LA PRODUCTION MASSIVE DE CELLULES DE STREPTOCOQUES LACTIQUES

II. — CROISSANCE DE «STREPTOCOCCUS LACTIS» DANS UN MILIEU A pH CONSTANT

par

J.-L. BERGÈRE et J. HERMIER

(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)*

La préparation de quantités importantes de corps microbiens constitue fréquemment le prélude à l'étude des propriétés d'un constituant de la cellule. Le plus souvent, le microorganisme est cultivé en milieu liquide et dans des conditions qui favorisent la concentration la plus élevée possible de cellules en fin de culture. En effet, tout gain dans cette concentration se traduira par une réduction des moyens mis en œuvre pour la culture, et la séparation des cellules du milieu de culture.

La nécessité de préparer de grandes quantités de cellules se retrouve également dans les applications pratiques, en particulier dans les industries de fermentation. En effet, la culture dans le fermenteur principal est précédée obligatoirement d'une ou deux cultures dans des fermenteurs de moindre volume pour obtenir le nombre de cellules nécessaires à l'inoculation du fermenteur principal. Cette préparation doit être répétée pour chaque cycle de fermentation ; de plus elle comporte un certain nombre de risques tels que la contamination par un autre microorganisme ou par un bactériophage. Une solution idéale serait de disposer d'un lot de cellules conservées de telle façon qu'elles restent viables et gardent leur aptitude à fermenter ; ce lot devrait être suffisamment important pour permettre d'inoculer les fermenteurs principaux pendant une période d'au moins quelques semaines. A la sécurité apportée par ce procédé, s'ajouterait une régularité accrue de la fermentation, puisque les variations consécutives à celles des propriétés de l'inoculum seraient éliminées. Mais il est évident que la préparation d'un tel lot de cellules ne peut être raisonnablement envisagée que si l'on dispose de méthodes de culture conduisant à des concentrations finales en cellules très élevées.

Un cas particulier des industries de fermentation est celui de l'industrie fromagère. En effet, la première étape dans la fabrication du fromage consiste à produire de l'acide lactique dans le lait par culture de bactéries appartenant au genre *Streptococcus* et parfois *Lactobacillus*. Là aussi, il est nécessaire de préparer l'inoculum par une première culture dans le lait. C'est pourquoi on a songé [8] à préparer des suspensions concentrées de cellules de ces bactéries, congelées et directement utilisables comme inoculum.

Mais on ne dispose pas actuellement de méthode satisfaisante pour préparer des cultures concentrées de *Str. lactis*. La méthode de culture en milieu dialysé, pourtant d'application très générale, n'est pas applicable à *Str. lactis* [3]. La croissance de *Str. lactis* est limitée par l'abaissement du pH et aussi par l'acide lactique lui-même produit au cours de la fermentation, bien que ce point soit contesté [6]. Il est possible d'empêcher l'abaissement du pH par addition de tampons ou par addition de soude. Les limites de la première solution tiennent à l'effet inhibiteur des tampons aux concentrations nécessaires pour limiter la variation du pH [8]. Quant à la deuxième, elle n'a pas été étudiée systématiquement, bien que l'on possède des indications favorables [7], [8].

C'est pourquoi nous avons entrepris une étude systématique de la croissance de *Str. lactis* dans un milieu de culture dont le pH est maintenu constant par addition de tampon ou de soude. Nous avons d'autre part réexaminé les résultats de la technique de culture en milieu dialysé pour tenter de trouver les raisons de son échec. Éliminant ainsi la variation du pH comme facteur inhibiteur de la croissance, nous avons pu déterminer l'action inhibitrice de l'acide lactique.

Matériel et méthodes

1° Microorganisme.

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

2° Conditions de culture.

La croissance de *Str. lactis* a été étudiée dans deux milieux de culture T₁ et T₂, le milieu T₂ ayant tous ses constituants à une concentration double de celle des constituants du milieu T₁. Le milieu T₁ a la composition suivante : tryptone Difco, 20 g ; extrait de levure Difco, 7 g ; lactose, 45 g. Au cours de l'incubation qui est effectuée à 25° C, les milieux de culture sont constamment agités à l'aide d'un agitateur magnétique.

Dans le cas des cultures à pH constant, le pH est maintenu à la même valeur par addition automatique d'une solution stérile de soude 5 N grâce à un titrateur Metrohm E 361.

