Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt *

par

J. P. ACCOLAS, R. BLOQUEL**, R. DIDIENNE**
et J. REGNIER**

*Laboratoire de Technologie Laitière, I.N.R.A.
78350 Jouy-en-Josas (France)*

INTRODUCTION

Depuis la dernière guerre mondiale, le yoghourt a connu un remarquable essor industriel et commercial et il est devenu un lait fermenté très populaire dans divers pays d'Europe occidentale, en particulier en France. Les revues récentes entièrement consacrées au yoghourt [10, 19, 22, 39, 44] et la place qu'il occupe dans les revues plus générales traitant des laits fermentés [4, 7, 25, 28, 36], témoignent bien de l'intérêt que suscite ce produit.

L'acidification du lait résulte généralement de l'action de deux bactéries lactiques thermophiles, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus****. L'existence d'interactions entre ces deux bactéries, favorables au développement de l'association bactérienne, à l'acidification et à la formation de l'arôme, a été démontrée dans un certain nombre de cas [1, 5, 15, 17, 29, 30, 31, 47].

* Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche avec la Société de Diffusion de Marques (S.O.D.I.M.A.-Yoplait), 170, bd du Montparnasse - 75014 Paris.

** Adresses actuelles : R. BLOQUEL, Ecole de Laiterie, E.N.S.A.I.A. - 54000 Nancy.
J. RÉGNIER, Société Bioprox - 92300 Levallois.
R. DIDIENNE, Laboratoire de Recherches Fromagères, I.N.R.A. - 15000 Aurillac.

*** En France, la définition légale du yoghourt mentionne spécifiquement ces deux espèces de bactéries lactiques. Ce n'est pas le cas de nombreux autres pays, où il est éventuellement possible d'utiliser d'autres espèces de bactéries lactiques.

En pratique, les fabricants français propagent des cultures mixtes de streptocoques et de lactobacilles, de préférence à des cultures pures de chacun des deux organismes. Le maintien d'un bon équilibre entre les deux espèces bactériennes des cultures mixtes, au cours des repiquages successifs, est affaire d'expérience. Un rapport streptocoques/lactobacilles voisin de 1 est généralement considéré comme optimal [32] et l'on cherche à le maintenir dans les cultures successives aboutissant au levain et dans le yoghourt proprement dit. De plus, les fabricants recherchent de préférence des cultures mixtes très actives, de façon à obtenir une acidification aussi rapide que possible (90° D à 100° D en 3 à 4 h) à une température relativement élevée, voisine de 45° C*. Les yoghourts, une fois coagulés et suffisamment acides, sont refroidis et maintenus au froid jusqu'à la vente aux consommateurs. Pour répondre au goût de la clientèle, les fabricants souhaitent obtenir des yoghourts aromatiques, qui ne s'acidifient pas trop au cours du refroidissement et de la conservation au froid. Il est reconnu que cet objectif n'est pas facilement atteint en pratique en dépit de la mise en œuvre, par exemple, d'un refroidissement aussi rapide que possible après fabrication.

Dans l'optique des divers problèmes évoqués ci-dessus, il nous a semblé utile d'examiner les propriétés acidifiantes d'un certain nombre de souches de bactéries lactiques thermophiles. Pour compléter l'information recueillie au laboratoire, on a effectué parallèlement une expérimentation de ces bactéries en fabrication de yoghourt, à la Laiterie Expérimentale de Jouy-en-Josas. Ce dernier travail fera l'objet d'une autre publication [46].

METHODES EXPERIMENTALES

Souches

Les souches de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* étudiées provenaient pour une part de la collection du Centre National de Recherches Zootechniques (C.N.R.Z.). D'autres souches avaient été récemment isolées de levains utilisés par des fabricants français de yoghourt. Les souches *L. bulgaricus* CNRZ 384 et *S. thermophilus* CNRZ 385 ont été isolées d'un yoghourt préparé par une firme japonaise. Les souches *S. thermophilus* CNRZ 368 (Sts) et *L. bulgaricus* 369 (Ib) nous avaient été aimablement envoyées par le docteur Galesloot (NIZO, Ede, Pays-Bas). Dans certains essais, nous avons employé, à titre comparatif, une souche de *Lactobacillus helveticus* et une souche de *Lactobacillus lactis* provenant de la collection du C.N.R.Z.

* Dans d'autres pays, par exemple aux Pays-Bas, les fabricants recourent de préférence à des incubations beaucoup plus longues (12 à 15 h) à des températures beaucoup plus basses (30° C à 32° C).

Toutes ces souches étaient conservées sous forme lyophilisée. Elles étaient remises en culture sur lait tournesolé autoclavé. Après deux ou trois repiquages successifs (16 h à 37° C), il était constitué un stock de cultures sur lait tournesolé (inoculum 0,5 ml pour 10 ml de lait). Ces cultures étaient conservées à -30° C, sans incubation préalable. Au fur et à mesure des besoins, les cultures congelées étaient décongelées rapidement, incubées 16 h à 37° C et repiquées deux ou trois fois avant l'utilisation proprement dite, par ensemencement d'une öse (0,001 ml) pour 10 ml de lait tournesolé dans le cas de *S. thermophilus* et de 0,1 ml pour 10 ml de lait tournesolé, dans le cas des lactobacilles. Les cultures étaient incubées pendant 16 h à 37° C.

Lait

Le lait tournesolé était préparé avec du lait écrémé sec granulé exempt d'antibiotique, à raison de 100 g de lait sec dans 1 000 ml d'eau distillée, auquel on ajoutait 10 ml de solution concentrée et stérilisée de tournesol RAL (Ugine-Kuhlmann). Le lait tournesolé était réparti en tubes bouchés à vis à raison de 10 ml par tube et autoclavé à 118° C pendant 20 mn.

Pour les essais proprement dits nous avons utilisé du lait reconstitué à partir du même lait écrémé sec à raison de 115 g de lait sec dans 1 000 ml d'eau distillée, de façon à obtenir un lait dont la substance sèche dégraissée, voisine de 110 g par litre, fut comparable à celle du lait utilisé pour la fabrication des yoghourts. Ce lait reconstitué était réparti en tubes stériles bouchés à vis et était chauffé, la veille de l'essai, pendant 30 mn dans un bain-marie réglé à 80° C. Les tubes étaient ensuite refroidis rapidement et conservés au réfrigérateur dans un bain d'eau glacée, jusqu'au lendemain. Avant utilisation, le lait était chauffé pendant 10 mn dans un bain-marie bouillant, puis rapidement refroidi à une température voisine de 15° C. Des essais préliminaires nous avaient en effet montré que ce second traitement thermique du lait permettait de limiter les variations aléatoires de l'acidification, variations résultant peut-être d'une oxygénation incontrôlée du lait au cours des manipulations.

