbiennes qui colonisent les installations et l'air des zones de production laitière ont un impact significatif sur les compositions microbiennes des produits laitiers (Quintana *et al.*, 2020; McHugh *et al.*, 2021; Michailidou *et al.*, 2021). Une étude a également montré que les mêmes espèces de levures étaient détectées dans le fromage et l'environnement de son atelier de production, bien qu'avec des abondances variables (Fröhlich-Wyder *et al.*, 2019). L'association de ces facteurs biotiques et abiotiques pourraient donc masquer l'effet du traitement thermique du lait.

Il est à noter la présence d'espèces d'entérobactéries dans les 12 échantillons de labneh Ambaris que nous avons étudiés, qu'ils soient à base de lait cru ou de lait pasteurisé artisanalement. Toutefois, ces espèces étaient présentes en plus grande abondance dans les labneh produits à base de lait cru. Ces microorganismes également décelés dans les laits pasteurisés auraient dû être désactivés par le traitement thermique. Si leur présence pourrait, là aussi, être le résultat d'une pasteurisation insuffisante, elle pourrait aussi suggérer des contaminations post pasteurisation ou une contamination au cours du procédé de fabrication. En effet, les ajouts réguliers de lait dans les jarres et les interventions humaines sont une source potentielle de contamination du produit. Pour consolider les résultats obtenus sur un faible échantillonnage lors de cette deuxième partie de nos travaux, il serait intéressant de tester l'effet de la pasteurisation dans des conditions de fabrication non artisanales mais contrôlées et sur un nombre plus élevé d'échantillons.

Rôle de l'environnement laitier dans le milieu de production

La pasteurisation du lait n'étant pas apparue comme un facteur déterminant dans la composition microbienne du labneh Ambaris, nous avons exploré l'hypothèse de l'intervention des microflores résiduelles dans l'environnement de production.

Pour ce faire, nous avons collecté et analysé des échantillons d'un même producteur lors de deux saisons de production successives. Ce producteur s'était démarqué des autres durant la première campagne d'échantillonnage par la présence d'espèces de levures spécifiques comme *Moniliella sp.* et *Starmerella sp*. La présence de ces espèces de levures spécifiques a ainsi été confirmée lors des deux saisons de production et une microflore similaire a également été enregistrée entre les échantillons des deux saisons. Ces données sous-entendent l'existence d'une « signature producteur » pour les productions de labneh Ambaris, caractérisée par une flore résidente unique et typique qui s'installe dans un environnement laitier donné et qui persiste d'une saison à l'autre comme cela a été mis en évidence par d'autres auteurs (Montel *et al.*, 2014; Calasso *et al.*, 2016; Kamimura *et al.*, 2020).

Pour confirmer une telle « signature » nous avons également collecté chez ce même producteur, et lors d'une même saison de production, 13 échantillons de labneh Ambaris

en fin de fermentation, chacun provenant d'une jarre différente. Les résultats du métabarcoding ont montré que globalement les mêmes espèces microbiennes sont retrouvées dans tous les échantillons (Figure 20), y compris les espèces de levures *Moniliella sp.* et *Starmerella*, renforçant ainsi l'idée d'une « signature producteur ». A l'avenir, il serait intéressant d'étendre l'étude à plusieurs producteurs pour consolider cette théorie.

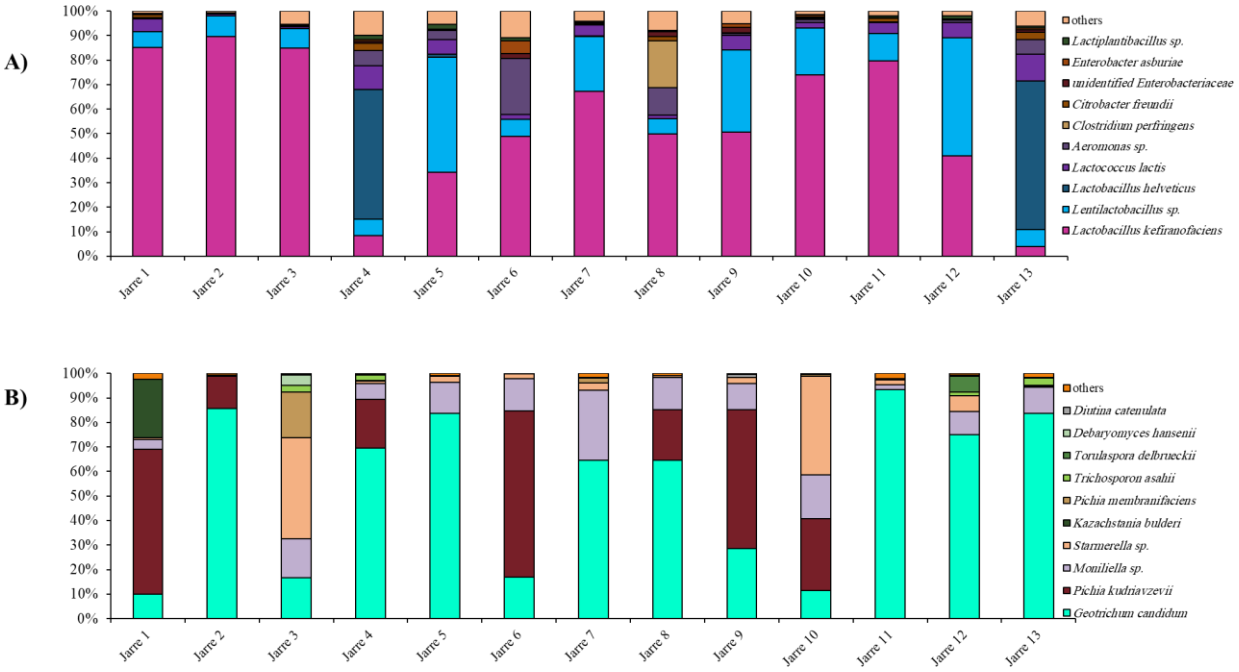


Figure 20. Analyse des communautés microbiennes par metabarcoding A) bactériennes et B) fongiques dans 13 échantillons de labneh Ambaris collectés chez le même producteur. Répartition des 10 espèces les plus dominantes.

Les contenants et ustensiles de productions participent à l'inoculation des produits laitiers par des microorganismes (Lortal *et al.*, 2009; Didienne *et al.*, 2012; Groenenboom*et al.*, 2020). Dans la dernière partie de nos travaux, nous avons suivi deux productions distinctes de labneh Ambaris chez ce producteur à la signature décrite précédemment. A partir d'un même lait cru, les évolutions des communautés microbiennes ont été suivies sur deux jarres en terre cuite distinctes i.e une jarre dite « ancienne » utilisée lors de précédentes saisons de production de labneh Ambaris et une jarre « neuve » jamais utilisée auparavant. Dans une phase préliminaire, avant de commencer les deux productions, nous avons tenté de récupérer les microflores résiduelles de la jarre en adaptant la méthode proposée par Michel and Laithier, (2009): 500 ml de lait UHT ont été versés dans chacune

des deux jarres, puis agités pendant 10 minutes suivies d'une phase de repos de 15 minutes. Ces étapes d'agitation et de repos ont été répétées pour une durée d'1h30 min afin de décrocher les possibles biofilms présents sur les surfaces internes des jarres. Après extraction, l'ADNtotal de ces laits UHT récupérés était de très faibles concentrations (aux alentours de 2 – 3 ng/µL). Les très faibles quantités d'ADN extraits n'ont pas permis l'obtention de résultats exploitables après séquençage metabarcoding du lait UHT. Nous pourrions envisager pourla suite de sélectionner des jarres de plus grande capacité (50 ou 100 Kg vs 15 kg pour les essais réalisés dans notre étude) nous permettant de pouvoir gratter délicatement l'intérieur de la jarre sans les endommager en s'inspirant des méthodologies utilisées par Lortal *et al.*,(2009) et Didienne *et al.*, (2012), et ainsi prélever des quantités de flores résiduelles plus importantes accrochées aux surfaces internes du contenant.

Lors du suivi de ces deux productions, des échantillons ont été régulièrement collectés et les propriétés physicochimiques et microbiologiques analysées. Nos résultats ont montré que l'acidification était plus rapide durant les premiers jours de fermentation (entre 0 et 10 jours) dans la jarre « ancienne », avec dès le jour 2 un pH de 3,55 vs. 3,79 dans la « neuve. Ce phénomène s'accompagne par une abondance relative plus élevée de l'espèce *L. kefiranofaciens* dans l'« ancienne » jarre (au jour 2, 73% abondance relative vs. 30% dans la « nouvelle »). D'autres espèces bactériennes dominantes non détectées dansles laits crus, ont également rapidement augmenté durant les premiers stades fermentaires. Ces résultats pourraient être liés à la présence d'une microflore résiduelle sur les surfaces internes des jarres « anciennes » en terre cuite qui pourrait participer à l'inoculation de la production suivante et orienter ainsi sa fermentation. En effet, certaines espèces comme *L. kefiranofaciens* auraient la capacité de développer des biofilms et y persister d'une saison de production à l'autre (Casey *et al.,* 2006; Hickey *et al.,* 2015). Ces résultats préliminaires montrent la nécessité de réaliser d'autres essais dans les mêmes conditions tout en contrôlant de façon plus précise les teneurs en sels qui étaient ici légèrement différentes pour les deux jarres.

