PRODUCTION MASSIVE DE CELLULES DE STREPTOCOQUES LACTIQUES

I. — MÉTHODES GÉNÉRALES D'ÉTUDE ET FACTEURS DE LA CROISSANCE DE «STREPTOCOCCUS LACTIS» SOUCHE C10

par

J. -L. BERGÈRE

(Avec la collaboration technique de A. Lacourt)

*Station Centrale de Recherches laitières et de Technologie
des Produits animaux, C.N.R.Z., Jouy-en-Josas (Yvelines)*

A l'ensemencement naturel très aléatoire du lait et de la crème, on a substitué peu à peu un ensemencement contrôlé et on utilise maintenant couramment, en industrie laitière, des levains de bactéries lactiques préparés extemporanément à l'usine. Ce stade intermédiaire de préparation n'est cependant pas sans inconvénients (charge importante pour le personnel, risques accrus de contamination par les bactériophages et d'inhibition par diverses substances, etc.) C'est pour cette raison qu'un certain nombre d'auteurs dont Lamprech et Foster [8] préconisent l'utilisation de bactéries lactiques conservées à l'état congelé et ensemencées directement dans le lait de fabrication.

D'autre part, en technologie fromagère, on cherche à l'heure actuelle à réduire les prix de revient par la mécanisation et le raccourcissement des phases de la fabrication. Cependant dans bien des cas, on se heurte à la difficulté de réduire la durée de certaines opérations (maturation du lait, égouttage), difficulté qui pourrait être résolue par l'utilisation de suspensions concentrées de bactéries lactiques comme le préconisent Vassal et Mocquot [10].

Un programme de recherches sur la production massive et la conservation des bactéries lactiques a donc été entrepris dans le cadre de notre laboratoire [1].

Dans le présent travail, nous étudions les possibilités d'augmenter la concentration en cellules d'une culture de bactéries lactiques, la mise au point d'une technique de production effectuée avec une souche bien connue de *Str. lactis* C10 [2] et son extension à d'autres souches et d'autres espèces de streptocoques lactiques [3].

Nous exposerons dans cette première partie comment nous avons résolu les problèmes préliminaires posés par cette étude :

- détermination des caractéristiques de la croissance de *Str. lactis* C10 ;
- mesure de la croissance par la densité optique sur un large intervalle de concentration en cellules et de densité optique ;
- mesure de l'activité des cellules produites.

Matériel et méthodes

1° Microorganisme.

La souche C10 de *Streptococcus lactis* a été utilisée dans ce travail. Elle est conservée dans du lait autoclavé congelé à -30°C .

2° Milieux de culture.

Le milieu T₁P utilisé pour la croissance de *Str. lactis* C10 a la composition suivante : tryptone Difco, 20 g ; extrait de levure Difco, 7 g ; lactose, 45 g ; tampon phosphate, 0,1 M, à pH 7,0, 1 000 ml.

Le milieu de référence utilisé pour la détermination de l'activité est du lait reconstitué à partir d'un même lot de lait écrémé en poudre, à raison de 10 g de poudre pour 100 ml d'eau distillée. Ce lait est réparti en flacons stériles de 100 ml et chauffé à 80°C pendant 30 mn juste avant l'emploi.

3° Ensemencement et conditions de culture.

Pour tous les essais les milieux sont inoculés avec des cellules en phase de croissance exponentielle, préparées sur milieu T₁P. La quantité de cellules inoculée varie suivant les essais. Les cultures sont effectuées soit en flacons de 100 ml, soit en tubes de 18×180 sans précautions spéciales en ce qui concerne les conditions d'aération. La température d'incubation est indiquée dans les résultats.

Pour la détermination de l'activité d'une culture, l'échantillon est dilué jusqu'à une densité optique connue voisine de 1,00, puis inoculé à raison de 1 p. 100 dans un flacon de lait qui est incubé à 30°C .

4° Dénombrement des cellules viables.

Les cellules viables sont dénombrées sur milieu « Plate Count Agar » Difco en boîtes de Petri, après une incubation de 48 h à 30°C . Les dilutions sont préparées dans le milieu suivant (D) : peptone Evans, 1 g ; chlorure de sodium, 1 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 7,0.

5° Mesure de la densité optique.