Variations de la production d'acide en fonction de la température d'incubation

Nous avons comparé la production d'acide de cultures qui étaient incubées parallèlement, pendant 6 h, à huit températures différentes (entre 35° C et 50° C). Chaque comparaison portait sur trois cultures : un streptocoque, un lactobacille et la culture mixte associant les deux germes.

Au terme de l'incubation, on mesurait l'acidité titrable et on traçait les courbes de variations de l'acidité en fonction de la tempéra-

ture d'incubation. En outre, pour mettre en évidence l'effet stimulant d'une souche sur l'autre, nous avons comparé la quantité d'acide produite par la culture mixte à la somme des quantités d'acide produites, dans les mêmes conditions, par chacune des deux cultures pures. Nous avons tracé les deux courbes correspondantes.

Mesure de la production d'acide

Au terme de la période d'incubation, les tubes étaient rapidement refroidis et maintenus dans l'eau glacée jusqu'au moment du titrage. Pour effectuer celui-ci, on pesait $9 \pm 0,1$ g de culture, auxquels on ajoutait 0,5 ml de phénolphtaléine (solution à 1 p. 100 dans l'alcool éthylique à 95°, neutralisée par addition de soude jusqu'à coloration rose très pâle). On titrait avec de la soude décimale jusqu'à virage au rose pâle. L'acidité titrable mesurée était assimilée à des degrés Dornic (° D) ; dans ces conditions, un degré Dornic correspond à 0,1 ml de soude 0,1 N, c'est-à-dire à 0,1 g d'acide lactique par kg de lait.

Stabilité des cultures mixtes au cours des repiquages

Nous ne décrivons ici que le principe de ces essais ; les détails seront précisés dans l'exposé des résultats. Pour apprécier la stabilité des cultures mixtes de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus*, nous avons étudié le comportement de ces cultures en les soumettant à des repiquages successifs après des temps variables d'incubation à 44° C. On mesurait l'acidité titrable et les populations formées par chacun des deux germes de la culture mixte en fin d'incubation, c'est-à-dire au moment du repiquage, et on calculait le rapport correspondant du nombre des streptocoques au nombre des lactobacilles (S/L). On comparait les résultats obtenus dans les différentes subcultures.

Dénombrement des cellules bactériennes

Pour estimer le développement bactérien au cours de l'incubation des cultures mixtes et les populations bactériennes présentes dans ces cultures en fin d'incubation, nous avons employé la méthode de dénombrement microscopique direct préconisée pour l'examen du lait [42]. On étalait 0,01 ml de la culture ou d'une dilution adéquate de cette culture sur une lame de Breed, de façon que le nombre de cellules présentes dans un champ microscopique n'excède pas 30. Le film de lait, une fois séché, était coloré avec une solution de bleu de méthylène à 0,6 p. 100 dans l'alcool à 95°, pendant 1 mn. On fixait par l'alcool flambé, on rinçait la lame dans l'eau et on séchait. Les dénombrements étaient effectués en comptant chaque cellule bien individualisée, coque ou bâtonnet, comme un élément, pour éviter de prendre en compte les variations résultant de la plus ou moins grande longueur des chaînes de cellules bactériennes, variations qui

sont particulièrement importantes en cours de culture dans le cas de *S. thermophilus*.

Réfrigération et conservation au froid des cultures incubées

Les essais ont porté sur des cultures mixtes effectuées dans des tubes bouchés à vis contenant 15 ml de laitensemencé avec une culture de streptocoque et une culture de lactobacille, à raison de 1,5 p. 100 de chacune des deux cultures. Les tubes de lait, ensemencés en série, étaient incubés à 44° C dans un bain-marie pendant un temps suffisant (ce temps était d'ailleurs variable selon les cultures mixtes utilisées) pour atteindre une acidité titrable se situant généralement entre 90° D et 100° D.

Dans chaque expérience, les cultures étaient divisées en deux lots au terme de l'incubation. Le premier lot de tubes était soumis à une réfrigération « rapide » dans un bain-marie à eau glacée. De cette façon les cultures étaient refroidies de 44° C à 4° C en 10 mn. Ce premier lot était alors subdivisé en quatre séries de tubes qui étaient portés aux températures suivantes : 14° C, 8° C (bains-marie thermostatés), 0° C (bain-marie contenant de la glace fondante) et — 30° C dans un congélateur.

Le deuxième lot de tubes était soumis à une réfrigération programmée « lente » avec un cryostat Mini-max (Secasi, Bordeaux). Cet appareil comporte un émetteur de programme qui permet de refroidir le liquide du cryostat et les échantillons à une vitesse déterminée au préalable. Deux programmes de réfrigération ont été utilisés : de 44° C à 14° C en 1 h (vitesse moyenne de réfrigération 0,5° C par mn) et de 44° C à 8° C en 1 h (0,6° C par mn). Les températures des échantillons soumis à la réfrigération étaient mesurées avec des thermocouples reliés à un pyromètre enregistreur Speedomax, type C (Meci, Paris).

Une fois portés aux températures indiquées (14° C, 8° C, 0° C et — 30° C pour le lot réfrigéré rapidement, 14° C et 8° C pour le lot réfrigéré lentement), les tubes étaient conservés à ces températures pendant 12 j au maximum.

Pour suivre l'évolution de la production d'acide des cultures, on mesurait l'acidité titrable à la fin de la période d'incubation, à la fin de la réfrigération pour les cultures du deuxième lot, lorsque leur température atteignait 14° C ou 8° C (une mesure était effectuée parallèlement sur les cultures du premier lot au même moment) et périodiquement, tout au long de la conservation à 14° C, 8° C, 0° C ou — 30° C. Les mesures étaient effectuées en parallèle sur les six séries de tubes de manière à comparer l'évolution de l'acidité titrable de chacune de ces séries, et les courbes traduisant les variations de l'acidité titrable au cours du temps ont été tracées sur un même graphique.

RESULTATS

Production d'acide en fonction de la température d'incubation

Nous avons présenté dans la figure 1 les variations de l'activité acidifiante, en fonction de la température d'incubation, de cultures pures de bactéries lactiques thermophiles et d'un petit nombre de cultures mixtes correspondantes associant un streptocoque à un lactobacille.

fig. 1

Production d'acide de souches de *S. thermophilus* et de lactobacilles en culture pure et en mélange.

Inoculum : 1 p. 100 pour les cultures pures ; 0,5 p. 100 de chaque souche pour les cultures mixtes. Durée de l'incubation : 6 h.