Les cultures en milieu dialysé sont effectuées dans un appareil du type «reservoir-dialysis system» décrit par Gallup et Gerhardt [2] auquel est adjoint le dispositif de neutralisation décrit ci-dessus quand la culture est effectuée à pH constant. Le schéma de montage de ces appareils est donné dans la figure 1. La croissance de *Str. lactis* s'effectue dans le fermenteur A dont le milieu de culture est envoyé par une pompe dans un tuyau en cellulose de 6,38 mm de diamètre («regenerated cellulose, regular grade», Visking Co), avec un débit de 720 ml par heure. A travers cette membrane semi-perméable, dont la surface est de 200 cm², s'effectuent les échanges entre le milieu de culture du fermenteur et le milieu non ensemencé contenu dans le dialyseur. La composition du milieu dans le fermenteur et dans le dialyseur est la même au départ de la culture.

Fig. 1. — Schéma du dispositif de culture en dialyse à pH constant

- A Fermenteur avec système d'agitation (M, agitateur magnétique; m, barreau magnétique); e, électrode de mesure du pH ; s, entrée de soude; sortie de la culture vers le dialyseur et retour. Volume de la culture, 300 ml.
- B Dialyseur avec tube de dialyse, d, immergé dans le milieu et M, système d'agitation. Volume du milieu de dialyse, 3 000 ml.
- C Appareil enregistreur et régulateur de pH (Metrohm E 361).
- P Pompe (Sigmamotor).
- VM Vanne électromagnétique commandée par C.
- R Réservoir de soude gradué.

3° Mesures et dosages.

La croissance bactérienne est mesurée par la densité optique de la suspension à la longueur d'onde de 650 $m\mu$ à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman B, en utilisant une cuve en verre de 1 cm de chemin optique. Quand la valeur de la densité optique 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 densité optique comprise

dans l'intervalle 0,6-1,1. Si n est le nombre de dilutions effectuées, la valeur D de la densité optique de la culture est calculée d'après la relation $D = d + (n \times 0,45)$ [1].

Le nombre de cellules viables est obtenu après ensemencement dans le milieu « Plate Count Agar » Difco en boîtes de Petri et incubation à 30° C pendant 48 heures. Les dilutions sont préparées dans la solution suivante : peptone Evans, 1 g ; chlorure de sodium, 1 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH, 7,0.

Le nombre total de cellules est déterminé au microscope à contraste de phase à l'aide d'une cellule de Petroff-Hausser. Le poids sec en cellules est obtenu après centrifugation d'un volume connu de la culture, lavage du culot avec de l'eau distillée et nouvelle centrifugation, puis dessiccation jusqu'à poids constant à 105° C.

L'activité fermentaire des cellules désignée usuellement par le terme « activité » est déterminée par la production d'acide lactique au cours de la croissance dans du lait, suivant la méthode décrite par Bergère [1]. Le lait utilisé est 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 de 100 ml et chauffé à 80° C pendant 30 mn juste avant l'emploi. L'échantillon de la culture 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. L'évolution du pH en fonction du temps d'incubation est enregistré à l'aide du titrateur Metrohm E 361. Le pouvoir fermentaire sera caractérisé par le temps d'incubation t au bout duquel le pH du lait aura atteint la valeur 5,5 [1]. Dans les résultats, le pouvoir fermentaire est exprimé en fonction de celui des cellules récoltées pendant la phase exponentielle de croissance dans les milieux T_1 ou T_2 , par l'intermédiaire de la relation [1] :

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

où t_0 est la valeur de t obtenue pour les cellules récoltées en phase exponentielle.

La quantité d'acide lactique est soit calculée à partir de la quantité de soude ajoutée au cours de la culture (culture à pH maintenu constant), soit dosée par la méthode colorimétrique de Ling modifiée par Harper et Randolph [4]. Le lactose est dosé colorimétriquement avec l'orcinol par la méthode de Tillmans et Philipps modifiée par Remington [11].

4° Correction des mesures.

Les mesures de la croissance bactérienne et de la production d'acide lactique dans les cultures à pH constant sont corrigées

suivant la méthode de Longsworth et McInnes [9] pour tenir compte des variations de volume consécutives au prélèvement des échantillons et à l'addition de la solution de soude.

Résultats et discussion

1° Croissance de «*Str. lactis*» en milieu tamponné.

