PRODUCTION MASSIVE DE CELLULES DE STREPTOCOQUES LACTIQUES

III. PRODUCTION DE DIFFÉRENTES SOUCHES EN CULTURE A pH CONSTANT

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)

Dans un article précédent [3] nous avons vu que la culture à pH constant est la meilleure technique pour préparer des cellules de *Streptococcus lactis* souche C10 utilisables directement comme levain en industrie laitière. Dans ce qui suit nous étudions, d'une part le stade de la croissance auquel ces cellules doivent être récoltées en vue de leur conservation à la température de $-30^{\circ}C$, d'autre part les possibilités d'application de cette technique de production à d'autres souches et d'autres espèces de streptocoques lactiques.

Matériel et méthodes

1) Microorganismes.

Les différentes souches et espèces utilisées ont été *Str. lactis* C2, *Str. cremoris* C1, C3 et C13, *Str. diacetylactis* DRC1 et DRC2.

2) Conditions de culture et technique de mesure.

Les conditions de culture et les techniques utilisées ont déjà été décrites précédemment (2, 3). Le milieu T_2 utilisé est composé des mêmes constituants que le milieu T_1 mais leur concentration est doublée. Les dénombrements des cellules viables de *Str. cremoris* et *Str. diacetylactis* ont été effectuées avec le milieu d'Elliker [4] dans lequel le saccharose, l'acétate de sodium et l'acide ascorbique ont été supprimés. Sa composition modifiée est la suivante : extrait de levure Difco, 5 g ; tryptone Difco, 20 g ; glucose, 5 g ; lactose, 5 g ; NaCl, 4 g ; gélose, 15 g ; eau distillée, 1 000 ml ; pH 7,0. Ce milieu donne des résultats légèrement supérieurs à ceux obtenus sur « Plate Count Agar » Difco.

3) Influence de l'âge des cellules sur leur aptitude à la conservation.

Des échantillons de la culture prélevés à différents stades de la croissance (voir fig. 1) sont immédiatement refroidis dans l'eau glacée puis ramenés à une densité optique connue voisine de 1,00 par dilution dans du milieu T₂ stérile. Un volume de 100 ml de l'échantillon dilué est ensuite centrifugé à 4 000 g pendant 20 mn à 4° C. Après élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans 50 ml de lait écrémé stérile à 4° C puis réparti en tubes à bouchon vissé à raison de 5 ml par tube. Les tubes sont ensuite placés dans un congélateur dont la température est de -30° C. Le nombre de cellules viables et leur activité sont déterminés juste avant congélation puis après 20, 33, 70 et 105 jours

TABLEAU I

EVOLUTION DE LA VIABILITÉ ET DE L'ACTIVITÉ DES CELLULES DE *Str. lactis* C10 AU COURS DE LA CONSERVATION AU FROID EN FONCTION DE LEUR STADE DE RÉCOLTE

Stade de récolte des cellules (2)	Nombre de jours de conservation à -30°C				
	0 (1)	20	33	70	105
1	100 (3) (100)	65 (55)	53,3 (51)	38,8 (47)	4,2 (9)
2	100 (100)	98 (100)	89 (97)	80 (92)	58 (70)
3	100 (100)	95 (100)	87 (91)	84 (93)	62 (72)
4	100 (100)	100 (100)	96 (100)	94 (99)	78,3 (78)
5	100 (100)	100 (100)	98,2 (98)	99,6 (96)	75 (71)

(1) Avant congélation à - 30° C.

(2) Voir fig. 1.

(3) 1° Chiffre : % de cellules viables par rapport au temps 0.

2° Chiffre () : activité relative.

de conservation à -30°C . Chaque détermination porte sur deux tubes dont le contenu est décongelé rapidement par immersion dans de l'eau à 35°C . Le nombre de cellules viables dans la suspension avant congélation est compris entre 5 et 9.10^9 par ml de lait suivant le stade de la récolte des cellules.

Résultats et discussion

1) Influence de l'âge des cellules de *Str. lactis* C10 sur leur aptitude à la conservation et détermination du moment optimal de récolte.

