**Etude comparative du comportement de
Streptococcus lactis, *Streptococcus thermophilus*
et *Lactobacillus bulgaricus*
dans des laits et des rétentats pasteurisés
après stockage à l'état cru à basse température**

par

A. TAYFOUR, J. B. MILLIERE, Louise VEILLET-PONCET*

Suite à nos travaux concernant la réfrigération de laits et de rétentats crus [48, 50], nous analysons, en vue de leur utilisation en fromagerie, l'incidence des conditions de stockage et des traitements de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance et la production d'acide lactique des principales bactéries lactiques, *S. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

Après avoir éliminé les échantillons qui contiennent après stockage plus de 1.10^8 bactéries par ml et qui peuvent être à l'origine d'accidents en fromagerie, ainsi que ceux trop faiblement contaminés, possédant moins de 1.10^5 bactéries par ml, nous conservons pour le traitement de pasteurisation les laits et les rétentats stockés pendant 24 et 48 heures à 12° C, 48 et 72 heures à 7° C et 72 heures et 96 heures à 4° C.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. Les échantillons

Les laits et les rétentats crus, retenus dans notre étude, sont schématiquement rapportés dans la figure 1. Chaque échantillon, réparti à raison de 200 ml en fiole Erlenmeyer stérile, est pasteurisé en régime turbulent dans un bain d'eau thermostatée à 75° C pendant 30 s, puis énergiquement refroidi dans un bain d'eau glacée.

* Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, E.N.S.A.I.A. - I.N.P.L., 32, rue Sainte-Catherine, 54000 Nancy.

1.2.1. *Dénombrements de la flore aérobie mésophile (F.A.M.) et des bactéries lactiques*

La numération de la flore aérobie mésophile est réalisée après ensemencement de plaques de tryptone-agar de la Fédération Internationale de Laiterie, incubées à 30° C pendant 72 heures. Le dénombrement des streptocoques est effectué sur milieu de Elliker [17] après 72 heures d'incubation à 30° C pour *S. lactis* et 37° C pour *S. thermophilus* et celui de l'espèce *L. bulgaricus*, sur milieu gélosé (Man, Rogosa, Sharpe), après 72 heures d'incubation en atmosphère enrichie en anhydride carbonique, à la température de 37° C.

1.2.2. *Mesures du pH et de l'acidité titrable*

La mesure du pH est effectuée à l'aide d'un pH-mètre Tacussel, avec une précision de $\pm 0,01$ unité pH. La détermination de l'acidité titrable, exprimée en grammes d'acide lactique pour 100 g de lait ou de rétentat est obtenue par titration de 10 g de la culture avec de la soude Dornic (N/9), jusqu'au point de consigne fixé à pH 8,5 (méthode du pH-stat).

Afin d'éliminer les écarts entre les acidités à l'origine des différents échantillons de lait et de rétentat, nous déterminons la quantité d'acide lactique élaborée après diverses durées d'incubation.

Dans le calcul du facteur de stimulation de la production d'acide lactique,

$$\frac{\text{Quantité ac. lactique développée dans le lait (ou le rétentat)}}{\text{Quantité ac. lactique développée dans le lait (ou le rétentat) témoin}} \times 100$$

nous prendrons comme échantillons témoins le lait et le rétentat pasteurisés, non préalablement stockés (L_2 et R_2). La valeur de ce facteur, supérieure ou inférieure à 100, traduit une stimulation ou une inhibition de la production d'acide lactique.

1.2.3. *Analyse statistique des résultats*

L'analyse de la variance (test F) et le test de la plus petite différence significative (P.P.D._s) avec un seuil de confiance de 0,05 sont utilisés pour comparer les moyennes des quantités d'acide lactique produites.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. *Evaluation de la contamination bactérienne des échantillons avant pasteurisation et de la flore bactérienne résiduelle après pasteurisation.*

Les échantillons de lait et de rétentat crus possèdent, après différents barèmes de stockage, des niveaux de population en bactéries aérobies mésophiles compris respectivement entre 9.10^5 et $3,7.10^7$ bactéries

par ml et entre $2,5 \cdot 10^6$ et $5,4 \cdot 10^7$ bactéries par ml, tandis que les échantillons de lait et de rétentat, non préalablement stockés, contiennent à l'origine $6,7 \cdot 10^4$ et $1,3 \cdot 10^6$ bactéries par ml (tableau 1).

TABLEAU 1

Moyenne des dénombrements bactériens des 12 échantillons étudiés et valeurs de l'efficacité de la pasteurisation

Conditions de stockage		Echantillon	Nombre de bactéries par ml		Efficacité de la pasteurisation (log N/No)
			Avant pasteurisation (No)	Après pasteurisation (N)	
Non stocké		Lait (L_2)	$6,7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^2$	— 2,3
		Rétentat (R_2)	$1,3 \cdot 10^6$	$9,3 \cdot 10^2$	— 3,1
12° C	24 h	Lait (L_3)	$2 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^2$	— 3,7
		Rétentat (R_3)	$1,5 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^3$	— 3,5
	48 h	Lait (L_4)	$3,7 \cdot 10^7$	$4,6 \cdot 10^2$	— 4,9
		Rétentat (R_4)	$5,4 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^3$	— 3,8
7° C	48 h	Lait (L_5)	$1,3 \cdot 10^6$	$3,5 \cdot 10^2$	— 3,6
		Rétentat (R_5)	$2,9 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^3$	— 3,4
	72 h	Lait (L_6)	$9,3 \cdot 10^6$	$4,9 \cdot 10^2$	— 4,3
		Rétentat (R_6)	$1,1 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^3$	— 3,8
4° C	72 h	Lait (L_7)	$9 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^2$	— 3,4
		Rétentat (R_7)	$2,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^3$	— 3,4
	96 h	Lait (L_8)	$2 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^2$	— 3,8
		Rétentat (R_8)	$5,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^3$	— 3,7