En fin de culture dans le milieu T_1 , la concentration en cellules de *Str. lactis* C10 est d'environ $1,5 \cdot 10^9$ cellules par ml. Comme le montre le tableau I, l'addition au milieu de culture d'un tampon phosphate à pH 7, à une concentration inférieure à 0,1 M, entraîne une augmentation de la concentration finale en cellules sans que soit modifié le taux de croissance. Cette augmentation est d'autant plus forte que la concentration en tampon est plus élevée. Cependant le taux de croissance ainsi que le nombre final de cellules diminuent quand la concentration en phosphate est supérieure à 0,1 M (tableau I). Lamprech et Foster [8] ont déjà constaté que la croissance de la souche C2 de *Str. lactis* était inhibée par les concentrations en tampon phosphate suffisamment élevées pour que le pH soit maintenu en-dessous de 5,0.

TABLEAU I

INFLUENCE DE LA MOLARITÉ DU TAMPON PHOSPHATE
SUR LA CROISSANCE DE «*STR. LACTIS*» C10
(Milieu T_1 ; pH 7,0; température d'incubation 25° C)

Molarité du tampon phosphate	0,15 M	0,10 M	0,067 M	0,04 M	0,02 M	0
Taux de croissance	0,60	0,95	1,00	1,05	1,05	1,00
Nombre total de cellules p. ml $\times 10^9$ à 24 h ..	2,90	3,80	3,40	2,20	1,70	1,40
pH à 24 h	4,60	4,50	4,40	4,35	4,30	4,25

Des mélanges citrate-phosphate dont le pouvoir tampon est plus élevé dans la zone des pH 5,0 à 6,0 ont été essayés, mais ils se sont révélés plus inhibiteurs que le phosphate aux concentrations élevées.

Lamprech et Foster [8] ont montré que le remplacement du tampon phosphate par un phosphate partiellement soluble comme le phosphate trimagnésien à 2 p. 100, permettait de supprimer l'effet inhibiteur aux fortes concentrations et donc d'augmenter

la concentration finale de cellules de *Str. lactis* C2. Comme on peut le voir dans le tableau II, la souche C10 se comporte à ce point de vue comme la souche C2. On constate de plus que si la concentration en phosphate de magnésium est doublée, le nombre total de cellules augmente, mais à la condition d'utiliser un milieu suffisamment riche et de prolonger la durée d'incubation. La croissance se poursuit alors lentement pour aboutir à une concentration finale en cellules de 17 à 20 · 10⁹ par ml soit 4 à 5 fois la concentration obtenue en présence de phosphate de potassium 0,1 M. Le carbonate de calcium, dont l'emploi a été suggéré par Lamprech et Foster [8], donne sensiblement les mêmes résultats que le phosphate de magnésium.

TABLEAU II

CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
EN PRÉSENCE D'UN TAMPON PARTIELLEMENT SOLUBLE

Milieu et tampon	Durée d'incubation à 25° C			
	24 h		48 h	
	Nombre total de cellules p. ml × 10 ⁹	pH	Nombre total de cellules p. ml × 10 ⁹	pH
T ₁ (PO ₄) ₂ Mg ₃ , 2 p. 100 .	9,70	4,70	13,50	4,60
T ₁ (PO ₄) ₂ Mg ₃ , 4 p. 100 .	4,25	5,20*	12,70	4,90*
T ₂ (PO ₄) ₂ Mg ₃ , 4 p. 100 .	9,50	4,90*	20,00	4,80*

* Tampon incomplètement solubilisé.

L'emploi du phosphate de magnésium présente cependant certains inconvénients, comme l'avaient remarqué Lamprech et Foster [8] ; avec la concentration de 2 p. 100, le temps d'incubation doit être suffisamment long pour qu'il soit complètement solubilisé par l'acide lactique. Quand il est utilisé à 4 p. 100, il n'est jamais complètement insolubilisé et la partie insoluble est récoltée avec les cellules au moment de la centrifugation. D'autre part, dans les conditions de croissance maximale, la quantité d'acide lactique devient telle que la concentration en lactate de magnésium formé peut atteindre la limite de solubilité de ce sel.

2° Croissance de «*Str. lactis*» en milieu à pH constant.