Les résultats du tableau I montrent que la capacité de survie des cellules au cours de la conservation à -30°C est fonction du stade physiologique auquel elles ont été récoltées. Les cellules en phase exponentielle de croissance se conservent très mal à l'état congelé puisque après 105 jours de conservation à la température de -30°C , il en reste moins de 5 p. 100 de viables. Par contre pour les cellules récoltées après la phase exponentielle le pourcentage de cellules survivantes après 105 jours est égal ou supérieur à 58 p. 100 avec des écarts assez faibles entre les cellules d'âge différent. Les cellules récoltées quatre heures après l'arrêt de la croissance sont celles qui se conservent le mieux. D'une manière générale la perte d'activité n'est pas plus rapide que la perte de viabilité au cours de la conservation.

Ces résultats sont très voisins de ceux obtenus par Lamprech, Foster [6] et Baumann [1] pour d'autres souches et d'autres espèces de streptocoques lactiques cultivés sur lait ou sur milieu tamponné et conservés à l'état congelé dans des conditions analogues aux nôtres.

Cependant pour la détermination du moment optimal de récolte des cellules et dans un but pratique, il faut tenir compte de l'activité globale de la culture après conservation. Cette activité dépend du rendement de la culture, de l'activité des cellules avant congélation et enfin de la conservation de cette activité. Les résultats de la figure 1 montrent que la suspension conservant le plus d'activité résiduelle après 105 jours à -30°C est celle qui contient des cellules prélevées juste avant le début de la phase stationnaire c'est-à-dire au moment où le rendement de la culture est maximum. C'est donc à ce stade, où l'activité totale conservée est maximale, qu'il faut récolter les cellules d'une culture à pH constant en vue de la préparation des levains conservés par congélation.

2) Application de la culture à pH constant à d'autres streptocoques lactiques.

a) *Streptococcus lactis*.

Les résultats obtenus avec la souche C2 de *Str. lactis* sont identiques à ceux obtenus avec la souche C10 (tableau IV).

Fig. 1. — Détermination du moment optimal de récolte des cellules de *Str. lactis* C10 en vue de leur conservation à la température de -30°C . (Culture à pH 6,5 en milieu T_2 ; a, activité après 105 jours de conservation à -30°C , de 1 ml de culture prélevé à différents stades de la croissance, 1, 2, 3, 4 et 5.)

b) *Streptococcus cremoris*.

L'étude préliminaire des températures de croissance de 3 souches de *Str. cremoris* (C1, C3 et C13) a permis de déterminer que leur température optimale était également comprise entre 30 et 37°C . Cependant la vitesse de croissance diminue beaucoup plus rapidement que celle de *Str. lactis* pour les températures inférieures à 30°C (tableau II) et la croissance maximale est obtenue à 30°C au lieu de 25°C .

TABLEAU II

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE DE *Str. cremoris*
(Milieu T₁P ; pH 7,0 ; souches C₁, C₃ et C₁₃.)

	Température d'incubation en °C			
	20	25	30	37
Taux de croissance	0,30	0,45-0,55	0,65-0,75	0,70-0,80
D.O. à 24 h ..	1,38-1,45	1,40-1,45	1,50-1,55	1,30-1,38

Les cultures à pH constant ont donc été effectuées à la température de 30° C et à pH 6,5 dans le milieu T₂. Dans ces conditions et pour la souche C3, la densité optique au moment de l'arrêt de la croissance est de 2,45 et le poids de cellules sèches de 4 à 5 g par litre de culture (fig. 2). Cela représente une concentration en

TABLEAU III

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LACTATE SUR LA CROISSANCE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES (MILIEU T₁ ; pH 6,5 ; TEMPÉRATURE D'INCUBATION 30° C. APRÈS INOCULATION AVEC DES CELLULES EN PHASE DE CROISSANCE EXPONENTIELLE, LA D. O. ÉTAIT DE 0,075-0,080.)