Les densités optiques des suspensions de cellules sont déterminées à la longueur d'onde de 650 m μ , à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman B, en utilisant une cuve en verre de 1 cm de chemin optique.

6° Mesure du pH.

Le pH des cultures est mesuré à l'aide d'un pH-mètre EIL (type 23 AF 2) sauf dans le cas des tests d'activité où l'évolution du pH en fonction du temps d'incubation est enregistrée à l'aide d'un pHmètre Metrohm (titrateur E 361).

Résultats et discussion

1° Relation entre la densité optique et la concentration en cellules d'une suspension de cellules de « *Str. lactis* » C10.

On sait qu'en opacimétrie des milieux troubles [4], l'absorption de la lumière suit la loi de Beer-Lambert seulement pour les suspensions faiblement concentrées en particules ; pour les suspensions plus concentrées la relation entre la transmission de la lumière et la concentration est linéaire et non logarithmique. Cette relation est fonction de la taille des particules et de l'appareil utilisé pour les mesures.

Quand on désire effectuer des mesures d'opacimétrie, dans un large intervalle de densité optique, il est donc nécessaire d'établir au préalable la relation qui existe entre la densité optique et la concentration en cellules.

C'est ce que nous avons réalisé dans le cas de *Str. lactis* C10 en mesurant la densité optique de suspensions de cellules préparées par dilution de 1/2 en 1/2 dans le milieu D, d'une suspension concentrée de cellules obtenues après centrifugation d'une culture en milieu T₁P, de *Str. lactis* en fin de croissance exponentielle. Dans la figure 1, on a reporté les valeurs des densités optiques obtenues en fonction du logarithme de base 2 du nombre de dilutions effectuées.

Comme le montre cette figure, la densité optique des suspensions est rigoureusement proportionnelle au logarithme de la concentration en cellules de ces suspensions pour des valeurs de densité optique (D. O.) comprise entre 0,57 et 2,1. Dans cet intervalle, correspondant à la partie linéaire AB de la courbe, le doublement du nombre de cellules se traduit par une augmentation de 0,45 de la valeur D.O. Pour les valeurs inférieures à 0,57 (partie BC de la courbe) on constate que la D.O. des suspensions est propor-

tionnelle à leur concentration en bactéries, l'absorption de la lumière suivant alors la loi de Beer. Nos résultats sont donc parfaitement en accord avec les données exposées plus haut sur l'opacimétrie des milieux troubles.

Fig. 1. — Relation entre la densité optique et le logarithme de la concentration en cellules d'une suspension de *Str. lactis* C10 (courbe ABC, densité optique D ; courbe BD, $1,5 \log D + 0,87$)

Pour la détermination de la croissance d'une culture par la mesure de la D.O., nous avons décidé de limiter la zone de mesure à l'intervalle 0,6-1,1 de l'échelle des D.O., la précision étant d'autant meilleure que la valeur est plus basse.

a) Quand la valeur de la D.O. de la culture est supérieure à 1,1, on procède à des dilutions de 1/2 en 1/2 jusqu'à ce qu'on ait obtenu une valeur d de la D.O. comprise dans cet intervalle 0,6-1,1. Si n est le nombre de dilutions effectuées, la valeur D de la D.O. de la culture est calculée d'après la relation $D = d + (n \times 0,45)$.

b) Pour les valeurs de la D.O. inférieures à 0,57, on peut utiliser une expression logarithmique D_1 de la densité optique pour retrouver une relation linéaire en fonction du logarithme de la concentration en cellules. En portant sur l'axe des ordonnées les valeurs de $D_1 = 1,5 \log D + 0,87$, on obtient une droite BD dans le prolongement de la droite AB (fig. 1).

Par cet artifice, on dispose donc d'une relation linéaire permettant de calculer la concentration en cellules d'une suspension de *Str. lactis* C10, dont la densité optique est comprise entre 0 et 2, ce qui n'est pas possible si on utilise la méthode préconisée par Kurokawa et al. [7].

2° Expression et mesure de l'activité d'une culture de « *Str. lactis* » C10.

