

**Boissons fermentées de différents types microbiens  
(*L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus*  
et *Str. thermophilus*)  
produites avec du lait à faible contenu glucidique**

(lait ultrafiltré, lait délactosé par voie microbienne,  
lait de soja)<sup>(1)</sup>

par

J. ROSSI, L. COSTAMAGNA et M. INGI

*Istituto di Microbiologia lattiero-casearia  
Facoltà di Agraria di Perugia (Italie)*

La définition de diverses boissons fermentées implique : l'agent microbien responsable de la fermentation, le substrat utilisé pour l'obtenir et la zone d'origine. Elle est commune à toute la production d'acide lactique soit comme produit primaire, soit comme produit secondaire du métabolisme microbien conditionné par le type ou les types de micro-organismes utilisés en association et par l'adjonction de substances particulières [1, 2, 3, 4] qui peuvent influencer sur leur métabolisme, en leur donnant même une plus grande vitalité.

La flore lactique intéressée à la production des boissons lactiques se ramène essentiellement à *L. acidophilus* [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8], *L. bifidus* [9, 10, 11, 12, 13, 14, 15], *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus* [16, 17, 18, 19], tous étant considérés soit isolément, soit associés entre eux ou avec d'autres micro-organismes.

On peut remplacer le lait employé comme substrat par le lait de soja, principalement dans les cas d'intolérance au lait, de manifestations de nature allergique [20, 21, 22, 23] et surtout en raison de sa valeur nutritionnelle élevée, due à son contenu protéique [24, 25, 26]. Dans ce milieu, les manifestations du développement microbien ont

(1) Etude effectuée avec le concours du Conseil national de la Recherche (CT 76 01594 06).

été particulièrement mises en relation avec la capacité de métaboliser le saccharose, la substance ternaire la plus représentée [27] et qui favoriserait en particulier *L. acidophilus*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* et *Str. thermophilus* [27].

Le lait de soja convient aussi à la production du yoghourt [28, 29], car il élève le contenu protéique et celui des sels minéraux, respectivement de trois et six fois par rapport au lait.

Une condition ultérieure appliquée à la production du yoghourt prévoit la réduction de la quantité de lactose du lait par le procédé d'ultrafiltration-diafiltration [30, 31, 32, 33] ou son hydrolyse, soit en faisant agir directement le lactose [34], soit comme conséquence de l'activité hydrolytique des cellules de levure en phase de reproduction [35].

Les produits obtenus par chacune de ces méthodes se caractérisent respectivement par un contenu protéique élevé [30], qui correspond aux conceptions traditionnelles par la limitation des valeurs d'acidité conditionnant favorablement la vitalité des ferments lactiques et par une rapidité accrue d'acidification qui ne masque pas la saveur « plus douce » du yoghourt traité par hydrolyse, par rapport au yoghourt non traité.

La base de nos recherches part de considérations de caractère général avec référence aux différents types de lait à faible contenu glucidique et étudie leur emploi pour la production de boissons fermentées.

## METHODOLOGIE

### 1. Mode de préparation de lait à faible teneur glucidique

#### a) Lait dé lactosé par ultrafiltration-diafiltration (U)

On l'a préparé dans un dispositif pilote avec membrane Abcor de type HFA-180, d'une surface filtrante de 1 mq dans les conditions suivantes :

Portée 900 l/h ; pression à l'entrée 3,9 atmosphères ; pression à la sortie 1,8 atmosphère ; température de l'ultrafiltration 50° C. Le concentré a été traité par diafiltration, puis déshydraté avec un dispositif Spray-Niro. Le produit ultrafiltré en poudre a été reconstitué à 10 p. 100 et stérilisé à 121° C pendant 30 mn (tab. 1a et 1b).

#### b) Lait dé lactosé par voie microbienne (F)

On l'a obtenu ainsi qu'il a été indiqué dans une précédente recherche [35] en utilisant *Kluyveromyces fragilis* 1874 développé comme préculture dans le lait à raison de 10 p. 100 ; la dé lactosation s'est effectuée à la température de 37° C en condition d'agitation (140-160 t/mn) pendant 10 h. On a ensuite pasteurisé le lait à 80° C pendant 10 mn (tab. 1a).

TABLEAU 1 a

Composition chimique de divers types de lait à faible contenu glucidique et du lait entier témoin

| Type de lait                                    | Lactose<br>g/p. 100 | Az. total<br>g/p. 100 | Az. protéique<br>g/p. 100 | Acidité<br>°SH/p. 100 | pH   | Matière grasse<br>p. 100 |
|---|---------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|------|--------------------------|
| Lait entier témoin                              | 4,47                | 0,55                  | 3,50                      | 9,50                  | 6,40 | 3,30                     |
| Lait ultrafiltré                                | 2,87                | 0,99                  | 6,30                      | 9,50                  | 6,83 | 0,05                     |
| Lait délactosé avec <i>K. fragilis</i> 1874 (F) | 2,32                | 0,51                  | 3,24                      | 11,25                 | 6,35 | 3,20                     |
| Lait de soja (S)                                | 1,20*               | 0,56                  | 3,56                      | 7,00                  | 6,48 | 1,40                     |

\* = Sucres totaux.