Les résultats présentés dans la figure 2 montrent comment évoluent la croissance, la production d'acide lactique, la consommation en lactose, le nombre de cellules viables et leur pouvoir fermentaire quand le pH du milieu est maintenu, par addition de soude, à la valeur de 6,5, pH optimum de croissance de *Str. lactis*

Fig. 2. — Evolution de la croissance de *Str. lactis* C10 en culture à pH constant. (Milieu T₂, température d'incubation 25° C, pH 6,5. Témoin non neutralisé, mêmes conditions de culture mais milieu additionné de tampon phosphate 0,1 M)

C10 [1]. Par rapport à la courbe de croissance en milieu tamponné avec du phosphate de potassium 0,1 M, la courbe de croissance dans le milieu à pH constant montre un allongement, d'une part de la phase de croissance exponentielle qui est prolongée d'environ 1 h et demie et d'autre part, de la phase de ralentissement qui se poursuit pendant plus de 4 h. La concentration finale en cellules est de 4 à 5 fois plus grande que celle obtenue en milieu tamponné et représente un poids sec de cellules de 8,25 g par l de culture.

Une culture en fin de croissance montre à l'observation microscopique de petits amas de cellules ; la formation de ces amas pourrait expliquer que le nombre maximum de cellules viables soit obtenu avant l'arrêt total de la croissance mesurée par la densité optique de la culture (fig. 2). Les cellules conservent pratiquement jusqu'à l'arrêt de la croissance un pouvoir fermentaire aussi grand que pendant la phase de croissance exponentielle. Il diminue ensuite progressivement et n'est plus que de 40 p. 100 après 24 h d'incubation ; cette diminution est très probablement la conséquence de la diminution de la viabilité des cellules qui est de l'ordre de 50 p. 100.

La quantité d'acide lactique produit croît en fonction du temps de culture de façon exponentielle puis présente un ralentissement en même temps que la croissance, mais elle continue à augmenter bien après l'arrêt de celle-ci. La relation entre la production d'acide lactique et la croissance à pH constant a été établie par Luedeking et Piret [11] pour *Lactobacillus delbrueckii* (fig. 3). Elle est de la forme :

$$\frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{N} = \alpha \frac{dN}{dt} \cdot \frac{1}{N} + \beta \quad (1)$$

où P est le poids d'acide lactique produit en g par l, N est l'antilogarithme de la densité optique et α , β sont des constantes. Cette relation se vérifie pour *Str. lactis* C10 (fig. 3) : à 25° C et à pH 6,5 on a $\alpha = 0,142$, $\beta = 0,022$. La valeur du rapport α/β est voisine de 7 et elle est du même ordre de grandeur que pour *L. delbrueckii*.

La limitation de la croissance dans la culture à pH 6,5 ne peut être attribuée à l'épuisement du milieu en l'un de ses constituants. En effet, la quantité de lactose disponible est encore de 25 g par l (voir fig. 2) au moment de l'arrêt de la croissance. D'autre part, si on se base sur les résultats obtenus précédemment [1] la tryptone et l'extrait de levure sont très probablement en excès pour une croissance correspondant à 2,45 unités de densité optique. D'ailleurs, nous avons pu constater qu'une augmentation de la concentration du milieu ou le maintien de la concentration en lactose à un taux de 80 g par l, ne modifiait pas la croissance totale.

On peut donc penser que la croissance est limitée par la présence de concentrations élevées de lactate [10], [13]. Pour démontrer ceci,

Fig. 3. — Relation entre la production d'acide lactique et la croissance de *Str. lactis* C10

on a suivi la croissance de cellules prélevées en phase de croissance exponentielle et ensemencées dans le milieu T_2 après addition de quantités progressivement croissantes de lactate de sodium et sans que le pH soit maintenu constant par addition de soude. Le tableau III montre que le taux de croissance diminue quand augmente la concentration initiale en lactate, cette diminution étant plus rapide pour les concentrations supérieures à 0,2 M (soit 18 g d'acide lactique par l). Le taux de croissance est nul quand la

TABLEAU III

INFLUENCE DE L'ADDITION DE LACTATE DE SODIUM AU MILIEU DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10

(Milieu T_2 + tampon phosphate 0,05 M; pH 6,5; température d'incubation 25° C. Après inoculation avec des cellules en phase de croissance exponentielle la D.O. était de 0,120)

	Concentration molaire du lactate de sodium							
	0	0,04 M	0,10 M	0,16 M	0,20 M	0,33 M	0,50 M	0,66 M
Taux de croissance	1,00	0,95	0,75	0,67	0,60	0,10	0,02	0,00
D.O. à 24 h	1,48	1,42	1,34	1,28	1,18	0,95	0,14	0,115
pH à 24 h	4,70	4,85	4,95	5,00	5,10	5,60	6,45	6,50

concentration est 0,66 M (soit 60 g d'acide lactique par l). Par ailleurs, la croissance s'arrête d'autant plus tôt que la concentration en lactate est plus élevée, comme le montre les valeurs finales de la densité optique et du pH de la culture. Nos résultats sur l'inhibition de la croissance totale par le lactate de sodium sont en parfait accord avec ceux obtenus précédemment par Hirsch, dans des conditions similaires, chez une souche de *Str. lactis* productrice de nisine [6]. Toutefois, il faut remarquer d'après le travail de cet auteur, que le lactate apporté en cours de croissance ne produisait pas un effet si marqué.