Malgré des taux de contamination très variables, les niveaux de population, après pasteurisation à 75° C pendant 30 s, sont sensiblement identiques et compris entre $3 \cdot 10^2$ et $4,9 \cdot 10^2$ bactéries par ml dans les laits et entre $9,3 \cdot 10^2$ et $7,8 \cdot 10^3$ bactéries par ml dans les rétentats.

L'efficacité de la pasteurisation varie entre — 2,3 (99,55 p. 100 de bactéries détruites), pour le lait cru non stocké, et — 4,9 (99,99 p. 100) pour le lait cru stocké pendant 48 heures à 12° C, échantillon le plus contaminé.

En ce qui concerne les rétentats, ce paramètre varie dans des proportions moindres, entre — 3,1 (99,93 p. 100) pour le rétentat non stocké et — 3,8 (99,99 p. 100) pour celui stocké pendant 48 h à 12° C.

Les valeurs très élevées de destruction de la flore contaminante sont en relation avec une proportion importante, en fin de stockage, de bactéries psychrotrophes, et plus particulièrement de *P. fluorescens*, espèce caséolytique dominante qui est très rapidement détruite par des traitements thermiques peu sévères [28].

D'une manière générale, nous constatons, comme d'autres auteurs, que l'efficacité de la pasteurisation augmente avec le taux de contamination initiale [34], mais qu'elle est sensiblement plus faible, dans le rétentat, en raison du rôle protecteur joué par la matière sèche [44]. D'autres facteurs modifient également ce paramètre, notamment la nature des espèces contaminantes [35] et les températures de culture appliquées avant le traitement thermique [49]. La pasteurisation a un effet létal sur les entérobactéries, les bactéries pathogènes en général [31] et sur toutes les bactéries psychrotrophes, à l'exclusion des espèces sporulées, très rares [43].

Nous considérons que la flore résiduelle après pasteurisation, bien qu'essentiellement constituée d'espèces thermophiles, thermorésistantes et sporulées, ne modifie pas, en raison de son très faible nombre, la croissance des trois souches lactiques retenues, puisqu'elle ne représente que 0,02 à 0,05 p. 100 et 0,07 à 0,7 p. 100 de l'ensemencement en bactéries lactiques, respectivement dans les laits et dans les rétentats; de plus, l'incubation des cultures est réalisée à la température optimale de développement de chacune des espèces lactiques.

2.2. Comportement de *S. lactis* 144 CNRZ

2.2.1. Croissance

Malgré des taux d'ensemencement en bactéries lactiques identiques dans tous nos échantillons (environ $1,2 \cdot 10^8$ bactéries par ml), les niveaux de population bactérienne sont sensiblement moins importants dans tous les laits que dans les rétentats, puisqu'après 6 h 30 d'incubation, les numérations varient respectivement entre $3,1 \cdot 10^8$ et $4,1 \cdot 10^8$ bactéries par ml et entre $4,7 \cdot 10^8$ et $6,9 \cdot 10^8$ bactéries par ml (fig. 2).

La similitude des allures des courbes de croissance, aussi bien dans le rétentat que dans le lait, traduit l'absence de stimulation de la souche *S. lactis* 144 CNRZ, malgré des barèmes de stockage différents.

fig. 2

Croissance de *Streptococcus lactis* dans les laits (--) et les rétentats (—) étudiés.

fig. 3

Production d'acide lactique par *Streptococcus lactis* dans les laits (--) et les rétentats (—) étudiés.

2.2.2. Production d'acide lactique

Les représentations graphiques des quantités d'acide lactique élaborées jusqu'à 8 heures d'incubation (fig. 3) montrent, en moyenne, une acidification sensiblement plus importante dans tous les échantillons de rétentat, comparativement aux échantillons de lait; ce résultat semble être en relation avec les taux de multiplication cellulaire, légèrement plus élevés dans les rétentats.

Dans ceux-ci, des écarts jusqu'à 0,12 p.100 d'acide lactique (12° D), après 8 heures de culture, permettent de calculer des différences significatives entre :

- le rétentat autoclavé et les rétentats stockés pendant 96 h à 4° C, 72 h à 4° C et 72 h à 7° C,
- le rétentat témoin et les rétentats stockés pendant 96 h à 4° C et 72 h à 4° C,
- les rétentats stockés pendant 24 h et 48 h à 12° C et celui stocké 96 h à 4° C.

En revanche, dans les laits, ce n'est seulement qu'après 8 heures de culture que l'on observe des différences significatives entre ceux stimulant faiblement (L_8 , L_5 , L_3 et L_7) et ceux qui ne stimulent pas (L_1) la production d'acide, avec un écart entre les niveaux d'acidification respectifs de seulement 3,5° D.