TABLEAU 1 b. — Composition chimique du lait entier et du dérivé concentré 3:1

|                    | Matière<br>sèche<br>p. 100 | Substances<br>protéiques<br>p. 100 | Lactose<br>p. 100 | Cendres<br>p. 100 | pH   | °SH<br>p. 100 |
|--------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|------|---------------|
| Lait entier        | 8,65                       | 3,05                               | 4,80              | 0,70              | p.d. | p.d.          |
| Lait concentré 3:1 | 14,55                      | 8,25                               | 4,85              | 1,25              | 6,65 | 10,60         |

p.d. = pas déterminé.

### c) *Le lait de soja*

A été obtenu à partir de graines de soja qu'on a fait tremper dans l'eau pendant 24 h ; puis décortiquées et homogénéisées. Le produit homogénéisé a été porté à ébullition et maintenu 1 h à cette température. Après filtration à chaud à travers une toile et lavage du résidu, on a complété le volume avec de l'eau pour obtenir une concentration finale de 20 p.100. On a ensuite stérilisé le lait à 121° C pendant 30 mn (tab. 1a).

## 2. Conditions de préparation des boissons fermentées

Ces différents types de lait et le lait entier pris comme témoin (tab. 1a) ont été ensemencés (à 2 p.100) avec des ferments lactiques en culture pure : *L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13 et avec deux souches de *L. bulgaricus* (9L) et *Str. thermophilus* (1s) selon l'association du yoghourt.

On a effectué l'incubation dans des pots de polystyrène de 150 ml à une température de 40° C pendant 5 h.

Après réfrigération, on a fermé les pots de yoghourt par soudure thermique, avec une capsule d'aluminium polyéthyléné et on les a conservés sous forme de coagulum entier à la température de 10° C pendant 150 j.

## 3. Contrôle microbiologique et physico-chimique des différents types de boissons fermentées

On a effectué chaque analyse sur des échantillons obtenus par le mélange de deux pots et pendant des durées variables entre 7 et 150 j.

### *Analyses microbiologiques*

Elles ont été effectuées avec des dilutions d'échantillons en série décimale selon les méthodes suivantes :

— lactobacilles : en boîtes sur APTG [36] pour *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE13 et sur MRS [37] pour *L. bulgaricus*, tous avec incubation à 40° C pendant 5 j en atmosphère d'azote ;

— streptocoques : en boîtes sur APTs [36] en présence de 1 ml d'acide glutamique (sol. 15 p. 100, pH 7) et de 0,1 ml de 2,3,5 triphényltétrazolium chlorure (sol. 1,5 p.100) avec incubation à 40° C pendant 5 j ;

— levures : en se limitant aux boissons fermentées à base de lait dé lactosé avec *K. fragilis* 1874, on les a recherchées sur Bacto WL médium Difco avec incubation à 37° C pendant 5 j.

### *Analyses chimiques et physico-chimiques :*

- pH : par pHmètre Metrohm E 300 B ;
- matière grasse : par Gerber ;

- acidité titrable : par Soxhlet Henkel ;
- N total : par la méthode semi-micro Kjeldahl sur 2 g de produit ;
- N protéique : a été déduit de L'N total par le facteur de conversion 6,37 ;
- N soluble : a été mis en évidence après déprotéinisation en présence d'acide trichloracétique (sol. 15 p.100) [38] et on a exprimé les résultats en g p. 100 (P/V) ;
- lactose : il a été recherché comme lactose anhydre [39] après déprotéinisation de 10 g d'échantillon, en présence de 5 ml de solution de Carrez I et de 5 ml de solution de Carrez II ;
- les sucres totaux : ont été déterminés en se limitant au lait de soja et aux boissons à base de soja. On a traité le produit déprotéiné (obtenu par la méthode employée pour les sucres réducteurs) par la méthode à l'antrone [40]. On a relevé les pourcentages de transmission avec un spectrophotomètre Beckman DU à 540 m $\mu$  en se référant à une courbe standard établie avec le glucose et on les a exprimés en g p. 100.

## RESULTATS

Le lactose comme les autres substances ternaires métabolisées par des ferments lactiques, a une incidence sur le développement microbien et, par conséquent, sur les manifestations qui lui sont liées, en fonction de la quantité présente dans le milieu.

Des taux peu élevés limitent l'acidification, tandis que des proportions plus importantes déterminent, après coagulation, une phase de post-acidification de nature essentiellement enzymatique, qui peut conditionner la vitalité et donc la survivance dans le temps des micro-organismes lactiques eux-mêmes.

C'est ce qui arrive fréquemment dans le yoghourt, la boisson lactique la plus répandue.

Dans nos recherches nous avons envisagé de vérifier cette argumentation par rapport à ceux des autres aspects qui contribuent à la production de boissons à contenu glucidique limité et qui sont utiles pour satisfaire aux exigences physiologiques dans les cas d'intolérance au lactose, et pour obtenir des produits d'acidité limitée et de valeur protéique élevée (lait de soja).

Pour tous ces types de boissons on a respecté l'aspect technologique, en ce qui concerne le lait et les micro-organismes, afin qu'on ne puisse définir une différence imputable à quelque facteur que ce soit. En particulier, même le yoghourt obtenu à partir du lait délactosé par *K. fragilis* 1874, est conforme à ces considérations qu'on peut tenir pour importantes dans les cas où on se réfère pour ce type de délactosation à l'agent microbien. Pour le lait de soja

et l'ultrafiltrat, on a pu considérer comme satisfaisant l'aspect structural défini par la consistance du yoghourt et conditionné par la matière sèche du lait.