Chaque point représente la moyenne de trois résultats.

Cultures mixtes : A, moyenne de 369 + 160, 369 + 302 et de 369 + 368 ; B, 384 + 385 ; C, moyenne de 303 + 160, 303 + 302 et de 303 + 368 ; D, moyenne de 242 + 160, 242 + 302 et de 242 + 368.

Les trois souches de *S. thermophilus*, CNRZ 160, 302 et 368 constituent un groupe relativement homogène, dont l'activité acidifiante maximale se situe entre 42° C (souche 302) et 45° C (souche 368). Les autres streptocoques thermophiles utilisés au cours de ce travail se rattachent à ce groupe à l'exception de la souche 385. Celle-ci, qui est également présentée sur la figure 1 a, se distingue nettement des autres *S. thermophilus*. En effet, l'activité acidifiante de la souche 385

est d'abord très élevée, entre 35° C et 42° C, puis chute rapidement, devenant inférieure à celle des souches précédentes, entre 48° C et 50° C. Cette souche présente donc un caractère thermophile moins accusé que celui des autres souches de *S. thermophilus*.

En ce qui concerne les lactobacilles (fig. 1 b), les courbes obtenues avec *L. bulgaricus* 369 et *L. lactis* 242, espèces très voisines [40], délimitent une zone où se situent la majorité des souches de *L. bulgaricus* utilisées au cours de ce travail. On retiendra qu'il existe des variations importantes de l'activité acidifiante d'une souche à une autre, la souche 369 pouvant être considérée comme une souche active et la souche 242 comme une souche peu active. L'acidification est à son maximum, pour ces deux souches, au voisinage de 44° C-46° C. La seconde souche de *L. bulgaricus* figurant sur le diagramme, CNRZ 384, présente une très bonne activité acidifiante ; l'optimum, voisin de 47° C, souligne son caractère thermophile. La quatrième souche, *L. helveticus* 303, qui appartient à une espèce nettement différente de *L. bulgaricus* et de *L. lactis* [40], se caractérise par un optimum très accusé à 43° C. A cette température, l'activité acidifiante de la souche 303 est comparable à celle de *L. bulgaricus* 384 à 47° C, alors qu'aux températures de 35° C et de 50° C, *L. helveticus* 303 rejoint la souche 242 peu active.

La production d'acide des cultures mixtes composées avec les souches précédentes est nettement supérieure à celle de l'une ou de l'autre des cultures pures composantes. Les courbes obtenues avec des cultures mixtes associant la même souche de lactobacille à l'une ou l'autre des trois souches *S. thermophilus* 160, 302 ou 368, sont tout à fait comparables, et nous n'avons figuré que la courbe moyenne (fig. 1 c). Autrement dit, la production d'acide de ces cultures mixtes n'est pas influencée de façon notable par la nature de la souche de streptocoque, dans nos conditions d'essai, c'est-à-dire après 6 h d'incubation.

Pour voir dans quelle mesure la production d'acide de ces cultures mixtes impliquait une synergie entre les deux souches associées, nous avons comparé, dans la figure 2, la quantité d'acide produite par les cultures mixtes à la somme des quantités d'acide produites par les cultures pures correspondantes. Pour les deux groupes de cultures mixtes contenant l'un la souche *L. bulgaricus* 369 (fig. 2 a) et l'autre la souche *L. lactis* 242 (fig. 2 d), on observe un effet synergique marqué à toutes les températures, sauf à 50° C. Dans le cas des cultures mixtes contenant *L. helveticus* 303 (fig. 2 c), l'effet synergique observé s'annule également à 50° C et il est peu marqué au voisinage de 43° C, c'est-à-dire dans la zone de température où la culture pure de la souche 303 acidifie le lait très activement. Soulignons à nouveau ici que ces résultats traduisent le rôle déterminant que joue le lactobacille dans l'activité acidifiante de la culture mixte, mesurée après 6 h d'incubation.

Une autre association également présentée sur la figure 2, celle de *L. bulgaricus* 384 et de *S. thermophilus* 385 (fig. 2 b), se comporte différemment des cultures mixtes précédentes. En effet, dans nos conditions d'essai, aucun effet synergique apparaît ; au contraire, entre 35° C et 43° C, cette culture mixte produit même une quantité d'acide nettement inférieure à la somme des quantités d'acide formées par les cultures pures correspondantes. De ce fait, cette culture

mixte, qui contient deux souches très bonnes acidifiantes en culture pure, présente une activité acidifiante comparable à celle de cultures mixtes contenant par exemple, *L. bulgaricus* 369 et une souche de *S. thermophilus* beaucoup moins active que *S. thermophilus* 385.

Stabilité des cultures mixtes

Pour apprécier la stabilité des cultures mixtes de streptocoques et de lactobacilles, nous avons étudié le comportement d'une culture mixte composée avec *S. thermophilus* 160 et *L. bulgaricus* 369, soumise à des repiquages successifs. La première culture était obtenue en ensemençant dans du lait chacune des deux cultures pures à 1 p. 100. L'incubation était effectuée à 44° C. On voit (fig. 3 a) que le streptocoque démarre un peu plus rapidement que le lactobacille. Ensuite, le développement des deux germes est parallèle et les populations maximales, voisines de 10⁹ bactéries par ml, sont atteintes après 3 h d'incubation. Le rapport du nombre des streptocoques au nombre des lactobacilles (S/L)* qui était légèrement inférieur à 2 au départ, augmente au début de l'incubation, passe par un maximum voisin de 4 et tend à nouveau, après 3 h d'incubation, vers une valeur

* Les résultats relatifs au rapport S/L et à l'acidité acquise au cours de l'incubation, ont été portés sur des graphiques à échelle semi-logarithmique. Il en est de même pour les figures 4, 5 et 7.

fig. 2

Productions d'acides comparées de cultures mixtes de *S. thermophilus* et de *Lactobacillus* et des cultures pures correspondantes.

La comparaison porte sur les cultures présentées dans la figure 1. L'acidité acquise a été calculée en déduisant chaque fois l'acidité naturelle du lait.

- a : ●—● somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. bulgaricus* 369 et de *S. thermophilus* 160, 302 et 368.
○—○ acidité moyenne produite par les cultures mixtes 369 + 160, 369 + 302 et 369 + 368.
- b : ●—● somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. bulgaricus* 384 et de *S. thermophilus* 385.
○—○ acidité moyenne produite par la culture mixte 385 + 384.
- c : ●—● somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. helveticus* 303 et de *S. thermophilus* 160, 302 et 368.
○—○ acidité moyenne produite par les cultures mixtes 303 + 160, 303 + 302 et 303 + 368.
- d : ●—● somme moyenne des acidités produites par les cultures pures de *L. lactis* 242 et de *S. thermophilus* 160, 302 et 368.
○—○ acidité moyenne produite par les cultures mixtes 242 + 160, 242 + 302 et 242 + 368.

fig. 3

Evolution du nombre de germes, du rapport streptocoques/lactobacilles (S/L) et de la production d'acide dans une culture mixte de *S. thermophilus* 160 et de *L. bulgaricus* 369.