Le facteur de stimulation (tableau 2) confirme ces observations, puisque la production d'acide lactique est notable, après 6 h 30 et 8 h d'incubation, dans les rétentats R_8 , R_7 et R_6 , et dans les laits L_8 et L_5 .

TABLEAU 2

Facteurs de stimulation de la production d'acide lactique après 6 h 30 et 8 h de culture (lait et rétentat non stockés, pasteurisés = 100)

Conditions de stockage		Non stocké stéril.	24 h 12° C	48 h 12° C	48 h 7° C	72 h 7° C	72 h 4° C	96 h 4° C
Echantillon		(1)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
6 h 30 Incubation	Lait	100	110	101	112	103	105	121
	Rétentat	110	120	112	120	122	136	143
8 h Incubation	Lait	95	110	104	112	106	108	110
	Rétentat	95	111	111	114	120	125	134

2.2.3. Variations du pH

En raison d'un effet tampon plus important dans le rétentat que dans le lait, l'abaissement du pH est plus marqué dans les échantillons de lait (de 1,40 à 1,60 unité pH), que dans les rétentats (de 0,95 à 1,25 unité pH, et ce malgré une production accrue d'acide lactique dans les rétentats (fig. 4).

Covacevitch et Kosikowski [12] indiquent que cet effet tampon dû à la concentration sélective des micelles de phosphocaséinate de calcium, lors de l'ultrafiltration, croît exponentiellement avec l'augmentation de l'extrait sec total du rétentat ; c'est ainsi que pour un rétentat de 18,5 p. 100 d'extrait sec total, acidifié jusqu'à pH 5,1, ce pouvoir tampon est 7 fois plus grand que pour le lait écrémé d'origine.

Nos résultats concordent, en ce qui concerne les variations de pH, avec les productions d'acide lactique dans les différents substrats. Cependant, malgré des conditions de stockage variables, nous ne pouvons mettre en évidence de différences significatives dans les taux d'abaissement du pH.

S. lactis est une souche relativement insensible aux modifications d'ordre physico-chimique du lait ou du rétentat résultant de la croissance de la flore originelle pendant le stockage, ou provoquées par le traitement de stérilisation. Cette espèce n'est que très faiblement stimulée par la libération de substances de faible poids moléculaire, telles que peptides et acides aminés, lors du développement des bactéries psychrotrophes caséolytiques, observation qui est également rapportée dans les travaux de Devoyod et Desmazeaud [16].

2.3. Comportement de *S. thermophilus* 302 CNRZ

2.3.1. Croissance

Les courbes de croissance de l'espèce *S. thermophilus* (fig. 5) présentent, après seulement 4 heures de culture à 42° C, une phase stationnaire et des niveaux de population bactérienne en moyenne plus élevés dans les rétentats que dans les laits.

Dans ces derniers, après 4 heures d'incubation, les écarts maxima dans les dénombrements, entre $4,7 \cdot 10^7$ et $2,2 \cdot 10^8$ bactéries par ml, traduisent des taux de croissance variables. Cette stimulation de la croissance paraît être en étroite relation avec les taux de population en flore aérobie mésophile présents dans les laits en fin de stockage et avec l'intensité du traitement thermique. C'est ainsi que les laits les plus contaminés avant pasteurisation, stockés aux diverses températures pendant les durées les plus longues, 12° C pendant 48 heures ($5,4 \cdot 10^7$ bactéries par ml), 7° C pendant 72 heures ($1,1 \cdot 10^7$ bactéries par ml) et 4° C pendant 96 heures ($5,7 \cdot 10^6$ bactéries par ml), stimulent la croissance de *S. thermophilus* ; à l'inverse, les échantillons de lait contenant avant pasteurisation moins de 10^6 bactéries par ml se comportent comme le lait témoin.

fig. 4

Evolution de l'abaissement du pH dans les laits (--)
et les rétentats (—) ensemencés avec *Streptococcus lactis*

fig. 5

Croissance de *Streptococcus thermophilus* dans les laits (--)
et les rétentats (—) étudiés.

Les modifications physicochimiques du rétentat pendant la stérilisation, plus prononcées que dans le lait [39] provoquent une stimulation plus importante du développement de *S. thermophilus* que la libération de facteurs de croissance par des souches psychrotrophes et coliformes, et ce même lorsque les échantillons sont fortement contaminés. C'est ainsi que seul le rétentat autoclavé (R_1) stimule, dans des proportions notables, la croissance de *S. thermophilus*, puisqu'après 4 heures de culture, la population bactérienne est 4 à 5 fois plus importante que celle du rétentat pasteurisé (R_2), respectivement $7,2.10^8$ et $1,6.10^8$ bactéries par ml.

2.3.2. Production d'acide lactique

La production d'acide lactique dépend étroitement des niveaux de population bactérienne atteints au cours de la fermentation lactique ; elle est donc, en moyenne, plus élevée dans les rétentats que dans les laits (figure 6).

Après 4 heures de culture, nous calculons des différences significatives dans les quantités d'acide lactique élaborées, entre le lait initialement le plus contaminé L_4 et L_7 , L_5 , L_3 , L_8 et L_2 ; entre L_1 et L_7 , L_5 , L_3 , L_8 et entre L_6 et L_7 , L_5 .

fig. 6

Production d'acide lactique par *Streptococcus thermophilus* dans les laits (---) et les rétentats (—) étudiés.

