

**CONSERVATION A L'ÉTAT CONGELÉ
DE SUSPENSIONS DE BACTÉRIES LACTIQUES
CONCENTRÉES SOUS FAIBLE VOLUME
I — BACTÉRIES LACTIQUES MÉSOPHILES (1)**

par

J.-P. ACCOLAS et J. AUCLAIR

*Station centrale de Recherches laitières
et de Technologie des Produits animaux
I.N.R.A., Jouy-en-Josas, Yvelines*

I. — Introduction

La préparation en laiterie des levains de bactéries lactiques destinés à la fabrication des produits laitiers fermentés tels que fromages, beurre, laits fermentés, est une opération délicate et coûteuse. Elle constitue pour les laiteries une charge importante en investissements (matériel, cuves à levains) et en main-d'œuvre spécialisée. De plus cette préparation des levains n'est pas sans aléas. Aussi bien au stade de l'entretien des souches au laboratoire de la laiterie, qu'au stade de la préparation proprement dite du levain à l'usine, des « accidents » peuvent se produire : contaminations diverses, attaques de bactériophages, qui ont pour résultat un mauvais développement des bactéries du levain et éventuellement des fabrications défectueuses.

La suppression du stade de la préparation des levains à l'usine constituerait un réel progrès pour les laiteries dans la mesure où elles pourraient disposer de suspensions bactériennes concentrées suffisamment actives pour être ajoutées directement au lait mis en fabrication à la place du levain sur lait traditionnel.

De plus, pour qu'une suspension concentrée de bactéries lactiques puisse être utilisée directement en fabrication, il est essentiel que le peuplement et l'activité de cette suspension soient non seulement très élevés mais aussi très stables dans le temps. La conservation de suspensions actives pendant des périodes assez longues permet en effet de dissocier leur préparation de leur utilisation en technologie.

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

Plusieurs laboratoires étrangers étudient actuellement ce problème, et on peut déjà trouver aux Etats-Unis des suspensions concentrées et congelées de streptocoques lactiques utilisables pour la fabrication du « cottage cheese » et du « butter milk ». Il ne semble pas que ces préparations soient encore utilisées pour d'autres types de fromages.

Lamprech et Foster [1] furent les premiers à montrer que des suspensions relativement concentrées de streptocoques lactiques (contenant $2,5$ à $5,5 \cdot 10^{10}$ bactéries par ml) pouvaient être conservées à -20°C pendant des durées de l'ordre de 9 mois sans perte notable de leur activité.

D'autres chercheurs [2, 3, 4, 5, 6, 7] ont obtenu une très bonne conservation des bactéries lactiques dans l'azote liquide à -196°C , alors que, à la différence de Lamprech et Foster, ils n'avaient obtenu que de médiocres résultats à la température de -20°C . Il faut cependant remarquer qu'ils n'utilisaient que des suspensions bactériennes peu concentrées (contenant entre 10^7 et 10^9 bactéries par ml), obtenues par les méthodes classiques de culture sur bouillon ou sur lait.

Les recherches que nous avons nous-mêmes entreprises ont porté sur la conservation à des températures voisines de -30°C de suspensions concentrées de bactéries lactiques mésophiles. Une publication ultérieure donnera les résultats d'une étude sur la conservation de suspensions concentrées de bactéries lactiques thermophiles (streptocoques et lactobacilles) et sur l'utilisation de ces suspensions dans la fabrication du Gruyère.

II. — Méthodes

1) Souches bactériennes.

Les souches de bactéries mésophiles appartenaient aux espèces suivantes :

Streptococcus lactis : A 3, C 2, C 6, C 10, CNRZ 29.

Str. diacetylactis : DRC 1, DRC 2.

Str. cremoris : C 1, C 3, KH.

2) Milieu de culture et techniques de production.

Nous avons utilisé le milieu et les conditions de culture définis par Bergère [8]. Le milieu était constitué de : Tryptone Difco 40 g, extrait de levure Difco 14 g, lactose 90 g, eau distillée 1 000 ml. Les cultures étaient faites à 25°C . Le pH était maintenu constant (6,5) par addition automatique de soude 5 N à l'aide d'un pH-mètre régulateur.

3) Préparation des suspensions.

Les cellules bactériennes étaient récoltées après la phase exponentielle de croissance, en début de phase stationnaire, à l'aide d'une centrifugeuse Sharples refroidie opérant en continu à 50 000 tours/mn. Le sédiment déposé sur la paroi du bol était recueilli, pesé, et mis en suspension à l'aide d'un « mixer » dans un poids égal d'eau glycinée stérile à 50 p. 100 (p/p). Toutes ces opérations étaient effectuées aseptiquement, à une température aussi voisine que possible de 0° C. Les suspensions ainsi obtenues étaient réparties en flacons de verre ou en tubes d'aluminium (10 à 30 ml) et mises immédiatement au congélateur à - 30° C.