Les facteurs qui déterminent cet aspect sont probablement différents pour les deux types de lait.

Dans l'ultrafiltrat, c'est certainement le contenu protéique qui constitue la majeure partie de l'extrait sec, tandis que dans le lait de soja, la proportion protéique et glucidique n'étant pas plus élevée, l'extrait sec pourrait être déterminé par le résidu de la désagrégation cellulaire de la graine elle-même.

On peut considérer l'aspect organoleptique en fonction du type de lait et du micro-organisme :

— l'ultrafiltrat, comme le lait témoin a une saveur acide, délicate et agréable ; dans le lait délactosé avec *K. fragilis* on perçoit une très légère saveur de fermenté tandis que le lait de soja conserve, bien qu'atténuée, la saveur initiale caractéristique des graines de cette légumineuse ;

— l'aspect organoleptique en fonction du micro-organisme révèle une production d'acidité de même niveau pour l'association *L. bulgaricus*-*Str. thermophilus* et pour *L. acidophilus*, tandis qu'elle est moins notable pour *L. bifidus*, sauf dans le cas du lait de soja dans lequel ce micro-organisme semble activer particulièrement le métabolisme acidifiant.

Le pH des échantillons expérimentaux (tab. 2) a mis en évidence, que dans la phase de production des boissons, le processus d'acidification n'est pas conditionné par la quantité de substances ternaires du milieu, sauf dans les faibles limites auxquelles on s'est référé précédemment.

On constate des résultats analogues en ce qui concerne l'acidité titrable ; ce qu'on peut démontrer en confrontant — en correspondance avec le premier prélèvement (7 j) — les valeurs du lait témoin et celles du lait de soja, du lait ultrafiltré et délactosé avec *K. fragilis*. Ces types de lait contenaient initialement des hydrates de carbone dans les proportions respectives de 1,20 - 2,87 - 2,32 p. 100.

Les taux d'acidité titrable du lait de soja ne sont pas comparables à ceux des autres types de lait et ne concordent pas non plus avec le pH et la consistance du coagulum. Ceci est dû probablement à la composition particulière de ce type de lait. Dans la phase finale du stockage apparaît une différenciation entre les valeurs du pH qui conduit à des indices similaires pour le lait délactosé et le lait témoin exprimés par des accroissements acidométriques plus importants.

En relation avec le métabolisme microbien, la production d'acidité, si on excepte le lait de soja, est minima pour *L. bifidus*, maximale pour *L. acidophilus*. Pour ce dernier micro-organisme, en particulier,

TABLEAU 2

Analyses chimiques et physico-chimiques de boissons lactiques à faible contenu glucidique prélevées pendant la phase de stockage (à 8 - 10° C pendant 90 j)