Or, si on se reporte à la figure 2, on remarque que la croissance dans un milieu à pH constant ne contenant pas d'acide lactique au départ de la culture, cesse d'être exponentielle quand la concentration en acide lactique produit est d'environ 20 g par l et qu'elle cesse totalement quand elle atteint la valeur de 60 g par l. On peut donc estimer que dans le cas de la culture à pH constant, le facteur limitant la croissance de *Str. lactis* C10 est l'acide lactique produit au cours de la croissance.

On peut donc espérer augmenter la croissance totale, soit en éliminant l'acide lactique comme nous le verrons plus loin dans l'étude de la culture en milieu dialysé, soit en ralentissant la production d'acide lactique. Ce dernier résultat pourrait être obtenu par une diminution du coefficient α de la relation [1] entre la production d'acide lactique et la croissance. Puisque Luedeking et Pohet [11] ont montré que, dans le cas de *Lactobacillus delbrueckii*, α diminuait avec la valeur du pH auquel était maintenu le milieu de culture, nous avons fait varier cette valeur.

Comme le montre le tableau IV, le taux de croissance est maximal quand le pH du milieu est maintenu à 6,5 ; cela confirme que le pH optimal de croissance de *Str. lactis* C10 est de 6,5 [1]. Quand le pH est supérieur à 6,5, la concentration en cellules et la quantité d'acide lactique formée en fin de croissance sont sensiblement les mêmes qu'à pH 6,5. Par contre, pour les pH inférieurs à 6,5, la quantité d'acide lactique produit diminue, mais la concentration finale en cellules et le taux de croissance diminuent également. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec *L. delbrueckii* dont le taux de croissance et la croissance finale diminuent quand la valeur du pH auquel est maintenu le milieu est inférieur à 5,4, pH optimum de croissance. On a constaté en outre que le ralentissement de la croissance se produit plus tôt et pour une concentration en acide lactique plus basse qu'à pH 6,5 et que ce ralentissement est d'autant plus marqué que le pH est plus bas. Ces résultats peuvent s'interpréter, soit comme une augmentation de la sensibilité de *Str. lactis* à l'acide lactique, quand le pH de la culture est inférieur à 6,5, soit à un effet inhibiteur dû au pH lui-même. Toutefois, si un dommage aux cellules, se tra-

duisant par une diminution de l'activité enzymatique, a pu être imputé au pH, cet effet ne se manifeste qu'aux valeurs du pH inférieures à 5,5 [5].

TABLEAU IV
INFLUENCE DU pH SUR LA CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
EN CULTURE A pH CONSTANT
(Milieu T₂ ; température d'incubation 25° C)

Caractéristiques de la croissance		pH de la culture				
		5,50	5,90	6,50	7,00	7,40
Phase exponen- tielle	Taux de croissance	0,45	0,67	0,95	0,85	0,70
Fin de la croissance exponentielle	D.O.	1,30	1,60	1,80	1,70	1,60
	Acide lactique g/l	4-5	7-8	18-19	17-19	16-18
Arrêt de la croissance	D.O.	1,82	2,15	2,45	2,40	2,38
	Acide lactique g/l	30	42	60	58	57

Nous avons également étudié l'influence de la température sur la croissance de *Str. lactis* C10 en culture à pH constant. Une augmentation de la température de culture ne modifie pas la croissance totale. En effet, à la température de 30° C la courbe de croissance est très semblable à celle à 25° C, la seule différence obtenue étant une vitesse de croissance un peu plus élevée. Par contre à la température de 18° C, la concentration en cellules obtenue en fin de croissance est plus faible, la densité optique finale étant de 2,18 au lieu de 2,42.

Ainsi en modifiant les conditions de culture à pH constant, il ne nous a pas été possible d'augmenter la croissance totale de *Str. lactis* C10.