Pour les rétentats, cette production est stimulée lorsque le rétentat est autoclavé et pour ceux qui sont préalablement stockés pendant 48 heures à 12° C et 72 heures à 7° C.

Après 3 heures d'incubation à 42° C, la valeur du facteur de stimulation (tableau 3) nous permet de classer les différents substrats en 2 groupes ; d'une part ceux qui stimulent la croissance et la production d'acide lactique, L₄, L₁, L₆, et R₁, R₄, R₆ et plus faiblement R₃ et R₈ et d'autre part ceux qui l'inhibent, comparativement aux témoins pasteurisés, tels que L₈, L₃, L₇, L₅ et R₅, R₇.

TABLEAU 3

Facteurs de stimulation de la production d'acide lactique par *S. thermophilus*, après 3 et 6 heures d'incubation.

Conditions de stockage		Non stocké stéril.	24 h 12° C	48 h 12° C	48 h 7° C	72 h 7° C	72 h 4° C	96 h 4° C
Echantillon		(1)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
3 heures Incubation	Lait Rétentat	183 261	61 137	226 228	54 88	187 189	56 81	81 127
6 heures Incubation	Lait Rétentat	140 165	95 115	179 149	88 102	140 115	96 115	100 118

Comparativement à l'échantillon témoin (L₂), la production moindre d'acide lactique ne se produit que dans les laits qui contiennent après stockage moins de 2.10⁶ bactéries par ml. Cette carence relative en facteurs de croissance semble donc être en relation avec une contamination plus faible en bactéries caséolytiques.

Lors de la stérilisation à 115° C pendant 10 min la dénaturation des rétentats se traduit par une stimulation accrue de la production d'acide lactique.

2.3.3. Abaissement du pH

Comme nous l'avons mentionné pour l'espèce *S. lactis*, l'abaissement du pH, plus important dans le lait que dans le rétentat, est en relation avec un pouvoir tampon plus élevé dans le rétentat

fig. 7

Evolution de l'abaissement du pH dans les laits (- -) et les rétentats (—) ensemencés avec *Streptococcus thermophilus*.

(fig. 7). Les valeurs obtenues confirment nos observations précédentes sur les variations dans les niveaux de production en acide lactique en fonction des conditions de stockage et de l'intensité du traitement thermique.

Lors de la stérilisation, l'abaissement sensible du pH, comparativement aux échantillons témoins, respectivement de 0,12 et 0,27 unité pH dans le lait et dans le rétentat, et la dénaturation plus marquée des protéines stimulant l'élaboration d'acide lactique par *S. thermophilus* provoquent la coagulation du rétentat et du lait autoclavés après seulement 3 h 45 et 4 h 15 de culture.

fig. 8

Croissance de *Lactobacillus bulgaricus* dans les laits (--) et les rétentats (—) étudiés.

3.3. Comportement de *L. bulgaricus* 369 CNRZ

3.3.1. Croissance

Les allures des courbes de croissance de *L. bulgaricus* (fig. 8) montrent que cette souche est très sensible aux modifications de la composition physicochimique du milieu de culture. Après seulement 3 heures d'incubation, en fin de phase exponentielle de croissance, les dénombrements bactériens compris entre $1,6 \cdot 10^7$ (L_7) et $1 \cdot 10^8$ (L_6) bactéries par ml, traduisent des écarts notables entre les différents laits.

Ces résultats sont analogues à ceux trouvés précédemment pour *S. thermophilus* ; le taux de croissance est fonction des barèmes de stockage retenus puisque les laits stockés pendant les durées les plus courtes, 24 heures à 12°C , 48 heures à 7°C et 72 heures à 4°C , se comportent comme le lait témoin, tandis que la croissance est stimulée dans les laits fortement contaminés stockés pendant 24 heures supplémentaires et dans le lait stérilisé.

De même, dans les rétentats, la croissance de *L. bulgaricus* présente une stimulation très importante dans l'échantillon autoclavé

fig. 9

Production d'acide lactique par *Lactobacillus bulgaricus* dans les laits (--) et les rétentats (—) étudiés.

comparativement à tous les autres, comme si les différents barèmes de stockage n'entraînaient que des modifications minimales de la composition des rétentats, comparativement au traitement de stérilisation.

3.3.2. Production d'acide lactique

La production d'acide lactique par *L. bulgaricus* est en relation avec les dénombrements observés après les différentes durées d'incubation (fig. 9); l'acidification est, en moyenne, plus intense dans les rétentats que dans les laits.

Les laits ayant les populations bactériennes les plus élevées après stockage, L_6 et L_4 , ainsi que le lait autoclavé, stimulent la production d'acide lactique et les écarts, dès 4 h 30 de culture, sont significatifs entre L_6 et L_7 , L_8 , L_2 , L_3 , L_5 , entre L_4 et L_7 et entre L_1 et L_7 .

Dans les rétentats, la stérilisation et le stockage pendant 48 h à 12° C stimulent la production d'acide lactique et dès 4 h 30 d'incubation, des différences significatives sont observées entre R_1 et R_7 , R_2 , R_8 , R_3 , R_6 et R_5 .