Dans la pratique, en industrie laitière, on caractérise un levain lactique par son « activité », c'est-à-dire son aptitude à produire de plus ou moins grandes quantités d'acide lactique dans un intervalle de temps donné. L'activité d'un levain dépend d'un grand nombre de facteurs : nombre de cellules, état de ces cellules (âge ou traitement subi antérieurement) et enfin vitesse de croissance, puisque la production d'acide est liée à la croissance. Dans ce qui suit, nous nous sommes attachés à formuler une expression quantitative de l'activité quand les seuls facteurs susceptibles de varier sont liés à l'état des cellules, donc quand le nombre initial de cellules, la température et le milieu de croissance ne varient pas.

a) Relation entre l'évolution du pH d'une culture et le nombre initial de cellules.

On sait que le pH d'une culture de streptocoques lactiques dans du lait diminue en fonction du temps d'incubation après une « période de latence » pendant laquelle la valeur du pH ne change pas de façon mesurable. La figure 2a montre l'évolution du pH en fonction du temps d'incubation d'une culture de *Str. lactis* C10 dans du lait. La courbe ainsi obtenue présente une partie intermédiaire linéaire. Quand on fait varier la quantité de cellules inoculées on constate que la pente de la partie linéaire n'est pas modifiée, mais qu'en revanche, la durée de la « phase de latence » s'accroît quand le nombre de cellules de l'inoculum diminue. Les paramètres qui caractérisent le déplacement de la courbe du pH en fonction du nombre initial de cellules peuvent donc servir à déterminer ce dernier de façon indirecte. Parmi ces paramètres, la durée de la phase de latence n'est pas utilisable car cette longueur ne peut être mesurée avec précision. Par contre, un autre paramètre, le temps nécessaire pour atteindre une valeur donnée du pH peut être facilement obtenu sur la courbe d'enregistrement du pH dans sa partie linéaire. Or, comme on peut le constater sur la

figure 2b, il existe une relation linéaire entre le temps au bout duquel le pH atteint la valeur de 5,5 et le logarithme de la concentration en cellules dans le lait au temps zéro de l'incubation. La valeur de ce temps à la température de 30° C augmente de 55 mn quand le nombre initial de cellules est diminué de moitié.

a) Evolution du pH en fonction du nombre de cellules de l'inoculum

b) Relation entre le temps pour atteindre pH 5,5 et le nombre de cellules de l'inoculum

c) Evolution du pH en fonction de l'activité de l'inoculum. (S_0 cellules en phase exponentielle, S_1 cellules en phase stationnaire de croissance)

d) Activité relative des cellules d'une suspension S_1 en pourcentage de l'activité A_0 des cellules d'une suspension de référence S_0

Fig. 2. — Evolution du pH d'une culture sur lait et expression de l'activité d'une suspension de cellules de *Str. lactis* C10

b) *Expression de l'activité d'une culture.*

Supposons maintenant que le nombre de cellules de l'inoculum restant constant, on utilise pour celui-ci des cellules récoltées à un moment différent ou qui ont été conservées un certain temps à basse température après leur récolte. On constate alors que, suivant les cas, la courbe d'évolution du pH présente une période de latence plus longue ou plus courte sans que soit modifiée la pente de la partie linéaire (fig. 2c). Le paramètre défini précédemment (le temps nécessaire pour que le pH atteigne une valeur de 5,5) pour mesurer le nombre de cellules de l'inoculum, peut donc servir également pour mesurer « l'activité » de l'inoculum, lorsque ce dernier contient un nombre de cellules donné. Par analogie on dira que l'activité des cellules a diminué de moitié quand le temps nécessaire pour atteindre un pH de 5,5 a augmenté de 55 mn. Cette expression peut être généralisée de la manière suivante : si t_0 et t_1 sont les valeurs des temps nécessaires pour atteindre un pH de 5,5 quand le lait est inoculé avec deux suspensions S_0 et S_1 contenant la même concentration en cellules, l'activité A_1 de la suspension S_1 sera calculée en p. 100 de l'activité A_0 de la suspension S_0 par l'intermédiaire de la relation :

$$\log A_1 = - \frac{0,301}{55} (t_1 - t_0) + 2$$

ou déterminé graphiquement comme le montre la figure 2d.