	Concentration en lactate					
	0	0,20 M	0,33 M	0,50 M	0,67 M	M
<i>Str. lactis</i> C10	1,45 (4,4)	1,20 (5,0)	0,73 (5,30)	0,11 (6,45)	0,075 (6,50)	0,080 (6,50)
<i>Str. cremoris</i> C3	1,44 (4,45)	0,54 (5,25)	0,22 (6,10)	0,080 (6,50)	0,070 (6,50)	0,080 (6,50)
<i>Str. diacetylactis</i> DRC1	1,44 (4,45)	0,65 (5,20)	0,38 (5,60)	0,10 (6,40)	0,075 (6,50)	0,080 (6,50)

D. O. et pH à 24 h.

cellules 4 fois plus grande qu'en milieu T_1P tamponné et 7 à 8 fois plus grande qu'en milieu T_1 non tamponné.

Le nombre de cellules viables ne dépasse pas 4 à $5 \cdot 10^9$ cellules par ml mais représente cependant 7 à 8 fois plus de cellules viables qu'en milieu non tamponné.

Un point important est la diminution très rapide de la viabilité après l'arrêt de la croissance et surtout la diminution de l'activité

Fig. 2. — Evolution de la croissance de *Str. cremoris* C3 en culture à pH constant. (Milieu T_2 , pH 6,5, température d'incubation $30^\circ C$; la culture témoin non neutralisée est effectuée dans les mêmes conditions mais le milieu est additionné de tampon phosphate 0,1 M.)

qui commence dès le début du ralentissement de la croissance (fig. 2). Cela peut s'expliquer en partie par une sensibilité de cette espèce aux ions lactate plus grande que celle montrée par *Str. lactis*. En effet, comme le montre le tableau III, une concentration de 18 g par l, soit 0,20 M, réduit déjà la croissance de 4 fois en milieu T₁ et une concentration de 45 g par l, soit 0,50 M, l'inhibe complètement.

Néanmoins, malgré ces inconvénients, la culture à pH constant reste valable pour la production de cellules de *Str. cremoris* à condition de les récolter rapidement avant la fin de la phase de ralentissement de la croissance. La méthode a d'ailleurs été appliquée à la souche C1 avec le même résultat (tableau IV). Par contre dans le cas de la souche C13 les cellules forment de longues

TABLEAU IV

RENDEMENTS EN CELLULES DE STREPTOCOQUES LACTIQUES OBTENUS PAR DIFFÉRENTS PROCÉDÉS DE CULTURES

Espèce	Souche	Technique de culture (1)	D. O.	Poids sec g par l	Nombre de cellules viables par ml $\times 10^9$
<i>Str. diacetylactis</i>	DRC1	T	1,08	—	0,5
		L	—	—	1,3
		CN	2,47	4,3	15-30
<i>Str. cremoris</i> . . .	C1	T	1,09	—	0,45
		L	—	—	1,5
		CN	2,30-2,45	3,8-4,4	3,6-6,0
	C3	T	1,10	—	0,65
		L	—	—	1,2
		CN	2,40-2,53	3,9-5,0	3,3-5,0
<i>Str. lactis</i>	C2	T	1,06	—	0,90
		L	—	—	2,4
		CN	2,37-2,50	5-6	25-40
	C10	T	0,99	—	0,90
		L	—	—	2,5-3,0
		CN	2,45-2,50	6-8	40-50

(1) T : Culture sur milieu T₁ non tamponné.

L : Culture sur lait stérile.

CN : Culture à pH constant de 6,5 sur milieu T₂.

Température d'incubation : 25° C.

chaînes qui s'agglomèrent rapidement en énormes amas sous l'effet de l'agitation, ce qui rend impossible toute mesure de la croissance.

c) *Streptococcus diacetylactis*.

Les résultats obtenus pour deux souches de *Str. diacetylactis* DRC1 et DRC2 sont intermédiaires entre ceux obtenus avec *Str. lactis* et *Str. cremoris*, tant pour la quantité totale de cellules (D. O. et poids sec) que pour le nombre de cellules viables (tableau IV).