Les échantillons de lait et de rétentat stockés pendant les durées les plus courtes stimulent très faiblement ou pas la production d'acide lactique par *L. bulgaricus*.

TABLEAU 4

Facteurs de stimulation de la production d'acide lactique par *L. bulgaricus* après 3 et 6 heures d'incubation

Conditions de stockage		Non stocké stéril.	24 h 12° C	48 h 12° C	48 h 7° C	72 h 7° C	72 h 4° C	96 h 4° C
Echantillon		(1)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
3 heures Incubation	Lait	145	121	167	175	221	85	53
	Rétentat	228	134	146	118	130	99	101
6 heures Incubation	Lait	145	107	142	115	198	82	116
	Rétentat	151	117	127	124	116	95	110

3.3.3. Abaissement du pH

Les remarques relatives aux variations du pH dans les différents laits et rétentats sont analogues à celles déjà formulées pour les espèces *S. lactis* et *S. thermophilus*, comme le confirment les allures des courbes (fig. 10). La diminution du pH, lors de l'autoclavage à 115° C pendant 10 min, et la stimulation de l'activité bactérienne entraînent une coagulation après seulement 4 heures de culture dans le rétentat et 5 heures dans le lait.

DISCUSSION GENERALE

L'étude comparée des résultats concernant la croissance et la production d'acide lactique de *S. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* met en évidence les conditions de culture spécifique à chacune de ces espèces.

C'est ainsi que *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, souches thermophiles, donnent des réponses analogues, avec une stimulation notable de la croissance et de la production d'acide lactique dans le lait et le rétentat stérilisés pendant 10 min à 115° C, dans les laits stockés

fig. 10

Evolution de l'abaissement du pH dans les laits (--) et les rétentats (—) ensemencés avec *Lactobacillus bulgaricus*.

pendant 48 heures à 12° C et 72 heures à 7° C, échantillons les plus contaminés avant la pasteurisation.

Dans les rétentats, seul le rétentat autoclavé permet un développement important de ces 2 souches. Elles sont donc sensibles à de faibles modifications d'ordre physico-chimique du milieu de culture, contrairement à *S. lactis*.

Les substances responsables de la stimulation des bactéries lactiques thermophiles, sont soit élaborées au cours des différents barèmes de stockage par des espèces psychrotrophes et mésophiles protéolytiques [11, 16, 26, 30, 37, 38, 45], soit libérées dans le milieu

lors de traitements thermiques [20, 25]. Le développement des espèces psychrotrophes caséolytiques s'accompagne d'une protéolyse [13, 19, 29, 36] plus importante dans les laits que dans les rétentats concentrés 4 fois [22]. Si les caséines ne sont pas dégradées par des traitements à 100° C pendant plusieurs heures [2], les protéines du lactosérum sont partiellement dénaturées à des températures de 70 à 80° C [5] et cette action est d'autant plus notable que le substrat est plus concentré en protéines solubles [23, 39] et que le traitement thermique est plus sévère [33].

Les propriétés stimulantes de ces composés de nature peptidique [14, 18, 47, 51] sont fonction de leur masse molaire, de leur composition en acides aminés et de leur séquence, ainsi que de leurs teneurs en glucides et en phosphore [8].

Des études essentiellement réalisées sur l'espèce de *S. thermophilus*, souche extrêmement sensible [7, 8, 9, 15, 21, 32, 33] traduisent une stimulation prononcée lorsque le milieu de culture est enrichi en acides aminés et en peptides, dont la masse molaire est comprise entre 1 000 et 10 000 [15, 33].

Les exigences nutritionnelles en substances stimulantes sont variables d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce [41, 42]. *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont des souches très sensibles aux modifications du milieu de culture et leur stimulation réciproque, qui est une véritable symbiose, a été particulièrement étudiée dans la fabrication du yaourt [1, 6, 27].

Il existe également certaines souches de *Streptococcus lactis*, appelées « souches lentes », qui nécessitent, pour optimiser leur développement, l'addition au milieu de culture de facteurs de croissance [10] ; cependant l'action de ces substances vis-à-vis des cultures « bonnes acidifiantes » est moins marquée [3, 24, 46].

La souche *S. lactis* 144 CNRZ, qui élabore rapidement une quantité notable d'acide lactique, est donc peu sensible à l'action des substances stimulantes produites lors des traitements thermiques et des différents barèmes de stockage.

La stimulation importante des souches sensibles, par les échantillons autoclavés, semble être également en relation avec une dénaturation plus marquée des substances bactéricides et bactériostatiques du lait cru [4, 40].

Si l'on envisageait l'utilisation, en technologie fromagère, de rétentats stockés à des températures de 4, 7 ou 12° C pendant des durées s'échelonnant entre 24 et 96 heures, il serait intéressant de noter qu'après pasteurisation à 75° C pendant 30 s et ensemencement en bactéries lactiques, à un taux de 0,5 p. 100, seuls les échantillons de rétentat présentant, avant traitement thermique, des niveaux de population supérieure à 5.10^6 bactéries par ml, modifient la croissance et la production d'acide lactique des espèces thermophiles, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. La stérilisation à 115° C pendant

10 min d'un rétentat non stocké permet d'obtenir une stimulation plus prononcée de ces 2 espèces.