La synthèse de l'ensemble de ces travaux de thèse ont permis la cartographie du labneh Ambaris qui se présente sous la forme d'un écosystème microbien complexe (sur 160

taxons bactériens et 36 taxons fongiques, 117 espèces bactériennes différentes et 24 espèces fongiques ont été détectées parmi tous les échantillons étudiés dans la première partie des travaux) et dont la biodiversité est dépendante des exploitations.

Les espèces majoritaires retrouvées dans le produit fini s'installent dès les premiers jours de fabrication conjointement à une chute drastique du pH. Ce travail exploratoire, mené dans des conditions réelles de fabrication, conduit à de nombreux questionnements portant notamment sur: l'origine des communautés microbiennes du labneh Ambaris, l'importance des facteurs biotiques et abiotiques sur la structuration de ces communautés ainsi que les rôles fonctionnels des espèces majoritaires rencontrées dans la détermination de la qualité des produits (sanitaire, technologique, sensorielle) et leurs « effets santé ».

Comprendre la structuration des communautés microbiennes ainsi que leurs fonctionnalités est déterminant pour maitriser le procédé de fermentation. En effet, cela permet de vérifier son bon déroulement et de garantir les qualités sanitaires et organoleptiques des produits fermentés. L'étude des communautés microbiennes et de leurs rôles ne peut pas se résumer à l'identification des espèces en présence étant donné que la résultante fonctionnelle est souvent régie par les interactions métaboliques pouvant se mettre en place. D'autres part, de nombreuses combinaisons taxonomiques peuvent montrer une convergence fonctionnelle (Burke *et al.*, 2011).

Les modèles *in situ* ou *in vivo* sont des systèmes complexes donnant une bonne représentation des conditions réelles de fabrication, mais il est parfois très difficile d'en tirer des conclusions quant aux effets des facteurs biotiques et abiotiques en présence, du fait de la multiplicité de facteurs non maitrisés et non contrôlés. Ainsi, pour aller plus loin dans la compréhension de la structuration des communautés microbiennes, de leur dynamique et surtout de leurs fonctions, la construction de consortia synthétiques simplifiés peut être proposée pour mieux décrypter le fonctionnement de ces communautés. Cette approche de simplification des communautés, où l'écosystème est reconstruit de manière raisonnée et dans un environnement contrôlé est connue sous le nom d'approche « bottom-up » (De Roy *et al.*, 2014). Cette approche est proposée pour la suite des travaux de cette thèse, où les consortia seront construits à partir des souches isolées et identifiées au cours de la thèse. Concernant les levures, les souches du labneh Ambaris seront issues

de la collection de l'Université Libanaise constituée suite aux travaux précédents de Ayoub *et al.*, 2022. La sélection préliminaire des espèces et des souches sera établie à partir de leurs représentativités dans les labneh Ambaris. Ainsi, pour les bactéries lactiques, les espèces considérées en priorité seront: *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lactococcus lactis*. Pour les levures, *Geotrichum candidum, Pichia kudriavzevii* et *Kluyveromyces marxianus* seront les espèces à tester (Figure 17). Un screening de certaines capacités métaboliques d'intérêt pour la production du Labneh Ambaris permettra ensuite de retenir les souches les plus à même de conduire efficacement les fermentations et d'y intervenir positivement. Suite à cette sélection, il s'agira de commencer par un consortium très simplifié pour arriver à des combinaisons plus abouties : plusieurs combinaisons de consortia composés de deux souches bactériennes des espèces les plus représentées dans le labneh Ambaris seront progressivement enrichies avec une ou deux souches des espèces de levures également lesplus représentées dans le produit.

Il sera également nécessaire de mettre au point le modèle de fabrication afin qu'il soit répétable et proche de la réalité de terrain. Dans tous les cas, une durée de fermentation à minima de 10 jours sera nécessaire avant que le système ne commence à atteindre sa stabilité. En effet, en se référant à la 3ème partie des travaux, durant le premier stade de fermentation (les premiers 10 jours), le système est dynamique et s'installe au fur et à mesure avec une diminution progressive du pH et des évolutions des abondances relatives des espèces. Le lait utilisé pour les essais sera un lait stérile reconstitué dont la composition biochimique sera définie et standardisée, afin qu'il n'y ait pas de confusion de facteurs dans l'analyse des données. Le matériau du contenant restera à définir, mais pour se rapprocher des conditions réelles, des jarres en terre cuite seraient à privilégier. Mais un des problèmes de ce type de contenant est l'impossibilité de visualiser l'évolution de la texture du produit à l'intérieur de la jarre, notamment la présence probable de stratification et de synérèse. De plus, les modalités de prélèvements seront également à étudier, afin d'avoir la meilleure représentativité de l'échantillonnage.

L'évolution de chacune des espèces tout au long de la production nécessite un outil de traçage adapté. Plusieurs options peuvent être envisagées. Par exemple, la PCR en temps

réel a été proposée par Nejati *et al.*, (2020) qui ont notamment mis au point des multiplex qPCR permettant de discriminer et tracer 6 espèces de bactéries lactiques (dont *L. plantarum, L. kefiri* et *L. lactis)* et 5 espèces de levures dans un écosystème complexe (pousse de bambou fermentée). Le traçage pourrait également être complété sur des milieux de culture appropriés, par l'isolement d'un certain nombre de colonies, leur identification et leur typage par PCR classique. Éventuellement, le dénombrement sur boite de Pétri pourrait être une possibilité complémentaire pour certaines espèces qui seraient facilement identifiables et différentiables sur milieux de culture.

Afin d'apprécier les rôles fonctionnels et les interactions microbiennes, le suivi des cinétiques d'acidification, de la viscosité, des profils des sucres, des acides aminés, des acides gras ainsi que l'analyse des métabolites seront envisagés par caractérisation du métabolome et du volatilome (UPLC- MS/MS, HPLC-ESI-MS, GC-MS). L'approche proposée qui consiste à des ajouts progressifs de souches permettra d'analyser les interactions et les rôles fonctionnels des souches en présence. Les caractéristiques sensorielles des produits élaborés seront également évaluées (test discriminant et test descriptif) afin d'apprécier les différences sensorielles entre les consortia (des plus simples aux plus complexes). Les caractéristiques biochimiques et rhéologiques des produits finis élaborés seront également mesurées afin d'évaluer si celles-ci sont conformes au labneh Ambaris.

Les génomes des souches issues des consortia les plus intéressants (qualité du produit, métabolites d'intérêts) seront séquencées. Les génomes reconstruits pourront, pour chacune des espèces issues des consortia, être comparés à d'autres génomes d'environnement laitier ou non laitier afin d'identifier les effets de la sélection (notamment le stress acide et salin) sur l'organisation des gènes. Dans le cas où des métabolites à effet santé seraient également identifiés (gènes d'intérêt de médiateurs santé identifiés), il serait aussi intéressant de poursuivre les recherches dans ce domaine pour l'identification de nouvelles souches à effet probiotique, mais également pour la pérennisation de la production du labneh Ambaris.

Ces travaux de thèse complétés par les perspectives évoquées ci-dessus serviront :

✓ A la communauté scientifique : à travers la connaissance et le décryptage des éléments structurant les communautés microbiennes dans des conditions particulières de stress et d'évolution adaptative.

✓ Aux professionnels de la filière laitière : ce procédé particulier pourrait inspirer des innovations de produits : naturels, sains et écologiques (pas de stockage au froid du produit)

✓ Aux producteurs de labneh Ambaris : la connaissance des éléments structurant les communautés microbiennes du produit permettra d'avoir des éléments de maîtrise, notamment sanitaire et organoleptique, du produit.

Si des éléments en faveur de l'aspect santé et sécurité sanitaire des produits sont démontrés, alors le développement et la pérennisation du produit, ainsi que sa valorisation aux niveaux national et international, ne pourront être que renforcés.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont permis de caractériser le labneh Ambaris sur les aspects physicochimique, sensoriel et microbiologique. Ce lait fermenté égoutté est acide (pH moyen de 3,4) avec une matière sèche moyenne de 35%. Des espèces bactériennes et fongiques majoritaires ont été identifiées et retrouvées dans la majorité des échantillons de labneh Ambaris collectés : *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactiplantibacillus plantarum* et *Lactococcus lactis* ainsi que *Geotrichum candidum* et *Pichia kudriavzevii*. Ces espèces s'installent précocement dans le labneh Ambaris et y persistent tout au long de la fermentation avec des abondances variables. Les origines de ces variabilités sont multifactorielles et liées à des facteurs biotiques et abiotiques comme la nature de la microflore résidente spécifique au producteur, microflores résiduelles dans les jarres et celles du lait ajouté durant la production.

Il est important de souligner que le labneh Ambaris est un lait fermenté le plus souvent exempt de bactéries pathogènes et dans lequel on ne détecte pas d'entérobactéries dans le produit fini. Cet état sanitaire remarquable peut être le résultat concomitant des propriétés biochimiques (acidité et taux de sel élevés) et de la grande diversité microbiologique identifiée dans le produit contenant des bactéries lactiques reconnues comme ayant un potentiel inhibiteur d'autres bactéries. Certaines espèces microbiennes qui structurent ce produit sont variables d'un producteur à un autre et pourraient ainsi « personnifier » ce produit car représentatives des pratiques et de l'environnement laitier propres à chaque producteur.