Conclusion

L'utilisation de suspensions de bactéries lactiques conservées à l'état congelé et ensemencées directement dans le lait de fabrication [6] en vue de remplacer les levains préparés à l'usine, comme celle des suspensions concentrées [7] dans le but d'accélérer le processus d'égouttage du caillé de fromagerie, exigeront de grandes quantités de cellules de bactéries lactiques. Leur production sera l'un des éléments importants qui interviendront dans le prix de revient de ces procédés. La culture à pH constant, dans un milieu à base de tryptone, d'extrait de levure et de lactose permet d'obtenir une concentration en cellules de 5 à 10 fois plus élevée que celle que l'on obtient dans le lait ou les milieux courants de laboratoire et ceci pour les trois espèces de streptocoques lactiques utilisés comme levains. Le milieu de culture qui a été utilisé pour cette étude est d'un prix de revient relativement élevé pour être utilisé industriellement mais il est possible de mettre au point des combinaisons de sous-produits peu coûteux [5] et susceptibles de promouvoir une croissance des bactéries lactiques aussi bonne que celle obtenue dans notre milieu de laboratoire.

Nous tenons à remercier MM. Mocquot, Auclair et 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 65-FR-169).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BAUMAN (D. P.), 1964. Preservation of lactic cultures. Microfilm Copy n° 65-3756, unpublished Ph. D. Thesis, University of Iowa, Ames, Iowa. University Microfilms, Ann Arbor, Michigan.
- [2] BERGÈRE (J.-L.), (1967). Production massive de cellules de streptocoques lactiques. I. Méthodes générales d'étude et facteurs de la croissance de *Str. lactis* C10. *Le Lait*, 1968 **48**, 1.
- [3] BERGÈRE (J.-L.), (1967). Production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* en milieu à pH constant. *Le Lait*, 1968, **48**, 13.

- [4] ELLIKER (P. R.), ANDERSON (A. W.) and HANNESSON (G.), (1956). An Agar medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.*, **39**, 1611-1612.
- [5] LAME (H.), (1966). Etude sur la production en masse de bactéries lactiques mésophiles en vue de leur utilisation pour accélérer la maturation des fromages. Thèse Doct. Ing. Sci., Université de Poitiers.
- [6] LAMPRECH (R.) and FOSTER (E. M.), (1963). The survival of starter organisms in concentrated suspensions. *J. appl. Bact.*, **26**, 359-369.
- [7] VASSAL (L.) et MOCQUOT (G.), (1967). Fermentation lactique accélérée en fromagerie grâce à l'emploi d'un nombre élevé de bactéries. *La Technique laitière*, **541**, 9-13.

Résumé

L'étude de l'influence de l'âge des cellules de *Str. lactis* C10 sur leur aptitude à la conservation (viabilité et activité) à la température de -30°C a montré que le moment optimal de récolte des cellules se situe juste avant le début de la phase stationnaire de croissance.

La méthode de culture à pH constant (6,5) a été utilisée pour la production de cellules de *Str. lactis* souche C2 ($2,5$ à $4,0 \times 10^{10}$ cellules viables p. ml) et de *Str. diacetylactis* souches DRC1 et DRC2 ($1,5$ à $3,0 \times 10^{10}$ cellules viables p. ml). Toutefois pour *Str. cremoris* souches C1 et C3 le nombre de cellules viables ne dépasse pas $0,8 \times 10^{10}$ par ml bien que le poids de cellules sèches atteigne de 4 à 5 mg par ml. Cette espèce est d'ailleurs plus sensible que *Str. lactis* à l'effet inhibiteur du lactate et l'activité des cellules diminue très rapidement après l'arrêt de la croissance.

Summary

The effect of age of cells when harvested, on retention of viability and activity during storage at -30°C has been studied in *Str. lactis* C10. It has been shown that the proper time to harvest cells was just before the stationary phase of growth begins.

The procedure of culture at controlled pH (6,5) has been used successfully in the production of cells of *Str. lactis* C2 ($2,5 - 4.0 \times 10^{10}$ viable cells p. ml) and *Str. diacetylactis* DRC1 and DRC2 ($1.5 - 3.0 \times 10^{10}$ viable cells p. ml). However in the case of *Str. cremoris* C1 and C3 the number of viable cells did not exceed 0.8×10^{10} p. ml though the dry weight reached 4-5 mg p. ml. Moreover this latter species was more sensitive to the inhibition by lactate than *Str. lactis* and the activity of cells decreased rapidly after the exponential growth.