Inoculum : 1 p. 100 de chaque souche ; incubation à 44° C.

fig. 4

Caractéristiques des cultures mixtes de *S. thermophilus* 160 et de *L. bulgaricus* 369 en fonction de l'âge de la préculture. Celle-ci est constituée par la culture mixte présentée dans la figure 3. Après des temps variables d'incubation, cette préculture était repiquée à 1 p. 100 et l'incubation poursuivie à 44° C. Les durées d'incubation sont indiquées sur la figure. Au terme de l'incubation, on mesurait le nombre de germes présents (streptocoques et lactobacilles) et l'acidité titrable. On calculait le rapport S/L et l'acidité acquise.

voisine de celle de départ, entre 1 et 2 (fig. 3 b). L'acidification s'effectue exponentiellement* au cours de la croissance de la culture mixte et se poursuit encore activement après que chacun des deux germes a atteint une population maximale (fig. 3 c).

En repiquant cette culture mixte à 1 p. 100 après 1, 2, 3, 4, 5 et 6 h d'incubation, nous avons obtenu plusieurs cultures qui ont été incubées à 44° C, et dont les caractéristiques sont présentées dans la figure 4. Dans les cultures issues d'un repiquage précoce, c'est-à-dire après 1 à 3 h d'incubation, les streptocoques se multiplient activement et atteignent une population maximale voisine de 10⁹ streptocoques par ml, si le temps d'incubation est suffisamment long (fig. 4 a). Ainsi, les populations atteintes dans les subcultures après 5 h d'incubation sont-elles supérieures à celles obtenues après 4 h d'incubation. Par contre, les lactobacilles ne sont pas présents dans l'inoculum en nombre suffisant et ne se développent pas assez rapidement pour atteindre une population comparable à celle de la première culture mixte (fig. 4 b). De ce fait, le rapport S/L, bien qu'il diminue exponentiellement d'une subculture à la suivante, est encore relativement élevé dans les subcultures issues d'un repiquage effectué après 3 h d'incubation (fig. 4 c). Enfin, la quantité d'acide produite par ces différentes subcultures est d'autant plus élevée que l'âge de la préculture augmente et que l'incubation est plus longue, comme le montrent les résultats obtenus avec les séries de subcultures incubées respectivement 2 h 30, 3 h 30, 4 h et 5 h (fig. 4 d).

Lorsque les repiquages sont effectués plus tardivement, c'est-à-dire après 3 h d'incubation, alors que chacune des deux souches a atteint sa phase stationnaire de croissance dans la première culture mixte (fig. 3 a), les subcultures successives sont inoculées avec un nombre de germes tout à fait comparable. Dans ces conditions, il semble normal, à première vue, que les subcultures successives produisent, en un temps donné, une quantité d'acide identique. On observe en effet, à ce stade, un palier d'acidification qui est d'autant plus élevé que l'incubation est plus longue (fig. 4 d). Toutefois, les dénombrements effectués sur les subcultures successives (fig. 4 a et 4 b) et la diminution exponentielle du rapport S/L qui se poursuit (fig. 4 c), montrent que la stabilité de l'activité acidifiante, pendant cette période, masque des changements notables de la population bactérienne, d'une subculture à la suivante. Dans le cas des streptocoques, les différences observées sont peu marquées, mais on retiendra que leur nombre dans les subcultures, au terme de l'incubation, tend à diminuer lorsque le repiquage est effectué très tardivement (résultats non rapportés ici). Autrement dit, les streptocoques démarrent plus lentement et leur activité est moindre dans les subcultures issues d'un repiquage tardif. Inversement, les lactobacilles démarrent plus rapidement et sont plus actifs, à nombre sensiblement égal, dans les subcultures repiquées tardivement (fig. 4 b). En définitive, tout se passe, au niveau des paliers d'acidification, comme s'il existait

* Voir note page 9.

un équilibre dynamique, le ralentissement d'activité des streptocoques étant compensé par le gain d'activité des lactobacilles. Mentionnons ici qu'en procédant à un second repiquage, nous avons obtenu une deuxième série de subcultures dont le comportement était, en tous points, analogue à celui que nous venons d'analyser.

En utilisant les deux mêmes souches, *S. thermophilus* 160 et *L. bulgaricus* 369, nous avons constitué deux cultures mixtes déséquilibrées au départ, soit à l'avantage du streptocoque, soit à l'avantage du lactobacille (fig. 5). On constate que ces deux cultures mixtes présentent une tendance remarquable à se rééquilibrer. Lorsque le streptocoque domine (fig. 5 a), le lactobacille n'arrive pas à combler totalement son handicap en 7 h de culture, et le rapport S/L est encore élevé à ce stade (fig. 5 c). On a constaté qu'on obtenait une culture mixte équilibrée, dont le rapport S/L est voisin de 1, en

fig. 5

Evolution de deux cultures mixtes « déséquilibrées » de *S. thermophilus* 160 et de *L. bulgaricus* 369.

- et ▲—▲ : Inoculum de *S. thermophilus* 1 p. 100.
Inoculum de *L. bulgaricus* 0,1 p. 100.
- et △—△ : Inoculum de *S. thermophilus* 0,1 p. 100.
Inoculum de *L. bulgaricus* 1 p. 100.

Incubation à 44° C dans les deux cas.

fig. 6

Stabilité de la culture mixte de *S. thermophilus* 160 et de *L. bulgaricus* 369 au cours des repiquages.

Au terme de l'incubation à 44° C (4 ou 6 h), la culture mixte était repiquée (1 p. 100), refroidie et conservée au réfrigérateur jusqu'au lendemain ou, le vendredi soir, jusqu'au lundi matin (—//—).

effectuant un repiquage et une nouvelle incubation. Lorsque le lactobacille domine (fig. 5 b), la multiplication très active du streptocoque pendant les premières heures de culture conduit à un rétablissement très rapide de l'équilibre (fig. 5 c). On remarquera aussi que dans cette culture, déséquilibrée au départ en faveur du lactobacille, la production d'acide est un peu plus lente au début de l'incubation et plus active ensuite que dans le cas inverse (fig. 5 d).