3° Croissance de « *Str. lactis* » en milieu dialysé.

La culture en dialyse sans maintien du pH à une valeur constante [2,3] est un procédé qui ne permet pas d'augmenter nota-

blement la croissance totale. Comme le montre la figure 4, dans une culture tamponnée dialysée, la croissance se poursuit lentement après la phase exponentielle aboutissant après 48 heures d'incubation à une concentration en cellules double de celle obtenue en culture tamponnée non dialysée, alors que dans cette dernière, la croissance s'arrête très rapidement après la fin de la phase exponentielle. Comparativement à ce qu'ont obtenu Gerhardt et al. [3] avec les bactéries lactiques par le procédé de la culture en dialyse, nos résultats avec *Str. lactis* C10 sont néanmoins supérieurs à ceux concernant *Str. lactis* et se rapprochent plus de ceux concernant

Fig. 4. — Evolution de la croissance de *Str. lactis* C10 en culture dialysée. (Milieu T₂ tamponné ; pH 7,0 ; température d'incubation, 25° C. O—O, témoin non dialysé ; ●—●, culture en dialyse. Volume de culture/volume du milieu de dialyse, 1/10 ; débit de circulation de la culture, 720 ml/h ; surface de dialyse, 200 cm²)

L. acidophilus. Ceci est probablement dû à l'emploi du milieu T2 dont les constituants sont d'un poids moléculaire moins élevé et diffusent mieux que ceux du milieu à base de lait utilisé par ces auteurs pour le streptocoque. Le gain de croissance obtenu dans la culture en dialyse est très vraisemblablement dû au maintien du pH à une valeur légèrement plus élevée qu'en l'absence de dialyse. Le principal avantage de cette technique est de maintenir le nombre de cellules viables et leur pouvoir fermentaire à un seuil beaucoup plus élevé qu'en culture normale, puisqu'après 48 h de culture, « l'activité » est encore de 62 p. 100 au lieu de 15 p. 100 (fig. 4).

Quand on associe la régulation du pH avec la dialyse du milieu de culture, on observe un effet cumulatif des deux procédés de culture. Les résultats présentés dans la figure 5 montrent comment évoluent la croissance, la production d'acide lactique, « l'activité » et le nombre de cellules viables dans une telle culture. La courbe de croissance se décompose en deux périodes :

— Au cours des 10 premières heures de culture, la croissance suit une évolution comparable à celle observée en culture à pH constant non dialysée. A la phase de croissance exponentielle succède une phase de ralentissement au cours de laquelle le taux de croissance diminue très rapidement pour atteindre une valeur très faible (0,015) à la 10^e heure. La densité optique de la culture est alors de 2,55 ; la quantité totale d'acide lactique produit est de 60 g par l, tandis que la concentration en acide lactique dans le fermenteur atteint 46 g par l.

— Après la 10^e heure de culture, contrairement à ce qui se produit dans la culture à pH constant sans dialyse, la croissance continue à un taux voisin de 0,020 et ne s'arrête qu'après 60 h aboutissant à une densité optique de 2,90, ce qui représente seulement une concentration en cellules double de celle obtenue en culture non dialysée. La production totale d'acide lactique évolue parallèlement à la croissance et atteint 180 g par l, tandis que la concentration en acide lactique dans le fermenteur reste à peu près constante et voisine de 42 g par l. Après avoir subi une diminution d'environ 30 p. 100, entre la 10^e et la 20^e heure, la viabilité des cellules et leur activité fermentaire ne diminuent plus que très lentement.

Il semble donc que pendant cette deuxième période la croissance soit la résultante de l'équilibre entre la diffusion du lactose et des constituants du milieu d'une part, la consommation de ces constituants et la production d'acide lactique d'autre part. L'épuisement des constituants du milieu n'est certainement pas le responsable de la limitation de la croissance. La concentration en lactose dans le fermenteur, au lieu de diminuer, augmente en fait progressivement, ce qui prouve que la vitesse de diffusion du lactose à travers la membrane de cellulose est supérieure à la vitesse de consommation par les cellules.