4) Mesure de la viabilité et de l'activité des suspensions en cours de conservation.

On déterminait périodiquement la viabilité et l'activité des suspensions congelées en comparant cette viabilité et cette activité avec celles des suspensions correspondantes avant congélation.

Les suspensions étaient rapidement décongelées par agitation pendant 2 mn dans un bain-marie réglé à 40° C.

On dénombrait les bactéries viables par ensemencement sur un milieu gélosé convenable (tryptone Difco 20 g, extrait de levure Difco 5 g, glucose 5 g, lactose 5 g, gélatine 2,5 g, ClNa 4 g, gélose 15 g, eau distillée 1 000 ml, pH 6,8 avant stérilisation).

L'activité acidifiante des suspensions était déterminée par culture dans du lait écrémé reconstitué, préalablement chauffé à 80° C pendant 30 mn. Les flacons de lait étaient ensemencés à l'aide de dilutions convenables des suspensions puis incubés à 25° C. Le pH des cultures était enregistré à l'aide d'un pH-mètre enregistreur. L'activité était exprimée par le temps nécessaire (en minutes) pour atteindre le pH de 5,5.

5) Fabrication de fromages à pâte molle.

11 essais de fabrication de fromages du type « Carré de l'Est » ont été effectués suivant la technique décrite dans un article précédent [9] et en utilisant comme levain des suspensions concentrées et congelées de streptocoques mésophiles (*Str. lactis* C 10). Ces suspensions étaient décongelées rapidement par agitation dans de l'eau à 40° C et ajoutées à des doses variant entre 0,05 et 0,2 g de suspension par litre de lait mis en œuvre. Dans ces conditions le nombre de germes inoculés dans le lait variait de $2,5 \cdot 10^7$ à 10^8 par ml.

On suivait l'évolution du pH dans le lait et dans les fromages jusqu'au salage. Dans un certain nombre de cas on a déterminé l'extrait sec des fromages de 24 heures.

III. — Résultats

La technique de culture adoptée, avec neutralisation continue à pH constant a permis d'obtenir des cultures de streptocoques lactiques à forte densité bactérienne. Ces cultures contenaient en fin de phase exponentielle, suivant les souches utilisées, 5.10^9 à 3.10^{10} bactéries par ml, soit environ dix fois plus que les cultures normales obtenues sans régulation du pH sur les mêmes milieux.

La centrifugation des cultures et la reprise du sédiment en eau glycinée permettaient d'obtenir des suspensions contenant 1 à 7.10^{11} germes par ml.

Les suspensions concentrées des divers organismes essayés ont été conservées à $-30^\circ C$ pendant des périodes allant jusqu'à 8 mois. On a constaté que la « viabilité » des suspensions (mesurée par dénombrement sur gélose) et l'activité acidifiante de ces suspensions ne variaient pratiquement pas au cours de la conservation.

La figure 1 montre à titre d'exemple les résultats des dénombrements effectués sur trois suspensions concentrées de *Str. lactis* (souche C 10) au cours de 8 mois de conservation à $-30^\circ C$. On constate que la viabilité des suspensions s'est maintenue pendant toute la durée de la conservation.

Dans la figure 2 on a représenté l'activité acidifiante des mêmes suspensions concentrées (souche C 10) mesurée au cours de la conservation. Là encore on ne constate pas de perte notable au cours des 8 mois de conservation.

Les essais de fabrication de fromages à pâte molle à l'aide de suspensions concentrées de streptocoques (souche C 10) ont

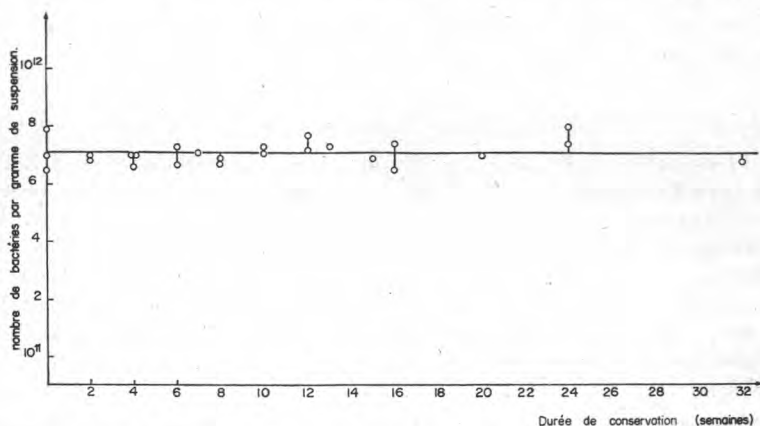


Fig. 1. — Viabilité de trois suspensions concentrées de *Str. lactis* C10, conservées à $-30^\circ C$.