La culture mixte 160-369 apparaît donc stable et il semblait relativement facile de maintenir, avec cette association, une population équilibrée et d'obtenir une production d'acide suffisante et régulière. C'est ce que nous avons vérifié en repiquant quotidiennement une culture mixte 160-369 après 4 et 6 h d'incubation à 44° C (fig. 6). On constate que le rapport S/L se maintient de façon très satisfaisante entre 1 et 2 dans les subcultures successives. La production d'acide est plus élevée bien entendu dans les cultures incubées 6 h que dans celles qui ont été incubées 4 h, mais elle est également très régulière dans chaque série de subcultures.

D'une association à une autre, on peut observer des différences importantes, comme le montre, à titre d'exemple, la figure 7. Lorsqu'on associe *S. thermophilus* 160 à *L. bulgaricus* 36 (fig. 7 a), souche qui se développe beaucoup plus lentement dans le lait que *L. bulgaricus* 369, la culture mixte se caractérise par une augmentation très rapide et très importante du rapport S/L (fig. 7 b) ; ce rapport ne se rapproche de 1 que lentement ensuite, en poursuivant l'incubation. Si on associe le même lactobacille à *S. thermophilus* 388 (fig. 7 a) qui se caractérise par un moindre développement que la souche 160, le rapport S/L varie beaucoup moins que dans le cas précédent au cours de l'incubation (fig. 7 b). Dans les deux cas, la production d'acide est moins active que celle de la culture mixte 160 + 369, et

fig. 7

Caractéristiques de deux cultures mixtes contenant l'une *S. thermophilus* 160 et *L. bulgaricus* 36 et l'autre *S. thermophilus* 388 et *L. bulgaricus* 36.
Inoculum : 1 p. 100 de chaque souche pour chaque culture mixte. Incubation à 44° C.

- a : ○—○ *S. thermophilus* 160.
●—● *S. thermophilus* 388.
△—△ } *L. bulgaricus* 36.
▲—▲ }
- b et c : ○—○ culture mixte 160 + 36.
●—● culture mixte 388 + 36.

les courbes d'acidification obtenues avec chacune des deux cultures mixtes 160 + 36 ou 388 + 36 sont très voisines (fig. 7 c), ce qui confirme le rôle prépondérant joué par le lactobacille dans l'acidification.

Pour maintenir, au cours des repiquages successifs, un équilibre voisin de 1 entre streptocoques et lactobacilles dans une culture mixte contenant *L. bulgaricus* 36, il importe d'incuber ces cultures pendant un temps plus long que celles qui contiennent *L. bulgaricus* 369. Nous avons par exemple vérifié qu'une incubation de 7 h à 44° C était nécessaire.

Réfrigération et conservation au froid des cultures incubées

Lorsqu'on refroidit des cultures mixtes ayant atteint 90° D à 100° D et qu'on conserve ces cultures à basse température, on observe schématiquement trois types de comportement (fig. 8) :

1. Dans le cas d'associations telles que 369 + 160 (fig. 8 a), la vitesse de refroidissement des cultures n'exerce qu'une influence

fig. 8

Evolution de l'acidité dans trois cultures mixtes, au cours de la conservation au froid.

- Refroidissement lent et conservation à 14° C.
- △—△ Refroidissement rapide et conservation à 14° C.
- Refroidissement lent et conservation à 8° C.
- ▲—▲ Refroidissement rapide et conservation à 8° C.
- Refroidissement rapide et conservation à 0° C.
- Refroidissement rapide et conservation à -30° C.

a : *S. thermophilus* 160 + *L. bulgaricus* 369.

b : *S. thermophilus* 391 + *L. bulgaricus* 394.

c : *S. thermophilus* 160 + *L. bulgaricus* 36.

limitée, qui se traduit par un léger décalage, s'il existe, entre les deux courbes d'acidification correspondantes, au cours de la conservation au froid.

Lorsque la température de conservation est relativement élevée (14° C), l'acidification est importante puisque l'acidité acquise est de 50° D à 60° D en 12 j. A 8° C, l'acidification est encore importante puisque l'acidité acquise en 12 j est de 25° D à 30° D. A 0° C l'acidification est pratiquement arrêtée ou est très lente. A -30° C, elle est nulle.

Ce comportement est fréquent parmi les cultures mixtes. Il résulte de l'emploi de cultures mixtes suffisamment actives, composées de deux germes qui ont atteint leur développement maximum lorsqu'on refroidit les cultures.

2. Dans le cas d'associations telles que 394 + 391, on n'observe pas non plus d'influence prépondérante de la vitesse de refroidissement (fig. 8 b).

A 14° C, l'acidification est encore importante, parfois même comparable à celle des associations précédentes mais à 8° C, la montée de l'acidité est notablement plus lente que dans le cas précédent (elle est de l'ordre de 10° D à 15° D).

3. Dans le cas d'associations telles que 36 + 160, dont le lactobacille est une souche qui se développe et acidifie relativement lentement, on observe cette fois (fig. 8 c) une influence de la vitesse de refroidissement. Lorsque le refroidissement est rapide, l'acidification au cours de la conservation, à 14° C comme à 8° C, est beaucoup plus limitée que lorsque le refroidissement est effectué lentement.

DISCUSSION

On cite souvent les associations de *S. thermophilus* avec divers lactobacilles, cultivés sur lait, comme de bons exemples de cultures mixtes où chaque souche tire bénéfice de l'association. Henneberg, dès 1926, évoquait l'existence d'une « symbiose facile à réaliser » entre streptocoques et lactobacilles du yoghourt [18]. Les recherches poursuivies dans ce domaine ont montré que divers lactobacilles, en particulier *L. bulgaricus*, exercent un effet stimulant marqué sur le développement et sur l'activité acidifiante de *S. thermophilus*, effet stimulant qui résulte vraisemblablement de l'action protéolytique du lactobacille. Pette et Lolkema [30] ont montré que l'addition, suivant la saison, de six à onze acides aminés au lait (en particulier l'addition de valine) permettait d'obtenir un effet stimulant comparable à celui de *L. bulgaricus* sur *S. thermophilus*. Bautista *et al.* [5] ont isolé des filtrats de culture sur lait de *L. bulgaricus*, deux acides aminés, la glycine et l'histidine qui stimulaient *S. thermophilus*. Plus récemment, Accolas *et al.* [1] ont observé une stimulation de la production d'acide de différentes souches de *S. thermophilus*, lorsqu'ils ajoutaient au lait une combinaison de trois acides aminés, leucine-isoleucine-valine pour une souche et leucine-valine-histidine pour trois souches. Il a été montré que *S. thermophilus* est stimulé, en culture sur lait, par l'addition de peptides exogènes de poids moléculaires variés [11, 12], et que ce streptocoque peut, grâce à ses peptide-hydrolases, utiliser ces peptides comme source générale d'acides aminés ou comme source préférentielle d'histidine, dans le cas de courts peptides à histidine en position NH₂-terminale [13]. Enfin, il est connu que la teneur du lait en azote dialysable (en particulier en acides aminés) augmente notablement, après culture des lactobacilles thermophiles [23] et Tourneur [43] a montré que les broyats cellulaires de lactobacilles thermophiles hydrolysaient les caséines et libéraient des acides aminés.