Les rôles fonctionnels des espèces majoritaires, des facteurs biotiques et abiotiques qui régissent la biodiversité microbienne de ce produit, nécessitent d'être plus amplement explorés à travers la construction de consortia synthétiques et le suivi de ce dernier en fabrication 'modèle' (approche « bottom-up »).

Face à l'accélération de l'industrialisation et à la mondialisation, la préservation des patrimoines immatériels culturels est devenue une nécessité. Le labneh Ambaris représente certes un savoir-faire ancestral transmis à travers les générations depuis des temps immémoriaux, mais également une richesse du terroir libanais et une source de biodiversité microbienne unique. Les résultats de cette thèse constituent un point de départ au processus de protection et de valorisation du labneh Ambaris, dans l'objectif à long terme de lui donner une place au sein de l'économie nationale et mondiale.

Références

A

Abi Khalil, R., Yvon, S., Couderc, C., Belahcen, L., Jard, G., Rammouz, R., Nakhoul, P., Eutamene, H., Ayoub, M.-J. & Tormo, H. (2022). Identification of bacterial communities of labneh Ambaris, a traditional Lebanese raw goat's milk product.

Abi Khalil, R., Yvon, S., Couderc, C., Jard, G., El Rammouz, R., Abi Nakhoul, P., Eutamene, H., Ayoub, M.-J. & Tormo, H. (2023). Traditional fermented milks of Eastern Mediterranean countries, a cultural heritage to preserve.

Abiad, M.G., Ajjour, C., Kassaify, Z., Iskandar, C.F., Hamzeh, R. & Hassan, H.F. (2022). Preliminary physiological, phenotypic and probiotic characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Anbaris-traditional Lebanese fermented dairy product. *International Journal of Food Properties*, **25**, 1266–1278.

Abou-Zeid, N.A. (2016). Review of Egyptian Cereal-Based Fermented Product (Kishk), **4**, 10.

Adékambi, T., Drancourt, M. & Raoult, D. (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends in Microbiology*, **17**, 37–45.

Alichanidis, E. & Polychroniadou, A. (2008). Characteristics of major traditional regional cheese varieties of East-Mediterranean countries: a review. *Dairy Science and Technology*, **88**,495–510.

Ammoun, I., Kothe, C.I., Béal, C., Yaacoub, R. & Renault, P. (2021). Biodiversité de la flore lactique autochtone de 3 produits laitiers fermentés de chèvre artisanaux au Liban.

Angelier. (2008). *Les sciences de la complexité et le vivant*.

Ao, X., Zhang, X., Zhang, X., Shi, L., Zhao, K., Yu, J., Dong, L., Cao, Y. & Cai, Y. (2012). Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *Journal of Dairy Science*, **95**, 1073–1084.

Arja R., H.E., Mouawad H., Serhan H. (2001). Les filières et marchés du lait et dérivés en Méditerranée : état des lieux, problématique et méthodologie pour la recherche. *Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 32)*, 148–158.

Ayoub, M.-J., Bechara, P., Habchi, M., Hosri, R., Akl, M., Haj Hassan, S. & Abi Nakhoul, P. (2022). Raw goat's milk fermented Anbaris from Lebanon: insights into the chemical changes and microbial dynamics occurring during an artisanal production, with an accent on yeasts, **89**.

B

Bachrouri, M., Quinto, E. j. & Mora, M. t. (2002). Survival of Escherichia Coli O157:H7 during Storage of Yogurt at Different Temperatures. *Journal of Food Science*, **67**, 1899–1903.

Bag, S., Kumar, S.K. & Tiwari, M.K. (2019). An efficient recommendation generation using relevant Jaccard similarity. *Information Sciences*, **483**, 53–64.

Banjara, N., Suhr, M.J. & Hallen-Adams, H.E. (2015). Diversity of Yeast and Mold Species from aVariety of Cheese Types. *Current Microbiology*, **70**, 792–800.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. & Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, Cheese Ripening and Technology, **11**, 259– 274.

Berg, C. van den & Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems: theoretical aspects. *Water activity: Influences on food quality*, 2–61.

Berodier, A. & Spinnler, H.-E. (2011). Microflore du lait et caractéristiques sensorielles des fromages. In: *Microflore du lait cru. Vers une meilleure connaissance des écosystèmesmicrobiens du lait et de leurs facteurs de variation*. Pp. 31–41.

Beukes, E.M., Bester, B.H. & Mostert, J.F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, **63**, 189–197.

Bintsis, T. (2021). Yeasts in different types of cheese. *AIMS Microbiology*, **7**, 447–470.

Blasche, S., Kim, Y., Mars, R.A.T., Machado, D., Maansson, M., Kafkia, E., Milanese, A., Zeller, G.,Teusink, B., Nielsen, J., Benes, V., Neves, R., Sauer, U. & Patil, K.R. (2021). Metabolic cooperation and spatiotemporal niche partitioning in a kefir microbial community. *Nature Microbiology*, **6**, 196–208.

Bokulich, N.A. & Mills, D.A. (2013). Facility-Specific "House" Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 5214–5223.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolek, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul- Hasan, S., Hooft, J.J.J. van der, Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., Hippel, M. von, Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R. & Caporaso, J.G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, **37**, 852–857.

Boutrou, R. & Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology*, **102**, 1–20.

Boutrou, R., Kerriou, L. & Gassi, J.-Y. (2006). Contribution of *Geotrichum candidum* to theproteolysis of soft cheese. *International Dairy Journal*, **16**, 775–783.

Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S. & Thomas, T. (2011). Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *Proceedings of the NationalAcademy of Sciences*, **108**, 14288–14293.

Burman, E. & Bengtsson-Palme, J. (2021). Microbial Community Interactions Are Sensitive toSmall Changes in Temperature. *Frontiers in Microbiology*, **12**.

Buzzini, P., Turchetti, B. & Yurkov, A. (2018). Extremophilic yeasts: the toughest yeasts

around? *Yeast (Chichester, England)*, **35**, 487–497.

C

Calasso, M., Ercolini, D., Mancini, L., Stellato, G., Minervini, F., Di Cagno, R., De Angelis, M. & Gobbetti, M. (2016). Relationships among house, rind and core microbiotas during manufacture of traditional Italian cheeses at the same dairy plant. *Food Microbiology*,**54**, 115–126.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. & Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, **13**, 581–583.

Casey, M.G., Häni, J.P., Gruskovnjak, J., Schaeren, W. & Wechsler, D. (2006). Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese. Le Lait, **86**, 407–414.

Chammas, I., Saliba, R. & Béal, C. (2006). Characterization of the Fermented Milk "Laban" with Sensory Analysis and Instrumental Measurements. *Journal of Food Science*, **71**, S156– S162.

Chandan, R.C. (2013). History and consumption trends. In: *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* (edited by R.C. Chandan & A. Kilara). Pp. 1–20. Oxford: John Wiley & Sons.

Chen, C.-C., Lai, C.-C., Huang, H.-L., Huang, W.-Y., Toh, H.-S., Weng, T.-C., Chuang, Y.-C., Lu, Y.-C. & Tang, H.-J. (2019). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem- Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, **10**.

Chen, Y.C., Eisner, J.D., Kattar, M.M., Rassoulian-Barrett, S.L., LaFe, K., Yarfitz, S.L., Limaye, A.P. & Cookson, B.T. (2000). Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 2302–2310.

Codex Alimentarius. (2018). Standard for fermented milks, CXS 243-2003.

Conner, D.E., Scott, V.N. & Bernard, D.T. (1990). Growth, Inhibition, and Survival of *Listeria monocytogenes* as Affected by Acidic Conditions. *Journal of Food*

Protection, **53**, 652–655.

Coulon, J.-B., Delacroix-Buchet, A., Martin, B. & Pirisi, A. (2004). Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. *Le Lait*, **84**, 221–241.

D

da Silva Sabo, S. da, Vitolo, M., González, J.M.D. & Oliveira, R.P. de S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria.*Food Research International*, **64**, 527–536.

Davidson, P.M., Taylor, T.M. & Schmidt, S.E. (2012). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. In: *Food Microbiology*. Pp. 765–801. John Wiley & Sons, Ltd.

de Almeida Brasiel, P.G. de, Dutra Medeiros, J., Barbosa Ferreira Machado, A., Schuchter Ferreira, M., Gouveia Peluzio, M. do C. & Potente Dutra Luquetti, S.C. (2021). Microbial community dynamics of fermented kefir beverages changes over time. *International Journal of Dairy Technology*, **74**, 324–331.

De Roy, K., Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Van de Wiele, T. & Boon, N. (2014). Synthetic microbial ecosystems: an exciting tool to understand and apply microbial communities.*Environmental Microbiology*, **16**, 1472–1481.

Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J.-L., Barbier, G. & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *International Journal of Food Microbiology*, **151**,247–251.

Delgado-Pertiñez, M., Alcalde, M.J., Guzmán-Guerrero, J.L., Castel, J.M., Mena, Y. & Caravaca, F.(2003). Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Ruminant Research*, **47**, 51–61.