| Echantillons   | pH             |      |      |      |      | °SH/p. 100 |      |      |      |      | *Lactose g/p.100 |      |      |      |      | Az total g/p. 100 |      | Az protéique p. 100 |      | Az soluble g/p. 100 (P/V) |       |       |
|----------------|----------------|------|------|------|------|------------|------|------|------|------|------------------|------|------|------|------|-------------------|------|---------------------|------|---------------------------|-------|-------|
|                | 7 j            | 15 j | 30 j | 45 j | 60 j | 7 j        | 15 j | 45 j | 60 j | 90 j | 15 j             | 30 j | 45 j | 60 j | 90 j | 7 j               | 45 j | 7 j                 | 45 j | 15 j                      | 45 j  | 60 j  |
|                | N <sub>1</sub> | 5,20 | 4,30 | 4,10 | 3,83 | 3,80       | 19,4 | 37,6 | 59,5 | 67,0 | 72,0             | 3,81 | 3,39 | 3,14 | 3,05 | 2,87              | 0,55 | 0,56                | 3,50 | 3,56                      | 0,118 | 0,123 |
| N <sub>2</sub> | 5,46           | 4,78 | 4,21 | 3,97 | 3,90 | 15,4       | 32,0 | 51,5 | 57,0 | 64,0 | 3,88             | 3,54 | 3,07 | 3,01 | 2,91 | 0,55              | 0,54 | 3,50                | 3,43 | 0,123                     | 0,129 | 0,129 |
| N <sub>3</sub> | 5,89           | 5,50 | 5,00 | 5,07 | 5,12 | 14,6       | 22,0 | 25,0 | 38,0 | 37,0 | 4,08             | 3,67 | p.d. | 3,16 | 3,01 | 0,54              | p.d. | 3,44                | p.d. | 0,129                     | p.d.  | 0,349 |
| N <sub>4</sub> | 4,98           | 4,85 | 4,75 | 4,55 | 4,63 | 27,2       | 28,6 | p.d. | 36,0 | p.d. | 4,21             | 4,13 | 4,03 | 3,88 | p.d. | 0,54              | 0,56 | 3,44                | 3,56 | 0,123                     | 0,123 | 0,134 |
| U <sub>1</sub> | 5,15           | 4,45 | p.d. | 4,17 | 4,05 | 30,0       | 38,8 | 51,5 | 60,0 | 61,0 | 1,54             | 1,39 | 1,24 | 1,06 | 0,87 | 0,99              | 1,00 | 6,30                | 6,37 | 0,017                     | 0,018 | 0,032 |
| U <sub>2</sub> | 5,35           | 4,40 | p.d. | 4,11 | 4,09 | 22,2       | 33,2 | 53,5 | 55,0 | 59,0 | 1,65             | 1,37 | 1,15 | 0,99 | 0,87 | 0,99              | 0,99 | 6,30                | 6,30 | 0,016                     | 0,016 | 0,034 |
| U <sub>3</sub> | 5,54           | 4,80 | p.d. | 4,75 | p.d. | 19,8       | 32,2 | 38,0 | 40,0 | p.d. | 1,84             | 1,74 | 1,54 | 1,43 | 1,28 | 0,99              | 1,00 | 6,30                | 6,37 | 0,020                     | 0,021 | 0,032 |
| U <sub>4</sub> | 5,24           | 4,90 | p.d. | 5,05 | 5,00 | 25,2       | 30,4 | p.d. | 32,0 | p.d. | 2,13             | 2,04 | 1,96 | 1,76 | p.d. | 0,99              | 0,99 | 6,30                | 6,30 | 0,018                     | p.d.  | p.d.  |
| F <sub>1</sub> | 4,45           | 3,95 | 4,40 | 3,80 | 3,74 | 30,4       | 42,4 | 58,5 | 58,0 | 59,0 | 1,54             | 1,39 | 1,28 | 1,17 | 1,10 | 0,51              | 0,50 | 3,24                | 3,18 | 0,024                     | 0,025 | 0,025 |
| F <sub>2</sub> | 4,64           | 4,10 | 4,05 | 3,80 | 3,78 | 27,9       | 38,8 | 58,5 | 62,0 | 63,0 | 1,58             | 1,39 | 1,21 | 1,17 | 1,13 | 0,51              | 0,51 | 3,24                | 3,24 | 0,025                     | 0,026 | 0,026 |
| F <sub>3</sub> | 5,30           | 5,25 | 5,25 | 5,29 | p.d. | 21,4       | 22,0 | 24,2 | p.d. | 25,0 | 2,11             | 2,06 | 1,98 | p.d. | 1,84 | 0,51              | 0,51 | 3,24                | 3,24 | 0,025                     | 0,025 | p.d.  |
| F <sub>4</sub> | 5,05           | 4,88 | 4,65 | 4,67 | 4,74 | 24,2       | 29,6 | 36,0 | 38,0 | p.d. | 2,02             | 1,91 | 1,80 | 1,72 | p.d. | 0,51              | 0,51 | 3,24                | 3,24 | 0,025                     | 0,032 | 0,026 |
| S <sub>1</sub> | 5,13           | 4,90 | 4,55 | 4,34 | 4,33 | 11,6       | 14,6 | 20,5 | 25,0 | 26,0 | 1,05             | 0,82 | 0,72 | 0,71 | 0,71 | 0,56              | 0,56 | 3,56                | 3,56 | 0,027                     | 0,028 | 0,029 |
| S <sub>2</sub> | 5,30           | 5,05 | 4,65 | 4,31 | 4,17 | 11,2       | 13,8 | 21,0 | 24,0 | 30,0 | 1,07             | 0,87 | 0,70 | 0,71 | 0,70 | 0,57              | 0,57 | 3,63                | 3,63 | 0,029                     | p.d.  | 0,034 |
| S <sub>3</sub> | 4,46           | 4,40 | 4,40 | 4,35 | 4,39 | 17,8       | 15,0 | 22,0 | 23,0 | 22,0 | 0,95             | 0,77 | 0,62 | 0,61 | 0,59 | 0,58              | 0,56 | 3,69                | 3,56 | 0,028                     | p.d.  | 0,080 |
| S <sub>4</sub> | 4,94           | 4,80 | p.d. | 4,80 | p.d. | 11,6       | 15,0 | 15,0 | p.d. | p.d. | 1,01             | 0,87 | 0,75 | p.d. | p.d. | 0,56              | 0,55 | 3,56                | 3,50 | 0,029                     | 0,030 | p.d.  |

p.d. = pas déterminé.  
\* = sucres totaux pour le lait de soja.

N = lait entier témoin.  
U = lait ultrafiltré.  
F = lait délactosé avec *Kluyveromyces fragilis* 1874.  
S = lait de soja.

1 = *L. acidophilus* F.  
2 = *L. acidophilus* P.  
3 = *L. bifidus* RE 13.  
4 = *L. bulgaricus* (9 L) + *Str. thermophilus* (1 S).

l'abaissement des valeurs du pH entre la phase initiale (7 j) et celle de 60 j de stockage est de 0,71-0,86 unités (*L. acidophilus* P) pour le lait délactosé avec *K. fragilis* 1874 ; de 1,10-1,26 unités pour l'ultrafiltrat et de 1,40-1,56 unités pour le lait témoin. La métabolisation du lactose comme conséquence directe du développement microbien et de l'acidification dans la phase initiale paraît conditionnée par la concentration relative dans le lait et peut être évaluée par les termes de 1,07-0,50 et 0,16 p.100 pris comme valeurs moyennes parmi les divers micro-organismes, respectivement pour l'ultrafiltrat, pour le lait délactosé par voie microbienne et pour le lait de soja.