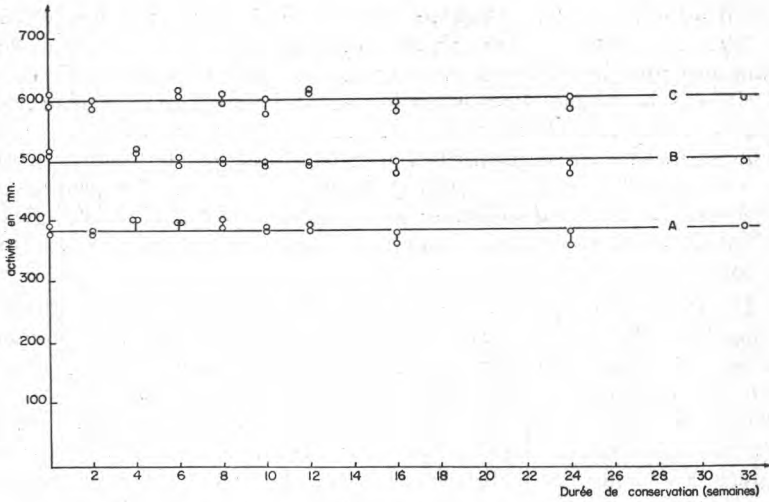


Fig. 2. — Activité acidifiante de deux suspensions concentrées de *Str. lactis* C10, au cours de la conservation à -30°C .

L'activité acidifiante est exprimée par le temps nécessaire à une culture sur lait,ensemencée à l'aide d'une dilution déterminée de la suspension, pour atteindre le pH de 5,5 (temps en minutes).

- A — Inoculum 1/ 5 000
- B — Inoculum 1/ 20 000
- C — Inoculum 1/100 000

démonstré qu'il est tout à fait possible d'utiliser ces suspensions à la place des levains sur lait habituels. La fabrication proprement dite s'est déroulée de façon identique à la fabrication habituelle et les fromages fabriqués avaient les mêmes caractéristiques que les fromages faits en utilisant les levains sur lait (extrait sec à 24 h, caractéristiques organoleptiques après affinage).

IV. — Discussion

Les résultats ci-dessus mettent en lumière les possibilités offertes par l'utilisation en industrie laitière de suspensions de bactéries lactiques concentrées et congelées.

On voit qu'il est parfaitement possible de préparer des suspensions concentrées de bactéries lactiques susceptibles d'être conservées à -30°C pendant plusieurs mois sans perte notable d'activité, et d'utiliser ces suspensions directement en fabrication.

Un tel résultat ne peut être obtenu qu'en respectant un certain nombre de conditions. La culture à pH constant est nécessaire pour obtenir un rendement élevé en cellules. Le stade de la récolte des cellules a, d'autre part, une influence déterminante sur la conser-

vation à l'état congelé. Comme l'a montré Bergère [10], les cellules de *Str. lactis* récoltées en phase exponentielle de croissance sont beaucoup plus sensibles à la congélation que les cellules récoltées en début de phase stationnaire. Par ailleurs, la centrifugation permet de séparer les bactéries du milieu de culture dont la teneur finale en lactate de sodium (de l'ordre de 5 à 6 p. 100) serait préjudiciable à la conservation. Enfin, le glycérol dont l'effet protecteur a été maintes fois mis en évidence en cryobiologie [11] et la richesse en cellules des suspensions jouent certainement un rôle important au cours de la conservation à -30°C .

Il est certain que la préparation de suspensions concentrées de bactéries lactiques ne peut être envisagée que pour des « souches pures » (qui peuvent être ensuite éventuellement mélangées au moment de l'emploi). L'emploi régulier de telles préparations (en fromagerie par exemple) exigera que l'on dispose d'un nombre suffisant de souches, utilisables en rotation de façon à éviter les risques d'attaque par les bactériophages. Les résultats déjà obtenus dans ce domaine par l'étude de différentes souches de *Str. lactis*, *Str. diacetylactis*, *Str. cremoris*, appartenant à des groupes phagiques différents, sont encourageants. Nous avons cependant remarqué que certaines souches se prêtent mal à la préparation de suspensions concentrées car leurs cultures, présentant un caractère filant, sont très difficiles à centrifuger. Cela veut dire que des mises au point sont encore nécessaires pour la préparation des suspensions concentrées.

En ce qui concerne la conservation des bactéries lactiques, on peut noter que l'utilisation des très basses températures, telle que la température d'ébullition de l'azote liquide (-196°C) permet souvent d'obtenir de meilleurs résultats que l'utilisation des températures de -20 à -30°C , comme l'ont observé en particulier Gibson *et al.* [3], Cowman et Speck [5], Bauman et Reinbold [7]. Peut-être cette technique présente-t-elle, dans certains cas, des avantages sur la conservation à -30°C . Le choix de l'un ou l'autre de ces procédés pour une application éventuelle, sera alors déterminé par des impératifs d'ordre technique et économique.