Demarigny, Y. (2012). Fermented food products made with vegetable materials from tropical and warm countries: microbial and technological considerations. *International Journal ofFood Science & Technology*, **47**, 2469–2476.

Demarigny, Y., Dalmasso, M., Tonleu, A., Rigobello, V., Beuvier, E., Ly-Chatain, M.H. & Bouton, Y. (2011). Influence of the Backslopping Practice on the Microbial Diversity of the *Lactococcus lactis* Population in a Model Cheesemaking. *Food and*

NutritionSciences, **02**, 618–627.

Demarigny, Y. & Gerber, P. (2014). Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Exampleof Cheeses and Bread. *Food and Nutrition Sciences*, **05**, 1679–1691.

Demarigny, Y., Sabatier, C., Laurent, N., Prestoz, S., Rigobello, V. & Blachier, M.J. (2006). Microbiological diversity in natural whey starters used to make traditional Rocamadour goat cheese and possible relationships with its bitterness. *Italian Journal of Food Science (Italy)*.

Demirhan, E., Gürses, B., Yalçin, B.E., Apar, D.K. & Özbek, B. (2013). Influence of vitamin (B1, B6, B9, B12, C) and ions (Cu2+, Mn2+, PO43−) on kefir grain biomass growth. *Food Science and Biotechnology*, **22**, 1007–1013.

Desai, N.T., Shepard, L. & Drake, M.A. (2013). Sensory properties and drivers of liking for Greekyogurts. *Journal of Dairy Science*, **96**, 7454–7466.

Desmasures, N. & Beuvier, E. (2011). Chapitre 1: Ce qu'il faut savoir avant d'intervenir sur les microflores des laits. Partie 1 : Nature et quantité de microflores des laits. In: *Microfloredu lait cru*. Pp. 17–26.

Didienne, R., Defargues, C., Callon, C., Meylheuc, T., Hulin, S. & Montel, M.-C. (2012). Characteristics of microbial biofilm on wooden vats ('gerles') in PDO Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **156**, 91–101.

Dimassi, O., Iskandarani, Y., Afram, M., Akiki, R. & Rached, M. (2020a). Production and physicochemical properties of labneh anbaris, a traditional fermented cheese like product, in Lebanon. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, **5**, 509–516.

Dimassi, O., Iskandarani, Y. & Akiki, R. (2020b). Effect of followed production procedures on the physicochemical properties of labneh anbaris. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, **5**.

Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A. & Garrote, G.L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **30**, 43–53.

Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E. & Silva, C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, **63**, 178–190.

Dong, J., Liu, B., Jiang, T., Liu, Y. & Chen, L. (2018). The biofilm hypothesis: The formation mechanism of Tibetan kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, **71**, 44–50.

Du, A. & Alemseged, Z. (2018). Diversity analysis of Plio-Pleistocene large mammal communities in the Omo-Turkana Basin, eastern Africa. *Journal of Human Evolution*, **124**, 25–39.

Duran, F.E., Özdemir, N., Güneşer, O. & Kök-Taş, T. (2022). Prominent strains of kefir grains in the formation of volatile compound profile in milk medium; the role of *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens, Lentilactobacillus kefiri* and *Lentilactobacillus parakefiri*. *European Food Research and Technology*, **248**, 975–989.

Duteurtre, P.G. (2009). « La tradition laitière africaine : un héritage menacé ? », 12.

Dziuba, B. & Nalepa, B. (2012). Identification of Lactic Acid Bacteria and Propionic Acid Bacteria using FTIR Spectroscopy and Artificial Neural Networks. *Food Technology and Biotechnology*, **50**, 399–405.

E

El Balaa, R. (2009). Durabilité de la filière laitière des petits ruminants au Liban : analyse et signe de qualité label “Baladi.”

Ercolini, D. (2013). High-Throughput Sequencing and Metagenomics: Moving Forward in the Culture-Independent Analysis of Food Microbial Ecology. *Applied and EnvironmentalMicrobiology*, **79**, 3148–3155.

Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez- Raquet, G., Combes, S. & Pascal, G. (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics*, **34**, 1287–1294.

F

Fguiri, I., Ziadi, M., Atigui, M., Ayeb, N., Arroum, S., Assadi, M. & Khorchani, T. (2016). Isolation and characterisation of lactic acid bacteria strains from raw camel milk for potential use in the production of fermented Tunisian dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, **69**, 103–113.

Fleet, G.H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, **68**, 199–211.

Fleet, G.H. (2011). Chapter 5 - Yeast Spoilage of Foods and Beverages. In: *The Yeasts (Fifth Edition)* (edited by C.P. Kurtzman, J.W. Fell & T. Boekhout). Pp. 53–63. London: Elsevier.

Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. & Gombert, A.K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*,**79**, 339–354.

Fouad, A.F., Barry, J., Caimano, M., Clawson, M., Zhu, Q., Carver, R., Hazlett, K. & Radolf, J.D. (2002). PCR-Based Identification of Bacteria Associated with Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 3223–3231.

Fournier, P.-E. & Raoult, D. (2010). Chapter 7 - Bacterial genomes. In: *Infectious Diseases (ThirdEdition)* (edited by J. Cohen, S.M. Opal & W.G. Powderly). Pp. 86–91. London: Mosby.

Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M.R.,Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V.C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H.D., Martins, N. & Rodrigues, C.F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past toPresent. *Microorganisms*, **7**, 130.

Franzosa, E.A., Hsu, T., Sirota-Madi, A., Shafquat, A., Abu-Ali, G., Morgan, X.C. & Huttenhower, C.(2015). Sequencing and beyond: integrating molecular "omics" for microbial communityprofiling. *Nature Reviews. Microbiology*, **13**, 360–372.

Frétin, M., Martin, B., Rifa, E., Isabelle, V.-M., Pomiès, D., Ferlay, A., Montel, M.-C. & Delbès, C. (2018). Bacterial community assembly from cow teat skin to ripened cheeses is influenced by grazing systems. *Scientific Reports*, **8**, 200.

Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E. & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, **36**, 129–141. Gantzias, C., Lappa, I.K., Aerts, M., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Papadimitriou, K., De Brandt, E., Tsakalidou, E. & Vandamme, P. (2020). MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *International Journal of Food Microbiology*, **323**, 108586.

G

Gantzias, C., Lappa, I.K., Aerts, M., Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Papadimitriou, K., De Brandt, E., Tsakalidou, E. & Vandamme, P. (2020). MALDI-TOF MS profiling of non-starter lactic acid bacteria from artisanal cheeses of the Greek island of Naxos. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 108586.

Gentry, T.J., Pepper, I.L. & Pierson, L.S. (2015). Chapter 19 - Microbial Diversity and Interactionsin Natural Ecosystems. In: *Environmental Microbiology (Third Edition)* (edited by I.L. Pepper, C.P. Gerba & T.J. Gentry). Pp. 441–460. San Diego: Academic Press.

Georgalaki, M., Zoumpopoulou, G., Anastasiou, R., Kazou, M. & Tsakalidou, E. (2021). Lactobacillus kefiranofaciens: From Isolation and Taxonomy to Probiotic Properties and Applications. *Microorganisms*, **9**, 2158.

Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation: Table 1. *FEMS Microbiology Reviews*, **28**, 251–260.

Giraffa, G. & Neviani, E. (2001). DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, **67**, 19–34.

Groenenboom, A.E., Shindano, J., Cheepa, N., Smid, E.J. & Schoustra, S.E. (2020). Microbial population dynamics during traditional production of Mabisi, a spontaneous fermented milk product from Zambia: a field trial. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **36**, 184.

Haddad, E. & Chamoun, N. (2014). Diagnostic et stratégie locale de la Bekaa et Baalbeck-Hermel ANIMA Investment Network [Internet document] URL http://www.animaweb.org/fr/diagnostic-strategie-locale-bekaa-baalbeck-hermel. Accessed 24/04/2020.

Hajj Semaan, E., Dib, H., Abi Ramia, R. & Chedid, M. (2011). Chemical characterization and bacteriological quality of Lebanese traditional dairy goats products. *Lebanese Science Journal*, Caracterisation chimique et qualité bacteriologique de produits laitiers caprins traditionnels libanais, 21–29.

Hao, M., Corral-Rivas, J.J., González-Elizondo, M.S., Ganeshaiah, K.N., Nava-Miranda, M.G., Zhang, C., Zhao, X. & Gadow, K. von. (2019). Assessing biological

dissimilarities between five forest communities. *Forest Ecosystems*, **6**, 30.

H

Heaney, H., Laing, J., Paterson, L., Walker, A.W., Gow, N.A.R., Johnson, E.M., MacCallum, D.M. & Brown, A.J.P. (2020). The environmental stress sensitivities of pathogenic *Candida* species, including *Candida auris*, and implications for their spread in the hospital setting.*Medical Mycology*, **58**, 744–755.

Henney, J.E., Taylor, C.L. & Boon, C.S. (2010). *Preservation and Physical Property Roles of Sodium in Foods. Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States*. National Academies Press (US).

Hickey, C.D., Sheehan, J.J., Wilkinson, M.G. & Auty, M.A.E. (2015). Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review. *Frontiers in Microbiology*, **6**.