Ceci ne peut s'étendre au lait témoin pour lequel la réduction du lactose dans cette phase initiale est très limitée (0,45 p.100), la phase de stockage étant au contraire déterminante. Dans l'intervalle de 15-90 j, en effet, la réduction du lactose est de 0,99 p.100 contre 0,65-0,41 et 0,35 p.100 respectivement pour l'ultrafiltrat, pour le lait délactosé et pour le lait de soja.

La substance azotée totale (tab. 2) ne subit aucune variation consécutive au processus de fermentation ni au processus de conservation, mais subsistent naturellement les différences imputables au lait d'origine 0,55 p.100 (N), 0,99 p.100 (U), 0,51 p.100 (F), 0,56 p.100 (S).

L'N soluble (tab. 2) qui reste en quantité limitée jusqu'à la fin des 60 j de stockage dans les boissons dérivées du lait ultrafiltré, du lait délactosé avec *K. fragilis*, du lait de soja, présente dans le lait témoin, après 15 j, des valeurs comprises entre 0,118-0,129 p.100 susceptibles d'un léger accroissement soit 0,123-0,349 p.100, pendant ces 60 j.

Pour les résultats microbiologiques (tab. 3) obtenus avec les boissons en phase de production et de stockage pendant une durée limitée de 150 j, on examine également l'influence du type de lait et celle du micro-organisme en relation avec sa vitalité dans le temps.

Pour les micro-organismes en culture pure (*L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13) on a mis en évidence (fig. 1, 2, 3, 4) une stabilité indépendante du type de lait. C'est ce que montre la comparaison entre les valeurs relevées dans la phase initiale et les valeurs finales après 150 j de stockage. Ces valeurs sont de l'ordre de  $10^7$  g et indiquent une notable capacité de résistance de ces micro-organismes au milieu rendu acide par la fermentation.

D'autre part, cet aspect pourrait être la confirmation de la capacité d'adaptation de *L. acidophilus* et de *L. bifidus* aux conditions présentées par l'appareil digestif, soit de l'adulte, soit du nourrisson.

L'importance de cette remarque est déterminante aux fins d'une clarification sur ce point et pourrait orienter la fabrication des boissons lactiques vers l'emploi de *L. acidophilus* et de *L. bifidus*, soit

TABLEAU 3

Survivance de divers ferments lactiques dans les boissons à faible contenu glucidique pendant la phase de stockage  
(à 8-10° C pendant 150 j)

| Echantillons   | Lactobacilles      |                    |                    |                    |      |                    |       |                    | *Streptocoques      |                     |                    |                    |                    |
|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|--------------------|-------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                | 7 j                | 15 j               | 30 j               | 45 j               | 60 j | 90 j               | 120 j | 150 j              | 7 j                 | 15 j                | 30 j               | 45 j               | 150 j              |
| N <sub>1</sub> | 68                 | 41                 | 28                 | 28                 | 40   | 25                 | 2     | 5                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| N <sub>2</sub> | 34                 | 34                 | 39                 | 34                 | 54   | 13                 | 7     | 4                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| N <sub>3</sub> | 33                 | 33                 | 58                 | 53                 | 45   | 51                 | 55    | 31                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| N <sub>4</sub> | 66×10 <sup>6</sup> | 35×10 <sup>6</sup> | p.d.               | 48×10 <sup>6</sup> | p.d. | 15×10 <sup>6</sup> | p.d.  | 27×10              | 260×10 <sup>6</sup> | 138×10 <sup>6</sup> | 10×10 <sup>6</sup> | 92×10 <sup>5</sup> | 12×10 <sup>4</sup> |
| U <sub>1</sub> | 16                 | 44                 | 45                 | 28                 | 30   | 20                 | 1     | 4                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| U <sub>2</sub> | 28                 | 11                 | 54                 | 31                 | 33   | 19                 | 61    | 11                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| U <sub>3</sub> | 14                 | 5                  | 39                 | 12                 | 25   | 32                 | 33    | 11                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| U <sub>4</sub> | 21×10 <sup>6</sup> | p.d.               | 54×10 <sup>6</sup> | 38×10 <sup>6</sup> | p.d. | p.d.               | p.d.  | 70×10 <sup>8</sup> | 86×10 <sup>6</sup>  | 40×10 <sup>6</sup>  | 21×10 <sup>5</sup> | 19×10 <sup>5</sup> | 25×10 <sup>4</sup> |
| F <sub>1</sub> | 44                 | 45                 | 52                 | 41                 | 48   | 31                 | 5     | 6                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| F <sub>2</sub> | 45                 | 41                 | 50                 | 65                 | 42   | 13                 | 2     | 2                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| F <sub>3</sub> | 21                 | 8                  | 24                 | 11                 | p.d. | 19                 | 17    | 22                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| F <sub>4</sub> | 31×10 <sup>6</sup> | 21×10 <sup>6</sup> | p.d.               | 26×10 <sup>6</sup> | p.d. | 25×10 <sup>5</sup> | p.d.  | 20×10 <sup>4</sup> | 120×10 <sup>6</sup> | 28×10 <sup>6</sup>  | 24×10 <sup>6</sup> | 12×10 <sup>6</sup> | 79×10 <sup>4</sup> |
| S <sub>1</sub> | 34                 | 21                 | 17                 | 17                 | 48   | 26                 | 20    | 15                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| S <sub>2</sub> | 24                 | 16                 | 33                 | 22                 | 28   | 30                 | 23    | 12                 |                     |                     |                    |                    |                    |
| S <sub>3</sub> | 5                  | 16                 | 31                 | 24                 | 23   | 23                 | 19    | 7                  |                     |                     |                    |                    |                    |
| S <sub>4</sub> | 40×10 <sup>6</sup> | 60×10 <sup>6</sup> | p.d.               | 28×10 <sup>6</sup> | p.d. | <10                | p.d.  | p.d.               | 42×10 <sup>6</sup>  | 31×10 <sup>6</sup>  | 41×10 <sup>4</sup> | 33×10 <sup>4</sup> | 36×10              |

p.d. = pas déterminé.