Fig. 5. — Culture de *Str. lactis* C10 en dialyse à pH constant (Evolution de la densité optique de la culture, des concentrations en acide lactique et en lactose dans la culture et dans le milieu de dialyse, de l'activité et de la viabilité des cellules. Milieu T₂, pH 6,5, température d'incubation 25° C ; volume culture/volume du milieu de dialyse, 1/10 ; débit de circulation de la culture, 720 ml/h ; surface de dialyse, 200 cm²)

D'autre part, on n'observe pas d'augmentation du taux de croissance si on ajoute périodiquement les constituants du milieu T2 en solution concentrée. Enfin, le milieu de culture du fermenteur, après centrifugation pour éliminer les cellules bactériennes, se révèle incapable de supporter la croissance de *Str. lactis*, même après addition de l'équivalent des constituants du milieu T2.

Par contre la vitesse de croissance (taux de croissance = 0,02) est certainement gouvernée par la concentration en lactate dont la diffusion compense à peu près la production pour maintenir la concentration aux environs de 42 g par l. Or, comme on peut le voir dans le tableau III, le taux de croissance dans un milieu contenant 0,50 M d'acide lactique, soit 45 g par l, est de 0,02.

L'ensemble de ces résultats montre donc que dans la culture en dialyse à pH constant, la croissance est constamment sous la dépendance de la concentration en lactate. Nous avons tenté

d'augmenter la surface de dialyse et la vitesse de circulation de la culture ou de modifier le rapport des volumes culture-milieu sans que cela ait modifié pratiquement ces résultats. Pour augmenter notablement la quantité de cellules produites il faudrait une trop grande surface de dialyse pour que ce procédé soit utilisable à l'échelle industrielle ou bien une membrane dont le coefficient de diffusion soit beaucoup plus élevé que celui de la « regenerated cellulose » tout en présentant les mêmes qualités (résistance mécanique et facilité de stérilisation).

TABLEAU V

CROISSANCE DE « STR. LACTIS » C10
OBTENUE PAR DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CULTURE

<i>Technique de culture</i>	<i>D.O.*</i>	<i>Nombre* de cellules viables p. ml × 10⁹</i>	<i>Activité* relative</i>	<i>Observations</i>
1) Milieu T ₁	0,90	0,9 à 1,0	—	
2) Milieu T ₁ + tampon phosphate 0,1 M .	1,40	2 à 4	—	
3) Milieu T ₂ ; pH constant 6,5	2,45	30 à 60	100	Poids sec de cellules : 7 à 8 g/l
4) Milieu T ₂ tamponné en dialyse	2,00	10 à 12	60	Mauvais rendement par rapport à 3, le volume du milieu étant dix fois plus grand
5) Milieu T ₂ en dialyse à pH 6,5	2,95	20 à 30	65	

* Résultats au maximum de croissance (D.O. maximale).

En conclusion, les résultats qui précèdent établissent clairement que la croissance de *Str. lactis* souche C10 est essentiellement limitée par l'acide lactique produit au cours de la croissance. On ne peut donc espérer obtenir des cultures concentrées de cette bactérie qu'en trouvant un procédé permettant d'éliminer rapidement l'acide lactique au fur et à mesure de sa production. Le tableau V résume les résultats obtenus avec les différentes techniques de culture explorées dans ce travail. L'emploi d'un tampon partiellement soluble n'y figure pas, malgré les hauts rendements obtenus, parce que ce procédé ne peut avoir d'application pratique.

Parmi ces différentes techniques, la culture à pH constant est celle qui présente le plus d'avantages pour la préparation industrielle de cellules de *Str. lactis* C10 en vue de leur utilisation directe comme « levain » en industrie laitière. En effet la quantité de cellules viables obtenue par cette technique représente plus de 10 fois ce qu'on obtient sur lait ce qui est déjà suffisamment important pour faciliter la récolte et éviter de manipuler de trop grandes quantités de culture. En outre, le pouvoir fermentaire de ces cellules récoltées à la fin de la phase de croissance est aussi élevé que celui de cellules obtenues sur lait.

Nous tenons à remercier MM. Mocquot, Auclair, Accolas 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).

Résumé

Le nombre maximal de cellules de *Streptococcus lactis* souche C10, cultivé dans un milieu liquide (tryptone-extrait de levure-lactose), est d'environ 10^9 par ml. Quand le pH de ce milieu est maintenu à la valeur de 6,5 par addition de soude, la phase exponentielle de croissance est prolongée et le nombre maximal de cellules alors obtenu est de 30 à 60×10^9 (soit 7 à 8 mg de poids sec) par ml. L'activité fermentaire de ces cellules et leur viabilité sont comparables à celles de cellules cultivées sans addition de soude. Dans ces conditions, la concentration en acide lactique du milieu de culture est le facteur limitant la croissance.