Hill, C. & Ross, R.P. (1998). Starter cultures for the dairy industry. In: *Genetic Modification in the Food Industry* (edited by S. Roller & S. Harlander). Pp. 174–192. Boston, MA: Springer US.

Höfling, J.F., Rosa, E.A.R., Baptista, M.J. & Spolidório, D.M.P. (1997). New Strategies on Molecular Biology Applied to Microbial Systematics. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **39**, 345–352.

I

Iknayan, K.J., Tingley, M.W., Furnas, B.J. & Beissinger, S.R. (2014). Detecting diversity: emerging methods to estimate species diversity. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**, 97–106.

Irigoyen, A. (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, **90**, 613–620.

J

Jany, J.-L. & Barbier, G. (2008). Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, **25**, 839–848.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A. & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiology*, **27**, 710–730.

Jin, Q. & Kirk, M.F. (2018). pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective. *Frontiers in Environmental Science*, **6**.

Johansen, P.G., Owusu-Kwarteng, J., Parkouda, C., Padonou, S.W. & Jespersen, L. (2019). Occurrence and Importance of Yeasts in Indigenous Fermented Food and Beverages Produced in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Microbiology*, **10**.

K

Kabak, B. & Dobson, A.D.W. (2011). An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**, 248–260.

Kamimura, B.A., Cabral, L., Noronha, M.F., Baptista, R.C., Nascimento, H.M. & Sant'Ana, A.S. (2020). Amplicon sequencing reveals the bacterial diversity in milk, dairy premises and Serra da Canastra artisanal cheeses produced by three different farms. *Food Microbiology*, **89**, 103453.

Karaduman, A., Ozaslan, M.O., Kilic, I.H., Bayil-Oguzkan, S., Kurt, B.S. & Erdogan, N. (2017). Identification by using MALDI-TOF mass spectrometry of lactic acid bacteria isolated from non-commercial yogurts in southern Anatolia, Turkey. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, **20**, 25–30.

Kazou, M., Grafakou, A., Tsakalidou, E. & Georgalaki, M. (2021). Zooming Into the Microbiota of Home-Made and Industrial Kefir Produced in Greece Using Classical Microbiological and Amplicon-Based Metagenomics Analyses. *Frontiers in Microbiology*, **12**.

Kesmen, Z. & Kacmaz, N. (2011). Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. *Journal ofFood Science*, **76**, M276–M283.

Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R.B., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.-H., Lee, J.-H., Kim, H.B. & Isaacson, R.E. (2017a). Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *Journal of Microbiology and*

Biotechnology, **27**, 2089–2093.

Kim, D.-H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I.-B., Chon, J.-W., Song, K.-Y. & Seo, K.-H. (2016). Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **36**, 787–790.

Kim, D.-H., Jeong, D., Kim, H. & Seo, K.-H. (2019). Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **59**, 1782–1793.

Kim, D.-H., Jeong, D., Song, K.-Y. & Seo, K.-H. (2018). Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. *LWT*, **97**, 503–507.

Kim, I.S., Hur, Y.K., Kim, E.J., Ahn, Y.-T., Kim, J.G., Choi, Y.-J. & Huh, C.S. (2017b). Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **30**, 1643–1650.

Kljajevic, N.V., Tomasevic, I.B., Miloradovic, Z.N., Nedeljkovic, A., Miocinovic, J.B. & Jovanovic, S.T. (2018). Seasonal variations of Saanen goat milk composition and the impact of climatic conditions. *Journal of Food Science and Technology*, **55**, 299–303.

Korsak, N., Taminiau, B., Leclercq, M., Nezer, C., Crevecoeur, S., Ferauche, C., Detry, E., Delcenserie, V. & Daube, G. (2015). Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. *Journal of Dairy Science*, **98**, 3684–3689.

Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P. & Drosinos, E.H. (2010). Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, **21**,805–815.

L

Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D. & Labrie, S. (2012). Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science &Technology*, **92**, 455–468.

Lebert, I., Begot, C. & Lebert, A. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25 degrees C). *International Journal of Food Microbiology*, **39**, 53–60.

Levasseur-Garcia, C., Couderc, C. & Tormo, H. (2017). Discrimination of lactic acid bacteria *Enterococcus* and *Lactococcus* by infrared spectroscopy and multivariate techniques. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **25**, 231–241.

Lortal, S., Di Blasi, A., Madec, M.-N., Pediliggieri, C., Tuminello, L., Tanguy, G., Fauquant, J., Lecuona, Y., Campo, P., Carpino, S. & Licitra, G. (2009). Tina wooden vat biofilm: A safe and highly efficient lactic acid bacteria delivering system in PDO Ragusano cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, **132**, 1–8.

Lourens-Hattingh, A. & Viljoen, B.C. (2002). Survival of dairy-associated yeasts in yoghurt and yoghurt-related products. *Food Microbiology*, **19**, 597.

Ludwig, J.A. & Reynolds, J.F. (1988). *Statistical Ecology: A Primer in Methods and Computing*. John Wiley & Sons.

M

Maïworé, J., Tatsadjieu Ngoune, L., Piro-Metayer, I. & Montet, D. (2019). Identification of yeasts present in artisanal yoghurt and traditionally fermented milks consumed in the northern part of Cameroon. *Scientific African*, **6**, e00159.

Mauriello, G., Moio, L., Genovese, A. & Ercolini, D. (2003). Relationships Between Flavoring Capabilities, Bacterial Composition, and Geographical Origin of Natural Whey Cultures Used for Traditional Water-Buffalo Mozzarella Cheese Manufacture. *Journal of Dairy Science*, **86**, 486–497.

McAuliffe, O. (2018). Symposium review: *Lactococcus lactis* from nondairy sources: Their genetic and metabolic diversity and potential applications in cheese1. *Journal of Dairy Science*, **101**, 3597–3610.

McHugh, A.J., Yap, M., Crispie, F., Feehily, C., Hill, C. & Cotter, P.D. (2021). Microbiome-based environmental monitoring of a dairy processing facility highlights the challenges associated with low microbial-load samples. *npj Science of Food*, **5**, 4.

Meola, M., Rifa, E., Shani, N., Delbès, C., Berthoud, H. & Chassard, C. (2019). DAIRYdb: a manually curated reference database for improved taxonomy annotation of 16S rRNA gene sequences from dairy products. *BMC Genomics*, **20**, 560.

Michailidou, S., Pavlou, E., Pasentsis, K., Rhoades, J., Likotrafiti, E. & Argiriou, A. (2021). Microbial profiles of Greek PDO cheeses assessed with amplicon metabarcoding. *FoodMicrobiology*, **99**, 103836.

Michel, V. & Laithier, C. (2009). Prélèvement des flores mobilisables dans la machine à traire.

Mollet, C., Drancourt, M. & Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis forbacterial identification. *Molecular Microbiology*, **26**, 1005–1011.

Montel, M.-C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. & Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, **177**, 136–154.

Mounier, J., Goerges, S., Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Brennan, N.M., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F. & Cogan, T.M. (2006). Sources of the adventitious microflora of a smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*,**101**, 668–681.

Muehlhoff, E., Bennett, A., MacMahon, D. & Food and Agriculture Organization of the United Nations (Eds.). (2013). *Milk and dairy products in human nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzedchain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**, 335–350.

N

Ndoye, B., Rasolofo, E.A., LaPointe, G. & Roy, D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology*, **91**, 495–524.

Nejati, F., Junne, S., Kurreck, J. & Neubauer, P. (2020). Quantification of Major Bacteria and Yeast Species in Kefir Consortia by Multiplex TaqMan qPCR. *Frontiers in*

Microbiology, **11**, 1291.

Nyambane, B., Thari, W.M., Wangoh, J. & Njage, P.M.K. (2014). Lactic acid bacteria and yeasts involved in the fermentation of amabere amaruranu, a Kenyan fermented milk. *Food Science & Nutrition*, **2**, 692–699.

O

Ołdak, A., Zielińska, D., Łepecka, A., Długosz, E. & Kołożyn-Krajewska, D. (2020). *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **12**, 1025–1038.

P

Palleroni, N.J. (2005). Genus I. Pseudomonas Migula 1894. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pp. 323–379. New York, USA: Springer.

Pasolli, E., De Filippis, F., Mauriello, I.E., Cumbo, F., Walsh, A.M., Leech, J., Cotter, P.D., Segata, N. & Ercolini, D. (2020). Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. *Nature Communications*, **11**, 2610.

Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C. & Requena, T. (2019). Fermented Dairy Products. In: *How Fermented Foods Feed a Healthy Gut Microbiota* (edited by M.A. Azcarate-Peril, R.R. Arnold & J.M. Bruno-Bárcena). Pp. 35–55. Cham: Springer International Publishing.

Penland, M., Falentin, H., Parayre, S., Pawtowski, A., Maillard, M.-B., Thierry, A., Mounier, J., Coton, M. & Deutsch, S.-M. (2021). Linking Pélardon artisanal goat cheese microbial communities to aroma compounds during cheese-making and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, **345**, 109130.

Picon, A., López-Pérez, O., Torres, E., Garde, S. & Nuñez, M. (2019). Contribution of autochthonous lactic acid bacteria to the typical flavour of raw goat milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, **299**, 8–22.