D'autre part, des chercheurs néerlandais [15] ont mis en évidence une stimulation de *L. bulgaricus* par *S. thermophilus*, et ont attribué

cette stimulation à la production d'acide formique par le streptocoque [47]. De même, trois des quatre souches de *S. thermophilus* étudiées par Accolas *et al.* [1] stimulaient de façon notable la production d'acide de différentes souches de *L. bulgaricus* et d'une espèce voisine, *L. lactis*.

On dispose donc, à l'heure actuelle, de tout un ensemble de données solides sur les facteurs responsables de la synergie qui se manifeste lorsque *S. thermophilus* et certains lactobacilles thermophiles sont cultivés ensemble dans du lait, encore que l'on ignore à peu près tout des mécanismes intimes qui régissent ces interactions. Dans ce domaine, on doit en outre se garder de toute généralisation hâtive. En effet, la synergie bactérienne est plus ou moins nette, pour certaines cultures mixtes, selon la température d'incubation, comme nous l'avons montré au début de ce travail. La synergie peut être apparemment absente et l'association se comporter cependant comme une culture très active ; c'est, nous l'avons vu, le cas de la culture mixte *S. thermophilus* 385 + *L. bulgaricus* 384. Enfin, s'il existe des interactions synergiques, cela ne suffit pas toujours pour obtenir des cultures mixtes très actives. On peut donc s'attendre à des variations relativement importantes, suivant les souches étudiées. Ainsi, une étude de Moon et Reinbold [26] portant sur 252 cultures mixtes combinant deux à deux 21 souches de *S. thermophilus* et 12 souches de *L. bulgaricus*, leur a permis d'observer des variations notables de comportement d'une association à l'autre, variations qui sont pleines de signification en pratique puisqu'elles peuvent entraîner des différences supérieures à 2 h dans le temps mis par le lait à coaguler. Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié plus en détail le comportement de l'une des cultures mixtes où se manifestait un effet synergique [27]. Ils ont ainsi montré que la souche de *S. thermophilus* était stimulée par la souche de *L. bulgaricus* et que, dans ces conditions, l'aptitude compétitive du streptocoque était telle que le lactobacille se développait moins activement en culture mixte qu'en culture pure.

Il convient donc d'accorder, en pratique, une attention toute particulière à la sélection des cultures mixtes quant à leurs propriétés acidifiantes. La comparaison de différentes cultures mixtes en fabrication de yoghourt, illustre bien cette nécessité [46].

Cela dit, nous avons vu qu'il est très possible de maintenir au voisinage de 1 le rapport entre les streptocoques et les lactobacilles d'une culture mixte et d'obtenir, dès la première culture et d'un repiquage au suivant, une production d'acide rapide et régulière. En outre, il est loisible de penser que des cultures mixtes stables et actives, telles que l'association de *L. bulgaricus* 369 avec *S. thermophilus* 160 peuvent aisément se prêter à un procédé de fabrication continue du yoghourt. En définitive, avec ce type d'association, on peut indifféremment, en pratique, soit entretenir une culture mixte, soit entretenir les cultures pures de *S. thermophilus* et de *L. bulga-*

ricus et n'associer celles-ci qu'au moment de l'ensemencement du levain destiné à la fabrication des yoghourts. Toutefois, cette règle n'a pas de valeur générale. En effet, comme le suggère l'étude de Puhán et Banhegyi [37] portant sur deux cultures mixtes, l'obtention d'une culture mixte stable peut requérir parfois une dizaine de repiquages préalables. Différentes associations ne peuvent donc pas être traitées, en toute sécurité, de façon identique. Suivant les souches composantes, on aura affaire à des cultures mixtes plus ou moins actives et stables.

De plus, on ne doit jamais oublier qu'il est relativement facile, au cours des repiquages, de rompre l'équilibre d'une culture mixte et de perdre l'une des espèces constituant l'association [34]. Cette particularité peut d'ailleurs être mise à profit pour séparer les streptocoques des lactobacilles, en jouant sur les températures et les durées d'incubation [24].

En résumé le maintien de l'équilibre entre streptocoques et lactobacilles, la production d'acide et d'arôme de la culture mixte dépendent du choix des souches, de l'ajustement de l'inoculum, du temps et de la température d'incubation [34] et éventuellement, du nombre de repiquages [37].

Pour se mettre à l'abri de variations aléatoires, il est bon de recourir, avec une périodicité régulière, à une réserve de cultures pures conservées à l'état congelé ou à l'état lyophilisé. Dans la même optique, l'emploi de suspensions concentrées congelées de bactéries lactiques du yoghourt, en remplacement de l'entretien traditionnel des cultures au laboratoire de l'usine, représente une solution de choix [4]. Il en sera peut-être de même, dans l'avenir, des suspensions lyophilisées [41] ou séchées [35]. Enfin, le développement de ces bactéries et la production concomitante d'acide dépendent, pour une part essentielle, de la qualité du lait utilisé et du traitement thermique que ce lait a subi [3, 45].

Il serait tentant, pour l'industrie, de sélectionner un très petit nombre de cultures mixtes *ad hoc*. Toutefois le risque d'attaques de bactériophages ne doit pas être ignoré. Si les attaques de bactériophages semblent moins fréquentes que dans le cas des streptocoques lactiques mésophiles, elles existent néanmoins comme l'ont montré différents auteurs [8, 9, 16, 33, 38]. Nous-mêmes, avons eu l'occasion de mettre en évidence des phages qui attaquaient une souche de *S. thermophilus* et qui créaient ainsi de sérieuses perturbations dans la fabrication de yoghourts d'un atelier de la région parisienne [2].