Quand le milieu de culture est soumis à une dialyse contre du milieu neuf au cours de la croissance, celle-ci se poursuit après la phase exponentielle, à une vitesse faible mais constante dont la valeur est déterminée par la valeur de la concentration en acide lactique du milieu de culture. Dans ces conditions, la densité optique finale de la culture est supérieure à celle d'une culture sans dialyse. Cette prolongation de la croissance se retrouve quand le pH du milieu est maintenu à 6,5 par addition de soude ; toutefois, le nombre de cellules viables après l'arrêt de la croissance est seulement de 20 à 30×10^9 par ml de milieu.

C'est pourquoi la culture en milieu à pH constant sans dialyse est la meilleure méthode pour la production massive de cellules viables de *Streptococcus lactis*.

Summary

Mass production of cells of lactic streptococci.

II. Growth of *Streptococcus lactis* in medium at constant pH

Maximum yield of cells of *Streptococcus lactis* strain C10 grown in liquid medium (tryptone, yeast-extract, lactose), was about 10^9 per milliliter. When the pH of this medium was controlled at 6.5 by adding sodium hydroxide, the exponential phase of growth was extended and therefore a maximum yield of 30 to 60×10^9 cells (dry weight 7-8 mg) per milliliter was obtained. The fermentative activity of these cells and their viability was similar to that of cells grown without adding sodium hydroxide. In these conditions the main limiting factor for growth is lactic acid concentration in medium.

When culture medium was dialysed against fresh medium during growth, this one was extended after the exponential phase, at a low constant rate ; the value of the growth rate was controlled by lactic acid concentration in medium. The maximal growth measured by optical density was highest than in a culture without dialysis. This extension of growth was also observed when the pH of medium was controlled at 6.5 by adding sodium hydroxide ; however, a yield of 20 to 30×10^9 viable cells per milliliter was only obtained at the end of growth.

Therefore the culture at controlled pH without dialysis is the best method to produce high yields of viable cells of *Streptococcus lactis*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERGÈRE (J. L.). Production massive de streptocoques lactiques. I. Méthodes générales d'étude et facteurs de la croissance de *Streptococcus lactis*, souche C10. *Le Lait*, 1968, **48**, 1 (1^{er} article).
- [2] GALLUP (D. M.) and GERHARDT (P.). Dialysis Fermentor System for Concentrated Culture of Microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 1963, **11**, 506-512.
- [3] GERHARDT (P.) and GALLUP (D. M.). Dialysis Flask for Concentrated Culture of Microorganisms. *J. Bact.*, 1963, **86**, 919-929.
- [4] HARPER (W. J.) and RANDOLPH (H. E.). Lactic Acid in Cheese. *Am. Milk Rev.*, 1960, **22**, 43.
- [5] HARVEY (R. J.). Damage to *Streptococcus lactis* Resulting from Growth at Low pH. *J. Bact.*, 1965, **90**, 1330-1336.
- [6] HIRSCH (A.). Growth and Nisin Production of a Strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 208-217.
- [7] LAME (H.). Etude sur la production en masse des bactéries lactiques mésophiles en vue de leur utilisation pour accélérer la maturation des fromages. Thèse Doc. Ing. Sci., Université de Poitiers, 1966.

- [8] LAMPRECH (R.) and FOSTER (E. M.). The Survival of Starter Organisms in Concentrated Suspensions. *J. Appl. Bact.*, 1963, **26**, 359-369.
- [9] LONGWORTH (L. G.) and McINNES (D. A.). Bacterial Growth at Constant pH. Quantitative Studies on the Physiology of *Lactobacillus Acidophilus*. *J. Bact.*, 1936, **31**, 287-300.
- [10] LONGWORTH (L. G.) and McINNES (D. A.). Bacterial Growth at Constant pH. Apparent Oxidation-reduction Potential Acid Production and Population Studies of *Lactobacillus Acidophilus* under Anaerobic Conditions. *J. Bact.*, 1936, **32**, 567-585.
- [11] LUEDEKING (R.) and PIRET (E. L.). A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Techn. and Eng.*, 1959, **1**, 393-412.
- [12] MONTEUIL (J.) et SPICK (G.). *Microdosage des glucides*, 1963, fasc. 1, Faculté de Lille.
- [13] ROGERS (L. A.) and WHITTIER (E. O.). Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *J. Bact.*, 1928, **16**, 211-229.