Pisano, M.B., Deplano, M., Fadda, M.E. & Cosentino, S. (2019). Microbiota of Sardinian Goat's Milk and Preliminary Characterization of Prevalent LAB Species for Starter or Adjunct Cultures Development. *BioMed Research International*, **2019**, 6131404.

Pochon, X., Zaiko, A., Fletcher, L.M., Laroche, O. & Wood, S.A. (2017). Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblagesfor biosecurity applications. *PLoS ONE*, **12**, e0187636.

Prado, M.R., Blandón, L.M., Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., Castro, G.R., Thomaz-Soccol, V. & Soccol, C.R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1177.

Q

Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Cotter, P.D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milkcheese. *International Journal of Food Microbiology*, **150**, 81–94.

Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. & Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 664–698.

Quijada, N.M., Mann, E., Wagner, M., Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M. & Schmitz-Esser, S. (2018). Autochthonous facility-specific microbiota dominates washed-rind Austrian hardcheese surfaces and its production environment. *International Journal of Food Microbiology*, **267**, 54–61.

Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J. & Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nature Biotechnology*, **35**, 833–844.

Quintana, Á.R., Seseña, S., Garzón, A. & Arias, R. (2020). Factors Affecting Levels of Airborne Bacteria in Dairy Farms: A Review. *Animals*, **10**, 526.

R

Radecka, D., Mukherjee, V., Mateo, R.Q., Stojiljkovic, M., Foulquié-Moreno, M.R. & Thevelein, J.M. (2015). Looking beyond Saccharomyces: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS yeast research*, **15**, fov053.

Rahmani, B., Alimadadi, N., Attaran, B. & Nasr, S. (2022). Yeasts from Iranian traditional milk kefir samples: isolation, molecular identification and their potential

probiotic properties.*Letters in Applied Microbiology*.

Randazzo, C.L., Pitino, I., Ribbera, A. & Caggia, C. (2010). Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. *Food Microbiology*, **27**, 363–374.

Reynaud, A.E., Coude, D.F.B. & Courtieu, A.L. (1988). Comparative study of various API galeries for the identification of gram negative bacteria. *Annales de biologie clinique*, **46**, 259– 262.

Ritchie, D. (1986). Shannon And Weaver: Unravelling the Paradox of Information. *Communication Research*, **13**, 278–298.

Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. & Flandrois, J.P. (1995). Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 610–616.

Russo, G., Libkind, D., Sampaio, J.P. & Broock, M.R. van. (2008). Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS microbiology ecology*, **65**, 415–424.

S

Salazar, J.K., Carstens, C.K., Ramachandran, P., Shazer, A.G., Narula, S.S., Reed, E., Ottesen, A. & Schill, K.M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized Gouda cheese usingtargeted 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiology*, **18**, 189.

Saleh, F.A. (2013). Isolation and identification of microorganisms and antibacterial activity of Laban Zeer, an Egyptian traditional fermented milk product. *Scientific Journal of Microbiology*, **2**, 31–42.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**,5463–5467.

Sant'Anna, F.M., Wetzels, S.U., Cicco, S.H.S., Figueiredo, R.C., Sales, G.A., Figueiredo, N.C., Nunes, C.A., Schmitz-Esser, S., Mann, E., Wagner, M. & Souza, M.R. (2019). Microbial shifts in Minas artisanal cheeses from the Serra do Salitre region of Minas Gerais, Brazilthroughout ripening time. *Food Microbiology*, **82**, 349–362.

Schroeder, P.J. & Jenkins, D.G. (2018). How robust are popular beta diversity indices to sampling error? *Ecosphere*, **9**, e02100.

Serhan, M. & Mattar, J. (2013). Characterization of four Lebanese artisanal goat milk cheeses: shankleesh, darfiyeh, aricheh and Serdale by physico-chemical microbiological and sensory analyses. *Journal of Food Agriculture and Environment*, **11**, 97–101.

Serhan, M., Mattar, J. & Debs, L. (2016). Concentrated yogurt (Labneh) made of a mixture of goats' and cows' milk: Physicochemical, microbiological and sensory analysis. *Small Ruminant Research*, **138**, 46–52.

Settanni, L. & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheesequality and provide health benefits. *Food Microbiology*, **27**, 691–697.

Shevtsov, A.B., Kushugulova, A.R., Tynybaeva, I.K., Kozhakhmetov, S.S., Abzhalelov, A.B., Momynaliev, K.T. & Stoyanova, L.G. (2011). Identification of phenotypically and genotypically related *Lactobacillus* strains based on nucleotide sequence analysis of the*groEL*, *rpoB*, *rplB*, and 16S rRNA genes. *Microbiology*, **80**, 672–681.

Sieuwerts, S. (2016). Microbial Interactions in the Yoghurt Consortium: Current Status and Product Implications. *SOJ Microbiology & Infectious Diseases*, **4**, 01–05.

Simpson, E.H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, **163**, 688–688.

Sinapis, E. (2007). The effect of machine or hand milking on milk production, composition and SCC in mountainous Greek breed (Boutsiko) ewes. *Small Ruminant Research*, **69**, 242–246.

Sindi, A., Badsha, Md.B. & Ünlü, G. (2020). Bacterial Populations in International Artisanal Kefirs. *Microorganisms*, **8**, 1318.

Sommer, S.S., Groszbach, A.R. & Bottema, C.D. (1992). PCR amplification of specific alleles(PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *BioTechniques*, **12**, 82–87.

Spratt, D.A. (2004). Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endodontic Topics*, **9**, 5–14.

Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M.A. & Vogel, R.F. (2013). Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*, **35**, 92–98.

T

Tabet, E., Mangia, N.P., Mouannes, E., Hassoun, G., Helal, Z. & Deiana, P. (2016). Characterization of goat milk from Lebanese Baladi breed and his suitability for setting up a ripened cheese using a selected starter culture. *Small Ruminant Research*, **140**, 13–17.

Tabet, E., Salameh, C., Nehme, M., daher, joseph & Hosri, C. (2019). Innovation aspects of Serdaleh, a traditional Lebanese cheese produced from raw extensive goat's milk.

Tamang, J.P., Cotter, P.D., Endo, A., Han, N.S., Kort, R., Liu, S.Q., Mayo, B., Westerik, N. & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **19**, 184–217.

Thuillier, B., Valentin, D., Marchal, R. & Dacremont, C. (2015). Pivot© profile: A new descriptive method based on free description. *Food Quality and Preference*, **42**, 66–77.

Todorov, S.D. & Dicks, L.M.T. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*, 41, 11–19.

Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Lekhal, D. & Roques, C. (2011). Relationship between the Production Conditions of Goat's Milk and the Microbial Profiles of Milk. *International Journal of Dairy Science*, **6**, 13–28.

Tormo, H., Lekhal Ali H., D. & Roques, C. (2015). 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. *International Journal of Food Microbiology*, **210**, 9–15.

Toufeili, I., Melki, C., Shadarevian, S. & Robinson, R.K. (1998). Some nutritional and sensory properties of bulgur and whole wheatmeal kishk (a fermented milk-wheat mixture).*Food Quality and Preference*, **10**, 9–15.

Toufeili, I., Shadarevian, S., Artinian, T. & Tannous, R. (1995). Ripening changes and sensory properties of bovine, caprine and ovine shankleesh. *International Dairy Journal*, **5**, 179–189.

Treguier, S., Couderc, C., Tormo, H., Kleiber, D. & Levasseur-Garcia, C. (2019). Identification of lactic acid bacteria *Enterococcus* and *Lactococcus* by near-infrared spectroscopy and multivariate classification. *Journal of Microbiological Methods*, **165**, 105693.

V

Vardjan, T., Mohar Lorbeg, P., Rogelj, I. & Čanžek Majhenič, A. (2013). Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of Dairy Science*, **96**,2729–2736.

Vieira, C.P., Rosario, A.I.L.S., Lelis, C.A., Rekowsky, B.S.S., Carvalho, A.P.A., Rosário, D.K.A., Elias, T.A., Costa, M.P., Foguel, D. & Conte-Junior, C.A. (2021a). Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2021**, 1–34.

Vieira, L.V., Sousa, L.M. de, Maia, T.A.C., Gusmão, J.N.F.M., Goes, P., Pereira, K.M.A., Miyajima, F. & Gondim, D.V. (2021b). Milk Kefir therapy reduces inflammation and alveolar bone loss on periodontitis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **139**, 111677.

von Gastrow, L. von. (2022). Dynamique des communautés microbiennes de produits fermentés entretenus par “back-slopping”, une démarche de recherche participative, 288.

von Gastrow, L. von, Madec, M.-N., Chuat, V., Lubac, S., Morinière, C., Lé, S., Santoni, S., Sicard, D. & Valence, F. (2020). Microbial Diversity Associated with Gwell, a Traditional French Mesophilic Fermented Milk Inoculated with a Natural Starter. *Microorganisms*, **8**, 982.

Vos, M., Quince, C., Pijl, A.S., Hollander, M. de & Kowalchuk, G.A. (2012). A Comparison of *rpoB* and 16S rRNA as Markers in Pyrosequencing Studies of Bacterial Diversity. *PLoS ONE*, **7**,e30600.

W

Wang, S.-Y., Chen, K.-N., Lo, Y.-M., Chiang, M.-L., Chen, H.-C., Liu, J.-R. & Chen, M.-J. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *FoodMicrobiology*, **32**, 274–285.