Compte tenu de la population bactérienne du rétentat cru, après ultra-filtration, et de la composition bactérienne de la flore contaminante, nous observons que des niveaux de population, en fin de stockage, inférieurs à $2,5.10^6$ bactéries par ml, ne modifient pas de manière significative le comportement des 3 souches étudiées.

Des barèmes de stockage de 24 heures à 12° C, 48 heures à 7° C et jusqu'à 96 heures à 4° C n'entraînent, dans nos conditions opératoires, aucune variation notable des paramètres technologiques.

Résumé

12 échantillons de lait et 12 échantillons de rétentats crus, contenant en moyenne $6,7.10^4$ et $1,3.10^6$ bactéries par ml, possèdent, après divers barèmes de stockage aux températures de 4,7 et 12° C pendant des durées s'échelonnant de 24 à 96 heures, des niveaux de population compris dans les laits, entre 9.10^5 et $3,7.10^7$ bactéries par ml, et dans les rétentats, entre $2,5.10^6$ et $5,4.10^7$ bactéries par ml.

Après pasteurisation à 75° C pendant 30 s, la population résiduelle varie, pour l'ensemble des échantillons entre $3,0.10^2$ et $7,8.10^3$ bactéries par ml, ce qui correspond à un taux de destruction moyen de la flore aérobie mésophile de 99,98 p. 100.

L'ensemencement de ces échantillons avec les espèces *S. lactis*, *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, à un taux de 0,5 p. 100, ainsi que l'ensemencement de laits et de rétentats, non préalablement stockés, pasteurisés ou stérilisés à 115° C pendant 10 min, permettent d'observer des niveaux de population et d'acidification variables selon les espèces, les conditions de stockage et l'intensité du traitement thermique.

Contrairement à *S. lactis* 144 CNRZ, souche relativement insensible aux modifications d'ordre physicochimique du milieu de culture, les espèces *S. thermophilus* 302 CNRZ et *L. bulgaricus* 369 CNRZ sont stimulées par des facteurs de croissance libérés lors de la croissance des bactéries caséolytiques pendant le stockage et lors de la stérilisation, par la dénaturation thermique limitée des protéines solubles.

La stimulation de la croissance et de la production d'acide lactique de *S. thermophilus* et de *L. bulgaricus* est plus importante dans les échantillons de lait que dans les échantillons de rétentat lorsqu'en fin de stockage les niveaux de population sont supérieurs à 5.10^6 bactéries par ml. La stérilisation du rétentat provoque une stimulation notable de la croissance de ces 2 espèces se traduisant par des niveaux d'acidification plus élevés, comparativement aux autres échantillons du rétentat.

Les barèmes de stockage qui limitent les niveaux de contamination en flore aérobic mésophile à moins de 5.10^6 bactéries par ml dans le lait et dans le rétentat, soit après 24 h à 12° C, 48 h à 7° C et jusqu'à 96 h à 4° C, ne modifient pas, de manière significative le comportement des principales espèces de bactéries lactiques qui constituent les levains de fromagerie.

Summary

COMPARATIVE STUDY OF THE COMPORTMENT OF «STREPTOCOCCUS LACTIS», «STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS» AND «LACTOBACILLUS BULGARICUS» IN PASTEURIZED MILKS AND RETENTATS, AFTER STORAGE AT LOW TEMPERATURE

After different storage conditions at 4,7 and 12° C for 24 to 96 hours, 12 samples of raw milk and 12 samples of raw retentate, containing $6.7.10^4$ and $1.3.10^6$ bacteria per ml on the average, had population levels included between 9.10^5 and $3.7.10^7$ bacteria per ml, respectively in milk and in retentate.

After pasteurization at 75° C for 30 s, the remaining population for all the samples varied between 3.10^2 and $7.8.10^3$ bacteria per ml, which corresponded to a mean destruction rate of 99,98 p. 100 for the mesophilic aerobic flora.

The inoculation of these samples with the species *S. lactis*, *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* at a rate of 0,5 p. 100, as the inoculation of milks and retentates not previously stored, pasteurized or sterilized at 115° C for 10 min., permitted observing population and acidification levels which varied, according to the species, the storage conditions and the intensity of the thermal treatment.

Contrary to *S. lactis* 144 CNRZ, a species relatively insensitive to modifications of the physicochemical characteristics of the cultivation substrate, the species *S. thermophilus* 302 CNRZ and *L. bulgaricus* 369 CNRZ were stimulated by growth factors released during the storage at the time of growth of the caseolytic bacteria and during sterilization by the limited thermal denaturation of the soluble proteins.

The stimulation of growth and of lactic acid production by *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* was higher in milk than in retentate samples when the population levels were higher than 5.10^6 bacteria per ml, at the end of the storage.

Retentate sterilization caused a notable stimulation of the growth of these two species with acidification levels higher compared to the retentate samples.

The storage conditions which limit contamination levels in mesophilic aerobic flora to less than 5.10^6 bacteria per ml in milk and retentate either, after 24 h at 12° C, 48 h at 7° C or up to 96 h at

4° C do not significantly modify the behaviour of the chief species of lactic bacteria which constitute the dairy starters.

Reçu pour publication en octobre 1980.