\* = les valeurs se réfèrent à 1 g de boisson et, à l'exception de ceux qui sont spécifiés autrement, doivent être multipliés par 10<sup>7</sup>.

N = lait entier témoin.

U = lait ultrafiltré.

F = lait délactosé avec

*Kluyveromyces fragilis* 1874.

S = lait de soja.

1 = *L. acidophilus* F.

2 = *L. acidophilus* P.

3 = *L. bifidus* RE 13.

4 = *L. bulgaricus* (9 L) +.

*Str. thermophilus* (1 S).

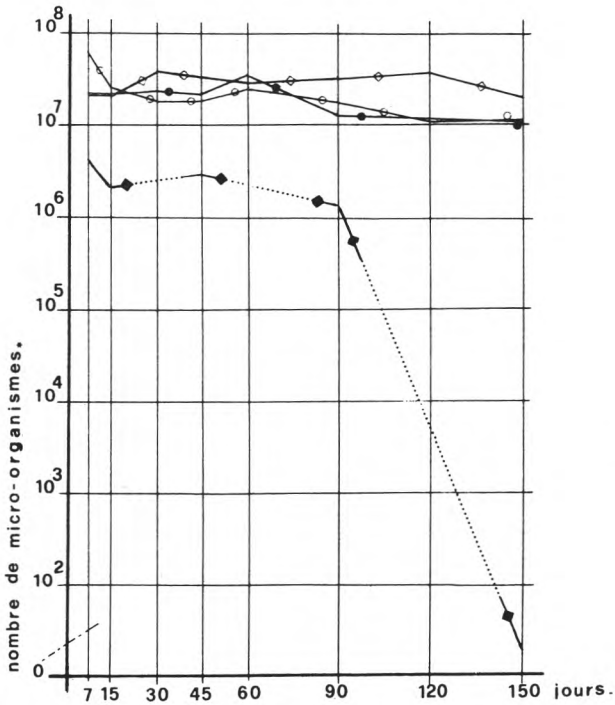


fig. 1

Influence du lait de référence sur l'évolution de divers micro-organismes dans le temps (*L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13, *L. bulgaricus* 9 L).

- *L. acidophilus* F.
- *L. acidophilus* P.
- ◇—◇—◇ *L. bifidus* RE 13.
- ◆—◆—◆ *L. bulgaricus* 9 L.

pour la préparation de boissons de type courant, soit pour les produits d'usage thérapeutique.

On peut faire une constatation presque similaire en ce qui concerne l'association *L. bulgaricus*-*Str. thermophilus* (tab. 3) puisque, comme dans le cas de cultures pures, le développement microbien n'est pas influencé par le type de lait dans la phase initiale.

En fonction de cet aspect qui conditionne la survivance et la vitalité des cellules microbiennes on a mis en évidence un comportement similaire entre quelques tests expérimentaux (lait ultrafiltré

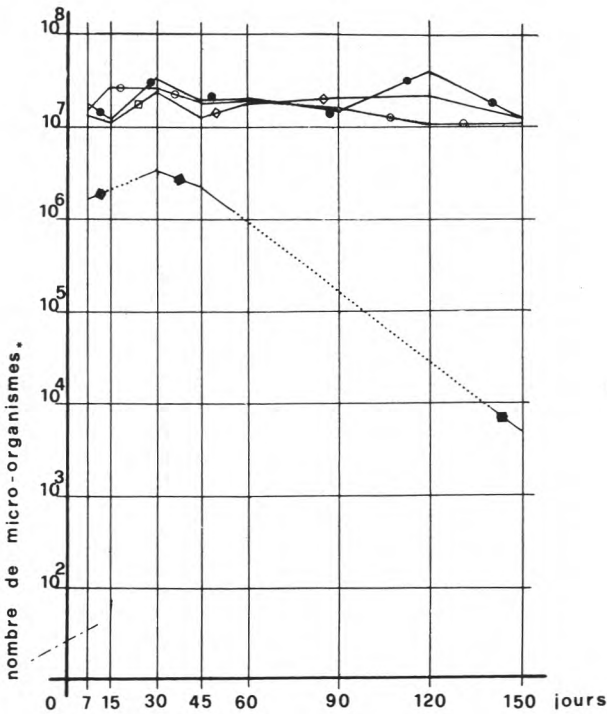


fig. 2

Influence du lait ultrafiltré sur l'évolution de divers micro-organismes dans le temps (*L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13, *L. bulgaricus* 9 L).

- *L. acidophilus* F.
- *L. acidophilus* P.
- ◇—◇—◇ *L. bifidus* RE 13.
- ◆—◆—◆ *L. bulgaricus* 9 L.

et lait délactosé avec *K. fragilis* 1874) et le lait témoin, jusqu'à une durée limite de 45 j. Une conservation prolongée jusqu'à 150 j conduit à définir certaines différences importantes aux fins d'une biostabilisation de la boisson.