Wang, S.-Y., Huang, R.-F., Ng, K.-S., Chen, Y.-P., Shiu, J.-S. & Chen, M.-J. (2021). Co-Culture Strategy of *Lactobacillus kefiranofaciens* HL1 for Developing Functional Fermented Milk.*Foods*, **10**, 2098.

Watkins, P.J., Jaborek, J.R., Teng, F., Day, L., Castada, H.Z., Baringer, S. & Wick, M. (2021). Branched chain fatty acids in the flavour of sheep and goat milk and meat: A review. *Small Ruminant Research*, **200**, 106398.

Weissenbach, J. & Sghir, A. (2016). Microbiotes et métagénomique. *médecine/sciences*, **32**, 937–943.

X

Xiao, J., Chen, Y., Li, J., Shi, X., Deng, L. & Wang, B. (2020). Evaluation of the Effect of Auxiliary Starter Yeasts With Enzyme Activities on Kazak Cheese Quality and Flavor. *Frontiers inMicrobiology*, **11**.

Y

Yap, M., Ercolini, D., Álvarez-Ordóñez, A., O'Toole, P.W., O'Sullivan, O. & Cotter, P.D. (2022). Next-Generation Food Research: Use of Meta-Omic Approaches for Characterizing Microbial Communities Along the Food Chain. *Annual Review of Food Science and Technology*, **13**, 361–384.

Yeluri Jonnala, Bhagya.R., McSweeney, P.L.H., Sheehan, J.J. & Cotter, P.D. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry. *Frontiers in Microbiology*, **9**.

Yu, J., Wang, W.H., Menghe, B.L.G., Jiri, M.T., Wang, H.M., Liu, W.J., Bao, Q.H., Lu, Q., Zhang, J.C., Wang, F., Xu, H.Y., Sun, T.S. & Zhang, H.P. (2011). Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of Dairy Science*, **94**, 3229–3241.

Z

Zacharof, M.P. & Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, **2**, 50–56.

Zago, M., Bardelli, T., Rossetti, L., Nazzicari, N., Carminati, D., Galli, A. & Giraffa, G. (2021). Evaluation of bacterial communities of Grana Padano cheese by DNA metabarcoding and DNA fingerprinting analysis. *Food Microbiology*, **93**, 103613.

Zanirati, D.F., Abatemarco, M., Sandes, S.H. de C., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C. & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, **32**, 70–76.

Zelezniak, A., Andrejev, S., Ponomarova, O., Mende, D.R., Bork, P. & Patil, K.R. (2015). Metabolic dependencies drive species co-occurrence in diverse microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**,6449–6454.

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M.A.P., Harris, H.M.B., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G.E., Gänzle, M.G. & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **70**, 2782–2858.

Zhong, Z., Hou, Q., Kwok, L., Yu, Z., Zheng, Y., Sun, Z., Menghe, B. & Zhang, H. (2016). Bacterial microbiota compositions of naturally fermented milk are shaped by both geographic origin and sample type. *Journal of Dairy Science*, **99**, 7832–7841

Annexes

Annexe 1. Des chèvres de race « Baladi » en pâturage dans la région de la Bekaa au Liban.



Annexe 2 : Questionnaire pour l'analyse sensorielle et la mise au point du dictionnaire sensoriel – méthode PIVOT

Date : Nom :

Vous allez déguster un produit laitier afin de le caractériser pour un projet de recherche.

Vous trouverez devant vous deux échantillons : l'un qui sera l'échantillon et l'autre la référence. Ce dernier est identifié comme tel et porte le code 000. Il en sera de même tout au long de l'analyse sensorielle.

L'objectif de cette analyse est de comparer un à un l'ensemble des produits concernés à la référence choisie. Pour cela, vous devrez les goûter tour à tour et leur donner des descripteurs ou des attributs qui les caractérisent tout en les comparant à la référence.

En résumé, vous devez répondre à 2 questions :

-quels attributs sensoriels l'échantillon possède-t-il en plus forte intensité par rapport à la référence et ;

-quels attributs sensoriels l'échantillon possède-t-il en plus faible intensité par rapport à la référence.

Les attributs doivent être sous la forme d'un seul mot et non d'un groupe de mots et uniquement sous la forme AFFIRMATIVE telle que "doux" ou "clair" (NON NÉGATIVE tel que "non lisse" ou "non sombre").

Vous êtes libre de donner autant de descripteurs que vous le souhaitez, aucune restriction n'est imposée.

Ce travail se fera en quatre phases : visuel, texture, goût/saveur/arôme et odeur.

Code de l'échantillon: _____

Phase	L'échantillon est PLUS----que le pivot	L'échantillon est MOINS----que le pivot
Visuelle	Blanc, brilliant	Beige, mate
Texture en bouche		
Goût/saveur		
Odeur		

Annexe 3 : Questionnaire adopté pour l'analyse sensorielle descriptive du labneh Ambaris avec les définitions de chaque descripteur

Nom: **Date:**

Vous recevrez un échantillon codé d'ambaris. S'il vous plait de l'observer, le sentir puis le goûter attentivement, afin de noter les descripteurs mentionnés dans la phase correspondante. A noter que l'échelle à utiliser s'étend de 1 (le descripteur est peu intense) jusqu'à 7 (le descripteur est très intense). Ne pas oublier après avoir fini chaque échantillon de se rincer la bouche avec l'eau et manger le morceau de pain.

Code échantillon : _____

Phase 1: Apparence/ *Appearance*

Intensité de couleur/ *Colour intensity*

1 (Blanc)	2	3	4 (beige)	5	6	7 (Jaune)

Brillant/Shiny

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Phase 2: Odeur/ *Odour*

Odeur de chèvre/*Goat smell*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Phase 3 : Texture en bouche/Texture in mouth

Humide/*Humid*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Gras/ *Fatty*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Granuleux / *Grainy-sandy*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Fondante/ *Melting*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Phase 4 : Saveur-Goût -Arome/ Flavor-Taste-Aroma

Salé/*Salty*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Acide/ *Acid*

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Amer/ Bitter

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

Goût de chèvre/ Goat flavor

1 (peu intense)	2	3	4	5	6	7 (très intense)

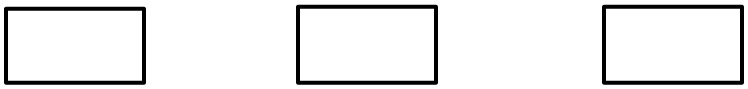
Phase	Descripteur (fr)	Descriptor (eng)	Definitions
Phase 1: Apparence/ *Appearance*	Intensité de couleur	*Colour intensity*	Couleur allant du blanc au jaune avec la couleur beige étant la moyenne. *Colour ranging from very white to dark beige, with beige being the middle*
	Brillant	*Shiny*	La surface est brillante, humide par opposition à mate *The surface is shiny, moist or sweaty-looking, as opposed to matt*
Phase 2: Odeur/ *Odour*	Odeur de chèvre	*Goat smell*	Odeur caractéristique des produits à base de lait de chèvres *Characteristic odor of goat milk products*
Phase 3 : Texture en bouche/Texture in mouth	Humide	*Humid*	Le degré d'humidité dans le produit (contrairement à la sécheresse) *The degree of moisture in the product (contrary of dryness)*
	Gras	Fatty	Représente la lourdeur après que le produit est comprimé par la langue contre le toit de la bouche - Le produit colle sur les parois internes de la bouche – nous laisse penser au beurre *Represents heaviness after the product is compressed by the tongue against the roof of the mouth - The product sticks to the internal walls of the mouth - makes us think of butter*
	Granuleux	*Grainy/sandy*	Sensation de petites particules sur la langue *Sensation of small particles on the tongue*
	Fondante	*Melting*	C'est la texture qui emplit la bouche et le palais, en gardant tout de même un peu d'épaisseur et de consistance. Ce n'est pas liquide en bouche, mais plus épais que la sensation de coulant, comme le chocolat *It is the texture that fills the mouth and the palate, while keeping a little thickness and consistency. It is not runny in the mouth, but thicker than the feeling of runny, like chocolate*
Phase 4 : Saveur-Goût - Arome/ Flavor-Taste-Aroma	Acide	*Acid*	Goût associé aux acides - semblable à l'acide citrique ou acétique *Taste associated with acids - similar to citric or acetic acid*
	Salé	*Salty*	Goût de sel *Taste of salt*
	Amer	*Bitter*	Sensation gustative générée par la caféine *Taste sensation generated by caffeine*
	Goût de chèvre	*Goaty taste*	Goût caractéristique de la chèvre *Characteristic taste of goat*

Annexe 4 : Questionnaire pour l'analyse sensorielle discriminative – Test triangulaire