3° **Influence de différents facteurs sur la croissance de « Str. lactis » C10.**

Dans ce qui suit, nous avons étudié l'influence d'un certain nombre de facteurs sur la vitesse de croissance de *Str. lactis* C10 et sur sa croissance maximale, c'est-à-dire la concentration finale en cellules en fin de croissance, après 24 h d'incubation.

a) *Influence de la température.*

Les résultats du tableau I montrent que le taux de croissance (nombre de divisions par heure) est maximal à la température de

TABLEAU I

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
(Milieu T₁P à pH 7,0)

Température d'incubation	20° C	25° C	30° C	35° C	37° C
Taux de croissance	0,50	1,00	1,70	2,07	2,00
Densité optique à 24 heures	1,43	1,60	1,55	1,50	1,48

35° C, mais que la densité optique la plus élevée en fin de culture est obtenue à la température de 25° C. Ces résultats sont en accord avec ceux de Foter et Rahn [5] qui ont observé que la croissance maximale des streptocoques lactiques est obtenue à une température comprise à l'intérieur de l'intervalle de 10° C au-dessous de la température optimale.

b) *Influence du pH.*

L'évolution de la croissance de *Str. lactis* C10 a été déterminée en fonction du pH initial du milieu de culture. Après 3 h d'incubation, le maximum de croissance est obtenu dans le milieu à pH 6,5. Dans ces conditions d'incubation, le pH du milieu ne change pas, quelle que soit la valeur du pH initial ; on peut donc en conclure que le pH optimal de croissance de *Str. lactis* C10 est de 6,5 (tableau II). Par contre, la croissance maximale est indépendante du pH initial quand celui-ci est compris entre 7,0 et 7,8. Pour les valeurs du pH initial inférieures à 7,0, le nombre maximal de cellules est d'autant plus faible que la valeur du pH initial est plus basse ; à pH 4,5 la croissance est nulle. D'autre part, le pH final de toutes les cultures est compris entre 4,5 et 4,6.

TABLEAU II

INFLUENCE DU pH DU MILIEU SUR LA CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
(Milieu T₁P, de pH 5,7 à 8,7 : P = tampon phosphate 0,1 M
et de pH 4,8 à 5,7 : P = tampon citrate-phosphate 0,05 M.
La variation de pH après 3 h d'incubation à 25° C est inférieure à 0,2)

pH	Densité optique		
	3 h	6 h	24 h
4,5	0,010	0,010	0,008
4,8	0,010	0,050	0,090
5,2	0,120	0,250	0,290
5,7	0,450	0,620	0,650
6,1	0,610	0,890	0,950
6,5	0,630	1,190	1,300
7,0	0,540	1,170	1,420
7,4	0,420	0,980	1,450
7,8	0,110	0,490	1,420

Ces résultats montrent, comme l'avait déjà observé Harvey [6], que l'abaissement du pH au-dessous de 5,0 résultant de l'accumulation de l'acide lactique est bien un facteur limitant la croissance de *Str. lactis*.

c) *Influence de la concentration du milieu.*

Afin d'éviter que, dans les essais ultérieurs, le facteur limitant la croissance soit l'épuisement d'un des constituants du milieu, nous avons essayé de déterminer une relation entre la concentration de ces éléments et la croissance. D'après les résultats du tableau III, on peut observer qu'une augmentation de la concentration de la tryptone et de l'extrait de levure du quart à la moitié de celle du milieu T₁P permet de faire passer la D.O. finale de la culture de 1,00 à 1,45, c'est-à-dire permet d'obtenir deux fois plus de cellules. Cela montre bien que dans le milieu T₁P la croissance n'est pas limitée par l'épuisement de ces composants et permet de supposer qu'une augmentation de leur concentration devrait permettre d'augmenter le nombre de cellules obtenu si aucun autre facteur ne limitait la croissance.

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DE LA TRYPTONE
ET DE L'EXTRAIT DE LEVURE SUR LA CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
(Milieu T₁P, pour x : tryptone à 10 g/l et extrait de levure à 3,5 g/l ;
pH 7,0 ; température d'incubation 25° C)

Concentration de la tryptone et de l'extrait de levure	x	$1/2 x$	$1/4 x$
Densité optique à 24 h	1,45	1,45	1,00

La concentration de lactose nécessaire pour une croissance donnée, peut être déterminée directement par dosage de ce sucre ou indirectement par mesure de l'acide lactique produit.

d) *Influence de l'aération.*

Contrairement à ce qui se produit dans le lait [9], les conditions d'aération, culture statique, culture agitée sous atmosphère d'azote ou en présence d'air n'ont d'influence ni sur la vitesse ni sur le maximum de croissance de *Str. lactis* C10 dans le milieu T₁P (tableau IV). Les faibles différences observées entre les trois types de culture sont vraisemblablement dues à l'agitation qui permet une meilleure répartition des cellules bactériennes. Ces résultats confirment ceux obtenus par Lamprech et al. [8], avec *Str. lactis* C2.