En ce qui concerne le problème de la conservation au froid des yoghourts, il n'existe pas de solution simple et sûre. Pour maintenir l'acidité du yoghourt au niveau recherché, il n'est pas suffisant, avec la plupart des cultures employées, de refroidir rapidement le yoghourt dans la zone des températures utilisées commercialement à l'heure

actuelle, c'est-à-dire au voisinage de 8° C, et de les conserver à cette température. La plupart des cultures mixtes sont en effet capables de poursuivre l'acidification à basse température. Cela est conforme à la relation établie par Luedeking et Piret [21] et vérifiée par d'autres auteurs [6, 14]. Ces différents travaux ont montré que de nombreuses bactéries lactiques, lorsqu'elles ont atteint la phase stationnaire de croissance, sont encore capables de produire beaucoup d'acide. A ce stade de la culture, il existe en effet une population élevée de cellules bactériennes qui continuent, plus ou moins rapidement suivant la température, à transformer le lactose en acide lactique, et cela bien que la croissance ait cessé. Pour arrêter la montée de l'acidité, il conviendrait donc, avec la plupart des cultures mixtes utilisées, non seulement de refroidir les yoghourts rapidement mais aussi et surtout de les conserver à une température voisine de 0° C. Si l'accord est général sur ce point, il n'en reste pas moins que cette solution est relativement coûteuse et risque pour cette raison de ne trouver que peu d'échos à l'échelle industrielle et commerciale.

Il serait bien entendu possible de refroidir des yoghourts peu acides [20]. Si on arrive de cette façon à « anticiper » la montée de l'acidité au cours de la conservation au froid, on risque de se heurter à d'autres difficultés résultant d'une acidification insuffisante, par exemple une texture et une consistance trop fragiles ou un arôme insuffisamment développé. De plus, on ne doit pas oublier l'aspect légal qui impose, en France, une quantité d'acide lactique libre au moins égale à 0,8 g pour 100 g lors de la mise en vente du yoghourt.

Un autre moyen consisterait à utiliser des cultures mixtes dont le pouvoir acidifiant soit très réduit à basse température, par exemple au-dessous de 10° C. De telles cultures existent et on verra par ailleurs qu'elles se comportent bien de cette façon en fabrication de yoghourt [46] mais ces cultures se caractérisent par la présence d'une souche de lactobacille qui se développe et acidifie lentement. On a donc affaire dans ce cas à une culture mixte moins active, qui oblige le fabricant à utiliser des inoculats plus importants et des temps d'incubation prolongés. Ces caractéristiques conduisent généralement les praticiens à éliminer de telles cultures et à leur préférer des associations plus actives, moins délicates à manipuler dans les conditions de fabrication de l'industrie laitière française.

Remerciements

Les auteurs expriment leur vive reconnaissance à MM. Auclair, Mocquot et Vassal pour leurs suggestions et leurs critiques, qui leur ont été très utiles tant dans la réalisation que dans la rédaction de ce travail.

Résumé

Le travail entrepris avait pour objectif d'étudier les propriétés acidifiantes de différentes souches de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus*, en culture pure ou en mélange, afin de sélectionner les cultures les plus convenables pour la fabrication du yoghourt. Ce travail se divise en trois parties :

1. Etude des variations de la production d'acide dans du lait, en fonction de la température d'incubation (entre 35° C et 50° C).
2. Etude de la stabilité des cultures mixtes : évolution du rapport entre le nombre de streptocoques et le nombre de lactobacilles, et de la production d'acide, au cours de l'incubation et au cours des repiquages. Influence de l'âge ou de la composition de l'inoculum.
3. Etude de la conservation au froid des cultures mixtes, après incubation : évolution de la production d'acide en fonction de la vitesse de réfrigération et de la température de conservation (14° C, 8° C, 0° C).

Les résultats obtenus mettent en évidence des variations notables de comportement d'une culture mixte à une autre. Ces résultats sont discutés dans l'optique de l'utilisation des cultures de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* en fabrication industrielle de yoghourt.

Summary

The acid producing properties of various strains of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* have been studied in pure and mixed cultures so as to select the strains most suitable for yoghurt making.

1. This study showed considerable variations from one strain to another in the acid production in milk in relation to temperature (between 35° C and 50° C). The acid production of a mixed culture of *S. thermophilus* with a strain of *Lactobacillus* was always higher than that of the corresponding pure cultures, although this does not always implied a stimulation of the acid production.
2. The composition of certain mixtures studied was particularly stable during subculturing, with an equal number of streptococci and lactobacilli, even when the cultures were started with a very unbalanced proportion of these two organisms.
3. When the yoghurts were stored in the cold, the acid production varied from one mixed culture to another in relation to the storage temperature.

The results are discussed with a view to the use of these cultures in the yoghurt industry.

Reçu pour publication en décembre 1976.

Bibliographie

- [1] ACCOLAS (J. P.), VEAUX (M.) et AUCLAIR (J.) (1971). — Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 51, 249-272.
- [2] ACCOLAS (J. P.) (1973). — Résultats non publiés.
- [3] AUCLAIR (J.) (1964). — Les substances antibactériennes du lait cru et leur rôle en technologie laitière. *4th International Symposium on Food Microbiology*, SIK, Göteborg (Suède), 281-296.
- [4] AUCLAIR (J.) et MOCOQUOT (G.) (1974). — Cultured milks, in *Milk products in the future*, 33-36, J. Rothwell (Ed.), Society of Dairy Technology, UK.
- [5] BAUTISTA (E. S.), DAHIYA (R. S.) and SPECK (M. L.) (1966). — Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. *J. Dairy Res.*, 33, 289-307.
- [6] BERGÈRE (J. L.) et HERMIER (J.) (1968). — La production massive de cellules de streptocoques lactiques. II. Croissance de *Streptococcus lactis* dans un milieu à pH constant. *Le Lait*, 48, 13-30.
- [7] CHANDAN (R. C.), GORDON (J. F.) and WALKER (D. A.) (1969). — Dairy fermentation processes. *Process Biochemistry*, 4, 13-22.
- [8] CHEVALIER (R.). — Cité par MOCOQUOT (G.) et HUREL (C.) (1970).
- [9] CIBLIS (E.) (1970). — Characterization of a bacteriophage of *Streptococcus thermophilus*. *Zbl. Bakt., Abt., II*, 125, 541-554.
- [10] DAVIS (J. G.) (1975). — The microbiology of yoghurt, in *Lactic acid bacteria in beverages and foods*, 245-263, Academic Press, Londres.
- [11] DESMAZEAUD (M. J.) et DEVOYOD (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique des substances stimulantes. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, 10, 413-430.
- [12] DESMAZEAUD (M. J.) et HERMIER (J.) (1972). — Isolement et détermination de la composition qualitative de peptides issus de la caséine, stimulant la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, 28, 190-198.
- [13] DESMAZEAUD (M. J.) et HERMIER (J.) (1973). — Effet de fragments peptidiques du glucagon vis-à-vis de la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie*, 55, 679-684.
- [14] FRIEDMAN (M. R.) and GADEN (E. L.) (1970). — Growth and acid production by *Lactobacillus (L.) delbrueckii* in a dialysis culture system. *Biotech. Bioeng.*, 12, 961-974.
- [15] GALESLOOT (T. E.), HASSING (F.) and VERINGA (H. A.) (1968). — Symbiosis in yoghurt. I. Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 22, 50-63.
- [16] GÉLIN (M.), WURCH (T.) et LINDER (R.) (1970). — Mise en évidence d'un bactériophage du *Streptococcus thermophilus*, cause d'un accident de fermentation du yoghourt. *C.R. Acad. Sc., Paris*, 270 D, 425-427.
- [17] HAMDAN (I. Y.), KUNSMAN (J. E.) and DEANE (D. D.) (1971). — Acetaldehyde production by combined yoghurt cultures. *J. Dairy Sci.*, 54, 1080-1082.
- [18] HENNEBERG (1926). *Handbuch der Garungsbakteriologie*, Zw. Auflage. Zw. Band, *Spezielle Pilzkunde*, p. 140, P. Parey (Ed.), Berlin.
- [19] HUMPHREYS (C. L.) and PLUNKETT (M.) (1969). — Yoghurt : a review of its manufacture. *Dairy Sci. Abstr.*, 31, 607-622.
- [20] LACROSSE (R.) (1972). — Evolution de l'acidité dans les yoghourts conservés à diverses températures. *Revue de l'Agriculture*, 25, 383-386.