Bibliographie

- [1] ACCOLAS (J. P.), VEAUX (M.), AUCLAIR (J.) (1971). — Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles, en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 51, 249-272.
- [2] ALAIS (C.) (1975). — Science du lait. Principes des techniques laitières. 3^e éd., Paris, 807 p.
- [3] ANDERSON (A. W.), ELLIKER (P. R.) (1953). — The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. II. A stimulatory factor required for rapid growth of some strains in reconstituted non fat milk solids. *J. Dairy Sci.*, 36, 608-613.
- [4] AUCLAIR (J.) (1954). — Substances bactéricides et facteurs stimulant la croissance microbienne dans le lait. *Ind. Lait.*, 89, 40-42.
- [5] BLANC (B.) (1978). — Influence des procédés techniques sur la valeur hygiénique et nutritionnelle des produits laitiers. XX^e Congr. Int. Lait., conf. n° 20 ST.
- [6] BOTTAZZI (V.) (1978). — Yoghourt : Symbiose entre les deux espèces microbiennes spécifiques. XX^e Congr. Int. Lait., conf. n° 42 ST.
- [7] BRACQUART (P.), LORIENT (D.) (1977). — Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft*, 32, 4, 221-224.
- [8] BRACQUART (P.), LORIENT (D.), ALAIS (C.) (1978). — Effet des acides aminés et des petits peptides sur l'acidification du lait par *Streptococcus thermophilus*. XX^e Congr. Int. Lait., F, 519.
- [9] BRACQUART (P.), LORIENT (D.), ALAIS (C.) (1978). — Effet des acides aminés sur la croissance de *Streptococcus thermophilus*. II. Etude sur cinq souches. *Milchwissenschaft*, 33, 6, 341-344.
- [10] COUSIN (M. A.), MARTH (E. H.) (1977). — Lactic acid production by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. *J. Fd Protection*, 40, 6, 406-410.
- [11] COUSIN (M. A.), MARTH (E. M.) (1977). — Lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk precultured with psychrotrophic bacteria. *J. Fd Protection*, 40, 7, 475-479.
- [12] COVACEVICH (H. R.), KOSIKOWSKI (F. V.) (1979). — Buffer, lactic fermentation, and rennet coagulation properties of skim milk retentates produced by ultrafiltration. *J. Dairy Sci.*, 62, 2, 204-207.
- [13] DE BEUKELAR (N. J.), COUSIN (M. A.), BRADLEY (R. L.), MARTH (E. H.) (1977). — Modification of milk proteins by psychrotrophic bacteria. *J. Dairy Sci.*, 60, 6, 857-861.
- [14] DESMAZEAUD (M.), DEVOYOD (J. J.) (1970). — Action stimulante des microcoques caséolytiques sur les bactéries lactiques thermophiles. Mise en évidence de la nature peptidique de substances stimulantes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 10, 3, 412-430.
- [15] DESMAZEAUD (M.), HERMIER (J. H.) (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.
- [16] DEVOYOD (J. J.), DESMAZEAUD (M.) (1970). — Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. I. Action des entérocoques vis-à-vis des streptocoques lactiques et des leuconostoc. *Le Lait*, 50, 374-390.

- [17] ELLIKER (P. R.), ANDERSON (A. W.), HANNESSON (G.) (1956). — Agar medium for lactic bacteria. *J. Dairy Sci.*, 39, 1611-1615.
- [18] FEUILLAT (M.), DEMAÏMAY (J. C.), GAUDIN (P.), GRUDE, DUMARCHE (1972). — Importance de la protéolyse du lait sur la croissance des bactéries lactiques. Utilisation d'une souche de microcoque caséolytique en vue de la maturation et de la transformation du lait en fromagerie de gruyère. *Le Lait*, 52, 629-641.
- [19] FEUILLAT (M.), LE GUENNEC (S.), OLSSON (A.) (1976). — Contribution à l'étude de la protéolyse des laits réfrigérés et incidences sur le rendement d'une fabrication de fromages à pâte molle. *Le Lait*, 56, 521-536.
- [20] FOSTER (E. M.) (1952). — The effect of heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 35, 988-997.
- [21] FOX (E. N.) (1961). — Peptide requirements for the synthesis of streptococcal proteins. *J. Biol. Chem.*, 236, 166.
- [22] GARCIA-ORTIZ (R.) (1978). — Aspects physico-chimiques de la conservation au froid des rétentats obtenus par ultrafiltration de lait cru. D.E.A. *Science de l'Alimentation*, I.N.P.L. Nancy, 55 réf.
- [23] GARCIA ORTIZ (R.) (1979). — Etude de la dénaturation thermique de protéines solubles dans le lait concentré par ultrafiltration. Thèse Doctorat 3^e Cycle, Univ. Nancy I. I.N.P.L., 70 réf.
- [24] GARVIE (E. I.), MABBIT (L. A.) (1956). — Acid production in milk by starter cultures. The effect of peptone and other stimulatory substances. *J. Dairy Res.*, 23, 305-344.
- [25] GREENE (V. W.), JEZESKI (J. J.) (1957). — Studies on starter metabolism. II. The influence of heating milk on the subsequent response of starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 40, 1053-1061.
- [26] HALL (N. J.) (1956). — Influence of *Bacterium coli* on starter production. XIV^e Congr. Int. Lait., II F, 221-230.
- [27] HIGASHIO (K.), KIKUCHI (T.), FURUICHI (E.) (1978). — Symbiose entre *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* dans le yoghourt. XX^e Congr. Int. Lait., F, 522.
- [28] KENNEDY (L.), WEISER (M.) (1950). — Some observations on bacteria isolated from milk that grow within the psychrophilic temperature range. *J. Milk Fd Techn.*, 13, 6, 353-357.
- [29] KNAUT (V. T.) (1967). — Die proteolytischen Eigenschaften der *Pseudomonas* arten beim Wachstum in der Milch. *Milchwissenschaft*, 22, 5, 289-292.
- [30] KOBURGER (J. A.), CLAYDON (T. J.) (1961). — Identification of substances in milk cultures of *Pseudomonas fluorescens* which stimulate lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 44, 1811-1817.
- [31] KUNDRAT (W.) (1966). — Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten. Archiv. *Lebensmittel-Hyg.*, 17, 7, 160-162.
- [32] McLEOD (P.), GORDON (D. F.) (1961). — Peptides as sources of essential amino-acids for lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 44, 237.
- [33] LORIENT (D.) (1977). — Dégradation thermique des caséines, aspects physico-chimiques, structuraux et nutritionnels. Thèse Docteur ès Sciences, Univ. Nancy I, France.
- [34] MACAULAY (D. M.), HAWIRKO (R. Z.), NORMAN JAMES (1963). — Effect of pasteurisation on survival of certain psychrophilic bacteria. *Appl. Microbiol.*, 11, 90-92.
- [35] MOLSKA (I.), MICHALIK (E.), SALEK (A.) (1977). — The influence of different pasteurisation temperatures on the microflora of milk with special consideration of heat-resistant bacteria. *Acta Aliment. Polonica*, 3, 127-136.