Enfin, de telles suspensions, en raison de leur richesse en germes, voisine de, ou supérieure, à 10^{11} bactéries par gramme, offrent des possibilités nouvelles en technologie laitière et en particulier en fromagerie. Avec ces suspensions il est en effet possible de mettre en œuvre desensemencements 10 à 100 fois plus grands que ceux que donnent les levains classiques. C'est l'emploi de telles suspensions concentrées qui a permis à Vassal et Mocquot [12] d'obtenir en fabrication fromagère une accélération importante de la fermentation lactique, particulièrement avantageuse dans le cas des fabrications mécanisées.

Nous remercions vivement M. E. Vallés, pour la collaboration qu'il nous a apportée dans la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAMPRECH (E. D.), FOSTER (E. M.) (1963). The survival of starter organisms in concentrated suspensions *J. appl. Bact.*, **26**, 359-369.
- [2] GIBSON (C. A.), LANDERKIN (G. B.), MORSE (P. M.) (1965). Survival of strains of lactic streptococci during frozen storage. *J. Dairy Res.*, **32**, 151-156.
- [3] GIBSON (C. A.), LANDERKIN (G. B.), MORSE (P. M.) (1966). Effects of additives on the survival of lactic streptococci in frozen storage. *Appl. Microbiol.*, **14**, 665-669.
- [4] MOSS (C. W.), SPECK (M. L.) (1963). Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. *Appl. Microbiol.*, **11**, 326-329.
- [5] COWMAN (R. A.), SPECK (M. L.) (1965). Ultra-low temperature storage of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, **48**, 1531-1532.
- [6] BAUMANN (D. P.) (1964). Preservation of lactic cultures. Ph. D. thesis, Iowa State University of Science and Technology, Ames, Iowa.
- [7] BAUMANN (D. P.), REINBOLD (G. W.) (1966). Freezing of lactic cultures. *J. Dairy Sci.*, **49**, 259-264.
- [8] BERGERE (J. L.) (1967). Production massive de bactéries lactiques. II. Méthodes de production de *Streptococcus lactis* C 10. (en préparation).
- [9] VASSAL (L.), AUCLAIR (J.) (1966). L'utilisation du lait réfrigéré en tanks de ferme pour la fabrication du fromage. I. Fabrication de fromages à pâte molle. *Rev. Laitière française*, n° 237, 666-673.
- [10] BERGERE (J. L.) (1967). Production massive de bactéries lactiques. III. Production de streptocoques lactiques en culture à pH constant (en préparation).
- [11] MAZUR (P.) (1966). Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing, dans « Cryobiology » (H. T. Meryman, ed.) pp. 213-315. Academic Press, London and New-York.
- [12] VASSAL (L.), MOCQUOT (G.) (1967). Fermentation lactique accélérée en fromagerie grâce à l'emploi d'un nombre très élevé de bactéries. *La technique laitière*, n° 541, 9-13.

Résumé

Des suspensions concentrées de streptocoques lactiques (*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*) ont été préparées par culture à pH constant, centrifugation et mise en suspension du sédiment obtenu dans de l'eau glycéринée à 50 p. 100. Ces suspensions contenaient entre 1 et 7.10^{11} bactéries par gramme.

On a étudié la conservation à -30° C de ces suspensions concentrées. La viabilité et l'activité acidifiante de ces suspensions se sont maintenues sans perte notable pendant plusieurs mois.

Des essais de fabrication de fromages à pâte molle du type « Carré de l'Est » ont été réalisés en ensemençant directement le lait de fabrication à l'aide de suspensions concentrées et conservées à -30° C. Les fromages ainsi fabriqués étaient comparables aux fromages témoins obtenus par ensemencement du lait à l'aide de levains sur lait traditionnels.

Summary

Storage of highly concentrated suspensions of lactic acid bacteria in the frozen state

I. — Mesophilic lactic acid bacteria.

Concentrated suspensions of lactic streptococci (*Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*) were prepared by culturing at a constant pH, centrifuging and suspending the sediment in a 50 p. 100 solution of glycerol in water. These suspensions contained between 1 and 7.10^{11} bacteria per gramme.

The storage at -30° C of these concentrated suspensions was studied. Their viability and their acid production were maintained without marked loss during several months.

Sodft cheeses of the « Carré de l'Est » type were made by inoculating the vat milk directly with concentrated suspensions kept at -30° C. These cheeses were comparable with control cheeses obtained by inoculating the milk with traditional starters prepared in milk.