- [21] LUEDEKING (R.) and PIRET (E. L.) (1959). — A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Techn. Eng.*, 1, 393-412.
- [22] MANN (E. J.) (1973). — Yoghurt. Parts 1, 2 and 3. *Dairy Industries*, 38, 386-387, 432-433 and 476-477.
- [23] MILLER (I.) und KANDLER (O.) (1967). — Eiweissabbau und Anreicherung freier Aminosäuren durch Milchsäurebakterien in Milch. II. Die Anreicherung freier Aminosäuren durch Thermobakterien. *Milchwissensch.*, 22, 469-480.
- [24] MOCOQUOT (G.), ACCOLAS (J. P.) et MOURGUES (R.) (1961). — Etude sur un lait fermenté soi-disant à base de *Lactobacillus acidophilus* et de *Streptococcus lactis* « taette » (Bioghurt). *Industrie Laitière*, n° 179, 242-245.
- [25] MOCOQUOT (G.) and HUREL (C.) (1970). — The selection and use of some micro-organisms for the manufacture of fermented and acidified milk products. *J. Soc. Dairy Technol.*, 23, 130-146.
- [26] MOON (N. J.) and REINBOLD (G. W.) (1974). — Selection of active and compatible starters for yoghurt. *Cult. Dairy Products J.*, 9, 10-12.
- [27] MOON (N. J.) and REINBOLD (G. W.) (1976). — Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *J. Milk Food Technol.*, 39, 337-341.
- [28] OTTOGALLI (G.) (1972). — La microflora dei lattii fermentati con particolare riguardo allo yoghurt. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 23, 71-79.
- [29] PETTE (J. W.) and LOKEMA (H.) (1950). Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lb. bulgaricus* and *Sc. thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 4, 197-208.
- [30] PETTE (J. W.) and LOKEMA (H.) (1950). — Growth stimulating factors for *Sc. thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 4, 209-224.
- [31] PETTE (J. W.) and LOKEMA (H.) (1950). — Acid production and aroma formation in yoghurt. *Neth. Milk Dairy J.*, 4, 261-273.
- [32] PETTE (J. W.) and LOKEMA (H.) (1951). — Factors influencing the proportion of streptococci and lactobacilli in a yoghurt culture. *Neth. Milk Dairy J.*, 5, 14-26.
- [33] PETTE (J. W.) and KOOY (J. S.) (1952). — Bacteriophages in yoghurt. *Neth. Milk Dairy J.*, 6, 233-241.
- [34] PETTE (J. W.) (1957). — Joghurt und seine Probleme. *Kieler Milchwirt. Forschungs.*, 9, 177-190.
- [35] PORUBCAN (R. S.) and SELLERS (R. L.) (1975). — Spray drying of yoghurt and related cultures. *J. Dairy Sci.*, 58, 787.
- [36] PUHAN (Z.) (Ed.) (1973). — *Sauermilchprodukte*, 100 p., Eidg. Technische Hochschule, Zürich (Suisse).
- [37] PUHAN (Z.) and BANHEGYI (M.) (1974). — Effect of incubation temperature on the ratio of *Lactobacillus bulgaricus* to *Streptococcus thermophilus* in yoghurt. *Schweizerische Milchwirt. Forschung*, 3, 9-13.
- [38] REINBOLD (G. W.) and REDDY (M. S.) (1973). — Bacteriophage for *Streptococcus thermophilus*. *Dairy Industries*, 38, 413-416.
- [39] ROBINSON (R. K.) and TAMINE (A. Y.) (1975). — Yoghurt. A review of the product and its manufacture. *J. Soc. Dairy Technol.*, 28, 149-163.
- [40] ROGOSA (M.) (1974). — Genus *Lactobacillus*, in *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 576-593.
- [41] SPECKMAN (C. A.), SANDINE (W. E.) and ELLIKER (P. R.) (1974). — Direct inoculation of milk with lyophilized starter concentrates for yoghurt production. *J. Dairy Sci.*, 57, 582.

-
- [42] *Standard methods for the examination of dairy products* (1972), 13th edition, 158-175, Walter, W. G. (Ed.), American Public Health Association, Washington DC (Etats-Unis).
- [43] TOURNEUR (C.) (1974). — Les caractères de l'activité protéolytique des lactobacilles. *XIX^e Congr. Int. Laiterie*, 1 F, 398-399.
- [44] TRAMER (J.) (1973). — Yoghurt cultures. *J. Soc. Dairy Technol.*, 26, 16-21.
- [45] VASSAL (L.) et AUCLAIR (J.) (1966). — Variations de la production d'acide par les bactéries du yoghourt dans les laits de grand mélange. *XVII^e Congr. Int. Laiterie*, E/F, 669-676.
- [46] VASSAL (L.) et DIDIENNE (R.) (1977). — Importance du choix des souches et du mode de préparation des levains en fabrication du yoghourt. En préparation.
- [47] VERINGA (H. A.), GALESLOOT (T. E.) and DAVELAAR (H.) (1968). — Symbiosis in Yoghurt. II. Isolation and identification of a growth factor for *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, 22, 114-120.
-