- [36] MILLIÈRE (J. B.), VEILLET-PONCET (L.) (1979). — Caractérisation des systèmes enzymatiques protéolytiques de deux souches psychrotrophes isolées de laits crus réfrigérés. *Le Lait*, 59, 269-298.
- [37] NATH (K. B.), LEDFORD (R. A.) (1971). — Stimulation of the rate of acid production by lactobacilli in media containing a capsular substance from micrococci. *J. Dairy Sci.*, 54, 1784-1789.
- [38] OVERCAST (W. W.) (1968). — Psychrophilic microorganisms and keeping quality of milk and its products. *J. Dairy Sci.*, 51, 8, 1336-1338.
- [39] PIERRE (A.), BRULE (G.), FAUQUANT (J.), PIOT (M.) (1977). — Influence des traitements thermiques sur les propriétés physicochimiques des rétentats obtenus par ultrafiltration de lait de vache et de lait de chèvre. I. Dénaturation des protéines solubles. *Le Lait*, 57, 646-662.
- [40] PORTMANN (A.), GATE (Y.), AUCLAIR (J.) (1962). — Influence de la lactopéroxydase et des agglutinines du lait sur l'activité des bactéries des levains thermophiles. XVI^e Cong. Int. Lait., F, 729-735.
- [41] SHARPE (E.) (1962). — Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Sci. Abstr.*, 24, 3, 109-118.
- [42] SHARPE (E.) (1978). — Lactic acid bacteria. XX^e Congr. Int. Lait., Conf. 1 ST.
- [43] SHEHATA (T. E.), COLLINS (E. B.) (1971). — Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. *Appl. Microbiol.*, 21, 3, 466-469.
- [44] SINGH (R. S.), RANGANATHAN (B.) (1978). — Destruction thermique de *E. coli* dans la crème et dans les crèmes glacées. XX^e Congr. Int. Lait., F, 867.
- [45] SOMKUTI (G. A.), BABEL (F. J.) (1969). — Hydrolytic breakdown of casein by a proteinase of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *J. Dairy Sci.*, 52, 1186-1191.
- [46] SPECK (M. L.) (1962). — Symposium lactic starter cultures. IV. Starter culture growth and action in milk. *J. Dairy Sci.*, 45, 1281-1286.
- [47] SPECK (M. L.), MCANELLY (I. K.), WILBUR (J. D.) (1958). — Variability in reponse of lactic streptococci to stimulants in extracts of pancreas, liver and yeast. *J. Dairy Sci.*, 41, 502-508.
- [48] TAYFOUR (A.) (1979). — Etude bactériologique de rétentats obtenus par ultrafiltration de laits, en fonction des temps et température de stockage, et comportement de certaines bactéries lactiques sur ces rétentats soumis à des traitements thermiques. Thèse Docteur-Ingénieur. I.N.P.L., Nancy.
- [49] THOMAS (S. B.), DRUCE (R. G.) (1969). — Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurised milk. A review. *Dairy Ind.*, 34, 351-355, 430-433, 501-505.
- [50] VEILLET (L.), TAYFOUR (A.), MILLIÈRE (J. B.) (1980). — Etude bactériologique de l'ultrafiltration du lait et du stockage au froid du rétentat. *Le Lait*, 60, 351-374.
- [51] WEBER (F.) (1971). — Etude d'un activateur de croissance des levains lactiques. *Rev. Lait Franç.*, n° 286, 265-272.
-