Selon les conditions expérimentales réalisées, le lactose du lait témoin (fig. 1) et l'acide lactique du yoghourt correspondant, agissent dans le temps jusqu'à produire l'inactivation presque complète de *L. bulgaricus*. Dans le lait délactosé par voie microbienne (fig. 3) et dans l'ultrafiltrat (fig. 2), la condition qui se développe à la fin de

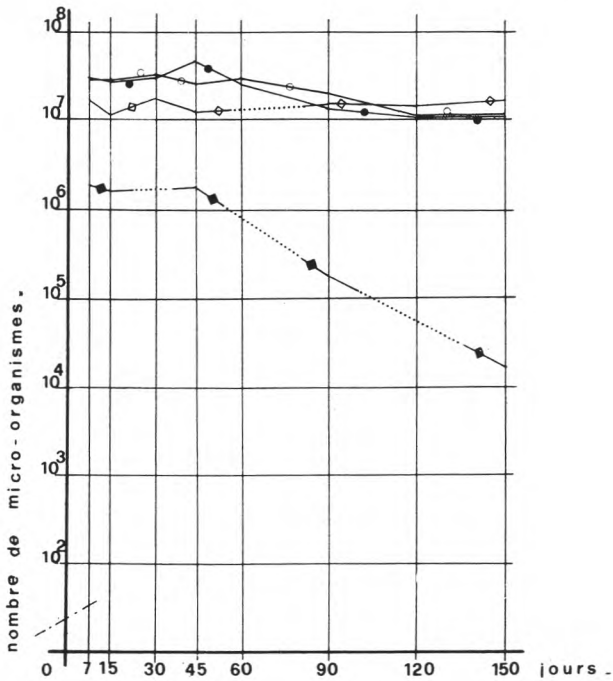


fig. 3

Influence du lait dé lactosé avec *Kluyveromyces fragilis* 1874 sur l'évolution de divers micro-organismes dans le temps (*L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13, *L. bulgaricus* 9 L).

- *L. acidophilus* F.
- *L. acidophilus* P.
- ◇-◇-◇ *L. bifidus* RE 13.
- ◆-◆-◆ *L. bulgaricus* 9 L.

cette période est meilleure et n'exerce qu'une influence limitée sur la microflore vivante qui reste présente avec les valeurs respectives de 10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup> g.

Un examen ultérieur établit aussi pour ces types de lait le maintien d'un certain équilibre entre les deux types de micro-organismes jusqu'à une durée limite de 150 j.

En effet, avec *L. bulgaricus*, *Str. thermophilus* est présent à une valeur de 10<sup>4</sup> g dans les deux cas, tandis que dans le lait témoin il constitue la seule flore active pendant cette période. Le lait de soja,

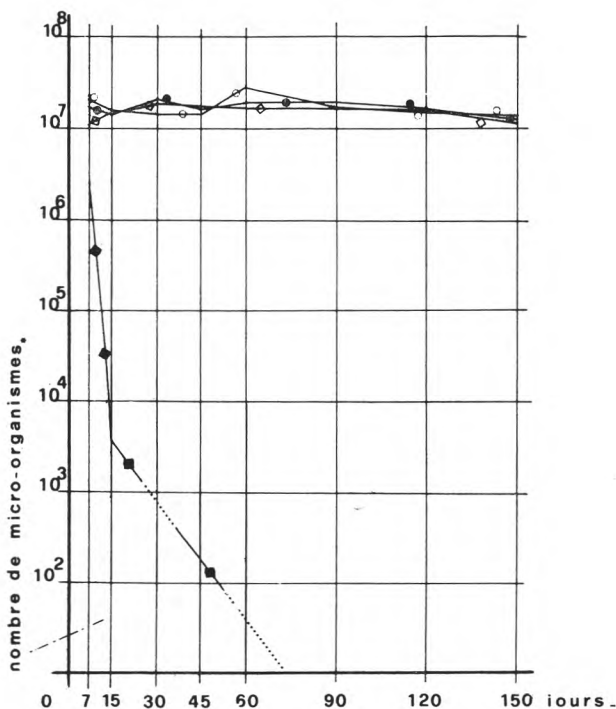


fig. 4

Influence du lait de soja sur l'évolution de divers micro-organismes dans le temps (*L. acidophilus* F, *L. acidophilus* P, *L. bifidus* RE 13, *L. bulgaricus* 9 L).

- *L. acidophilus* F.
- *L. acidophilus* P.
- ◇—◇—◇ *L. bifidus* RE 13.
- ◆—◆—◆ *L. bulgaricus* 9 L.

contrairement à ce qu'on pourrait déduire si on considère l'acidité du milieu comme facteur déterminant de la vitalité microbienne, s'éloigne complètement de la ligne précédemment définie ; il présente (fig. 4) une réaction différente et on note une réduction progressive de *L. bulgaricus* après 15 j. Ceci reste un cas particulier qui, cependant, s'étend aussi à *Str. thermophilus* (fig. 5) quoique avec une moindre rapidité.