Nous tenons à remercier MM. Mocquot, Auclair, Accolas et plus particulièrement M. Hermier, de leurs suggestions et critiques au cours de ce travail et de la rédaction du manuscrit.

Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique (Contrat n° 65-FR-169).

TABLEAU IV

INFLUENCE DE L'AGITATION ET DE L'AÉRATION SUR LA CROISSANCE
DE « STR. LACTIS » C10
(Milieu T₁P ; pH 7,0 ; température d'incubation 25° C)

Condition de culture	Densité optique			
	1 h	3 h	5 h	24 h
Culture statique en tube ...	0,06	0,16	0,58	1,50
Culture agitée sous atmosphère d'azote	0,06	0,17	0,66	1,59
Culture en couche mince agitée en présence d'air .	0,06	0,18	0,73	1,62

Résumé

Les conditions optimales de la croissance de *Str. lactis* C10 ont été déterminées dans un milieu à base de tryptone, d'extrait de levure et de lactose. L'aération n'a pas d'influence sur la croissance et le pH optimal est de 6,5. Bien que la température optimale soit voisine de 35° C, la croissance est plus élevée à la température de 25° C, mais reste limitée par l'abaissement de pH dû à la production d'acide lactique.

Cette étude préliminaire concerne également :

— la mesure de la croissance par opacimétrie sur un large intervalle de concentration en cellules et de densité optique ;

— l'expression et la détermination de l'activité d'une suspension de cellules par une méthode basée sur l'abaissement de pH d'une culture sur lait.

Summary

Optimal conditions for growth of *Str. lactis* C10 have been studied in a medium containing tryptone, yeast-extract and lactose. Aeration of culture had no effect on growth. Although optimal temperature of growth was 35° C, cell concentration was greater at 25° C ; optimal growth was at pH 6,5 but growth was limited by a lowering of pH due to the production of lactic acid.

Two other problems have been studied in this preliminary study :

— measuring growth by opacimetry on a wide range of cell concentration and optical density ;

— expressing and determining the activity of a cell suspension by using the pH curve during growth in skim milk.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ACCOLAS (J.-P.) et AUCLAIR (J.). Conservation à l'état congelé de suspensions de bactéries lactiques concentrées sous faible volume. I. Bactéries lactiques mésophiles. *Le Lait*, 1967, **47**, 253-260.
- [2] BERGÈRE (J.-L.). Production massive de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* en milieu à pH constant. *Le Lait*, 1968, **48**, 13 (2^e article).
- [3] BERGÈRE (J.-L.). Production massive de streptocoques lactiques. III. Production de différentes souches en culture à pH constant. *Le Lait*, 1967 (*sous presse*).
- [4] DOGNON (A.). Dans LOISELEUR (J.), *Techniques de laboratoire*, 1963, t. I, fasc. 1, 217. Paris, Masson et Cie.
- [5] FOTER (M. J.) and RAHN (O.). Growth and fermentation of bacteria near their minimum temperature. *J. Bact.*, 1936, **32**, 485-497.
- [6] HARVEY (R. J.). Damage to *Streptococcus lactis* resulting from growth at low pH. *J. Bact.*, 1965, **90**, 1330-1336.
- [7] KUROKAWA (M.), HANATO (M.), KASHIWAGI (N.), DAITO (T.), ISHIDA (S.) and HOMMA (R.). *J. Bact.*, 1962, **83**, 14-19.
- [8] LAMPRECH (E. D.) and FOSTER (E. M.). The survival of starter organisms in concentrated suspensions. *J. appl. Bact.*, 1963, **26**, 359-369.
- [9] REITER (B.), PICKERING (A.) and ORAM (J. D.). Dans MOLIN (N.). *Microbial Inhibitors in Foods*, 1964, Stockholm, Almqvist and Wiksell.
- [10] VASSAL (L.) et MOCQUOT (G.). Fermentation lactique accélérée en fromagerie grâce à l'emploi d'un nombre élevé de bactéries. *La Technique laitière*, 1967, **541**, 9-13.