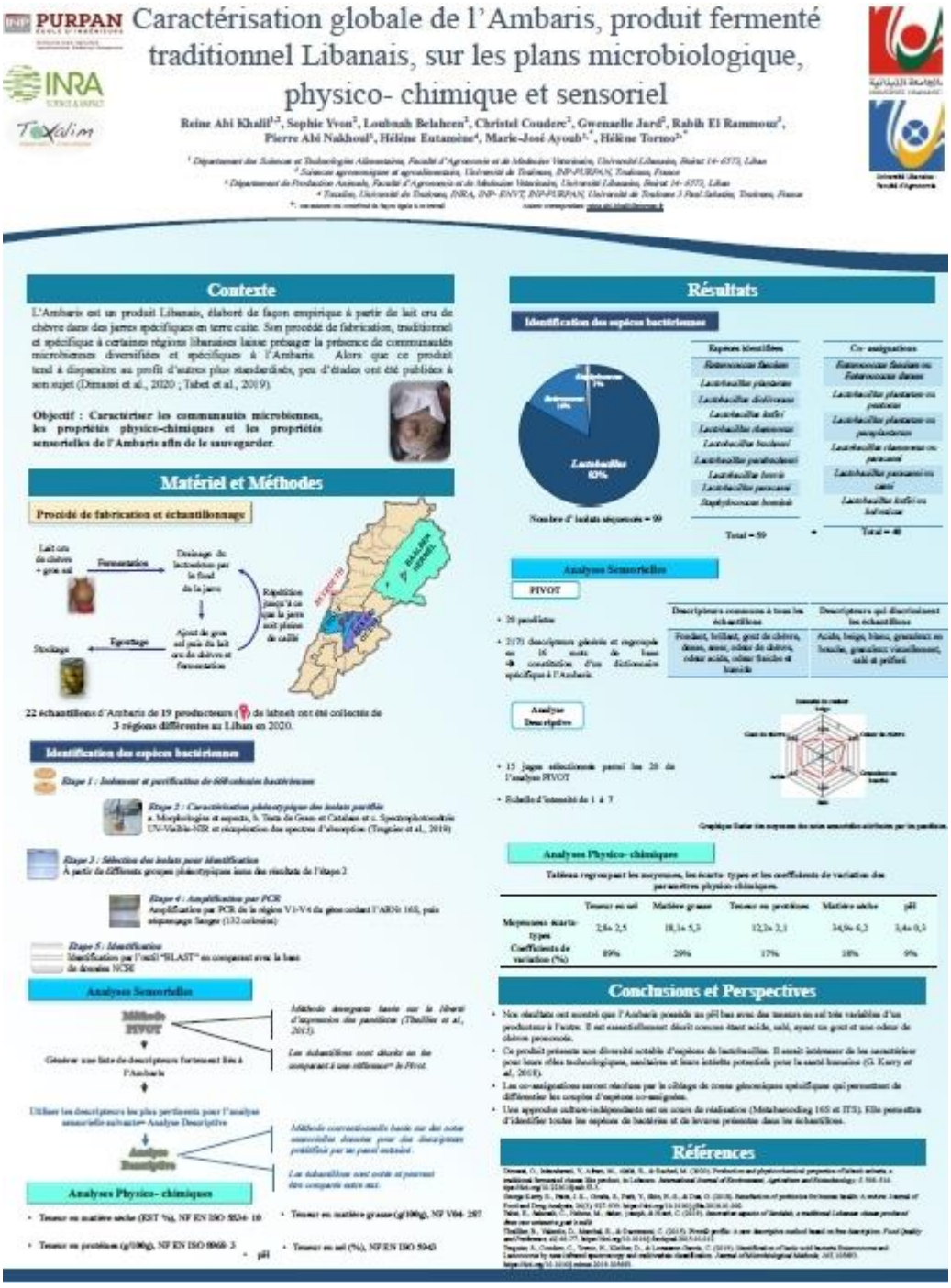
Nom: **Date:**

Trois échantillons sont présentés. Deux d'entre eux sont identiques, l'autre est différent. S'il vous plait de les évaluer dans l'ordre de présentation de gauche à droite et d'indiquer l'échantillon **UNIQUE.**

Ne pas oublier après avoir fini chaque échantillon de se rincer la bouche avec l'eau et manger le morceau de pain.



Annexe 5 : Poster présenté au 16ème congrès de la SFM 2021



Annexe 6 : Résumé des travaux présentés au 23ème CBL, 2022

(DOI:10.13140/RG.2.2.24973.82407)

S3.2. Identification of bacterial communities of labneh Ambaris, a traditional Lebanese raw goat's milk product

Reine ABI KHALIL[1,2], Sophie YVON[2], Christel COUDERC[2], Loubnah BELAHCEN[2], Gwenaelle JARD[2], Rabih EL RAMMOUZ[1], Pierre ABI NAKHOUL[1], Hélène EUTAMÈNE[2], Marie-José AYOUB[1,*] & Hélène TORMO[2,*].

[1] *Faculty of Agriculture & Veterinary Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon.*

[2] *INP El-Purpan, Toulouse, France.*

*: *these authors contributed equally to this work*

Labneh Ambaris is a traditional Lebanese dairy product made using raw goat's milk in special earthenware jars. Its production is characterized by the regular additions of raw milk and coarse salt, all while draining the whey throughout a process that lasts for a minimum of 2 months [1]. This study identifies the bacterial communities responsible for this product's fermentation and defines keystone species that characterize this authentic product. In this context, twenty labneh Ambaris samples were collected from different regions in Lebanon and their bacterial diversity analyzed using culture-dependent and independent methods. Microbial enumerations showed that the average levels of presumptive mesophilic lactobacilli were 7.6 log CFU/g and those of presumptive mesophilic lactococci were 6.8 log CFU/g.

More than 120 bacterial colonies were isolated from MRS and M17 lactose media and their 16S rDNA V1-V4 region sequenced. *Lactiplantibacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lentilactobacillus diolivorans* and *Lentilactobacillus kefiri* were the most detected species among samples using culturing methods, by which 10 species were identified. However, 30% of colonies could not be identified at the species level (co-assignation of several options in the actual databases). Therefore, special primers targeting species-specific regions of the *rpoB* gene were designed. In parallel, total samples' DNAs were analyzed by metabarcoding sequencing of the V3-V4 region of the 16S rDNA. A total of 160 different species were detected among samples. The results showed that *Lactobacillus* was the dominant genus, followed by *Lentilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* and *Lactococcus*. In accordance with the cultural approach, the 4 previously mentioned species were also found in most of the samples. However, *Lactobacillus kefiranofaciens* was only detected by metabarcoding sequencing, although this species was found in very high abundances among samples. *Lentilactobacillus* species could not be precisely identified (co-assignation of several species in the actual databases), but it is probable they mostly belong to the species *kefiri* that was largely found for this genus by cultural methods.

This work allowed us to identify a highly rich diversity of microbial communities in Labneh Ambaris, contributing to their preservation.

References

[1] Dimassi *et al.* (2020), DOI:10.22161/ijeab.53.3

Annexe 6 : Récapitulatif des formations faites durant la thèse

Catégorie : Développement personnel

1. Food waste management (24 novembre 2020 - 4 décembre 2020) Amira HADDARAH - Zoom classes : 20 heures enregistrées par SEVAB

2. Introduction à Python (26 avril 2021) Ziad EL BITAR, 12 heures enregistrées par SEVAB

3. Sustainable Land Management (28 septembre 2020) Amira HADDARAH 16 heures enregistrées par : SEVAB

Total du nombre d'heures pour la catégorie Développement personnel : *48 h*
Total du nombre de Crédits/Points pour la catégorie Développement personnel : *8*

Catégorie : Éthique et intégrité scientifique

1. Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche (08 mai 2020 - 22 mai 2020) Université de Bordeaux 15 heures enregistrées par : SEVAB

Total du nombre d'heures pour la catégorie Éthique et intégrité scientifique : *15 h*

Catégorie : International, Langues

1. Renforcer ses compétences orthographiques (01 octobre 2021 - 30 novembre 2021) Online course- Fun MOOC 15 heures enregistrées par : SEVAB

Total du nombre d'heures pour la catégorie International, Langues : *15 h*

Catégorie : Méthodologie de la thèse recherche documentaire et publication

1. Manuscript 101 (18 novembre 2021 - 18 novembre 2021) American Society of Nutrition - Zoom webinar 2 heures enregistrées par : SEVAB

2. Publier dans les revues scientifiques : enjeux et modalités pratiques à l'heure du numérique (27 mai 2021) Université Fédérale de Toulouse Midi-Pyrénées 3 heures enregistrées par : SEVAB

Total du nombre d'heures pour la catégorie Méthodologie de la thèse recherche documentaire et publication : *5 h*

Catégorie : Poursuite de carrière

1. AProDoc : la journée Emploi (15 mars 2022 - 15 mars 2022) Maison de la Recherche et de la Valorisation 7 heures enregistrées par : SEVAB

2. Comprendre l'écosystème de la R&D privée et le rôle du Jeune Docteur en entreprise - A distance (16 juin 2022) 2 heures enregistrées par : SEVAB

3. IP15 - Mentorat (12 novembre 2020) Centre de Biologie Intégrative, Centre de Biologie du Développement, Bât 4R3 porte B2- Salle Vandel, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse 30 heures enregistrées par : SEVAB

4. PhDOOC - MOOC Doctorat et Poursuite de Carrière / PhD and Career development (12 janvier 2022) Sur la plateforme PhDOOC 12 heures enregistrées par SEVAB

Total du nombre d'heures pour la catégorie *: 51 h*

Total participation: 134 heures / 11 modules

Total des Crédits/Points de Thèse : 8