On pourrait en trouver la cause dans la présence d'un composé du lait d'une activité particulièrement toxique pour les deux ferments lactiques, non dans la phase active de multiplication micro-

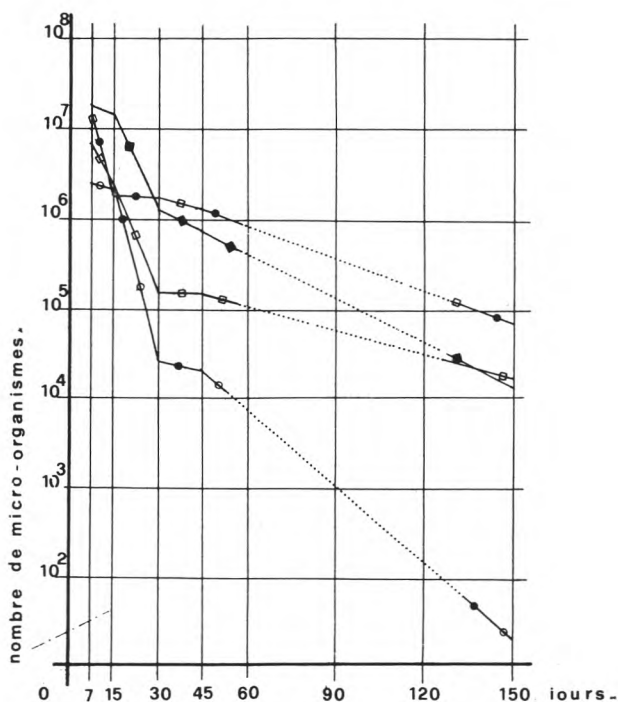


fig. 5

Influence de quelques types de lait (lait témoin, lait ultrafiltré, lait dé lactosé avec *Kluyveromyces fragilis* 1874 (F), lait de soja) sur l'évolution de *Str. thermophilus* dans le temps.

- ◆◆◆ lait témoin.
- lait ultrafiltré.
- lait dé lactosé avec *Kluyveromyces fragilis* 1874 (F).
- lait de soja.

bienne mais dans la phase où se manifeste une tendance naturelle à l'inactivation cellulaire.

Ces éventuelles substances qui sensibiliseraient la vitalité microbienne pourraient être soit d'origine microbienne directe, soit d'intégration avec le substrat.

L'observation des valeurs dans tous les cas envisagés n'a pas mis en évidence des cellules de levure survivant au traitement thermique de pasteurisation et, par conséquent, une interférence directe de ces micro-organismes sur la vitalité des ferments lactiques est à exclure.

## Résumé

La production de boissons lactiques avec différents types microbiens (*L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* et *Str. thermophilus*) a été examinée en employant du lait à faible contenu glucidique. On a considéré le lait ultrafiltré, le lait après dé lactosation par *Kluyveromyces fragilis* en phase de reproduction cellulaire, le lait de soja et le lait témoin. Les boissons obtenues ont été contrôlées selon les aspects microbiologique, chimique et physico-chimique (Az. total, Az. soluble, pH, acidité titrable, contenu glucidique).

On a mis en évidence une stabilisation microbienne liée au type du lait et du micro-organisme.

Dans les boissons indiquées, *L. acidophilus* et *L. bifidus* gardent leurs valeurs initiales (10<sup>7</sup> g) jusqu'à 150 j de stockage à 8-10° C et ne sont pas liés au type de lait examiné.

L'association *L. bulgaricus* - *Str. thermophilus*, au contraire, est conditionnée par les deux paramètres : type de lait et phase de stockage.

Dans le lait ultrafiltré et dé lactosé par voie microbienne, *L. bulgaricus* montre, jusqu'à 45 j, une vitalité cellulaire du même type que celle du lait témoin, et encore plus élevée dans la phase suivante de stockage.

Dans cette phase, *Str. thermophilus* ne présente pas de différences.

L'association *L. bulgaricus* - *Str. thermophilus* a un comportement particulier dans le lait de soja, plus évident pour *L. bulgaricus*.

Les boissons obtenues des différents types de lait reflètent, en ce qui concerne l'aspect chimique et physico-chimique, le type des substrats d'origine qui n'ont aucune influence négative sur la consistances des boissons correspondantes.

## Summary

### THE LACTIC ACID BEVERAGES PRODUCTION BY SOME DIFFERENT MICROORGANISMS

(*L. acidophilus*, *L. bifidus*, *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus*)

### AND MILK WITH LOW GLUCIDIC CONTENT

(ultrafiltered milk, milk delactosed by *Kluyveromyces fragilis*, soya milk)

In this work we have considered ultrafiltered milk, milk delactosed by *Kluyveromyces fragilis* cells in growth phase, soya milk and reference milk.

We have examined the beverage by microbiological and physico-chemical controls (N totale, N soluble, lactic acid production, glucidic

content). The biostabilisation of those beverages results to be regulated by the milk and microorganism type.

No difference has been remarked in *L. bifidus* and *L. acidophilus* survival in every milk type for the whole stocking stage (150 days at 8 - 10° C).

On the contrary, *L. bulgaricus* and *Str. thermophilus* are conditioned by those two parameters. The *L. bulgaricus* survival is like in the ultrafiltered, delactosed milk and reference milk until 45 days of stocking stage but it gets higher at last time (150 days). At this moment the *Str. thermophilus* survival doesn't depend on the different types of milk.

The soya milk shows a singular behaviour for *L. bulgaricus* - *Str. thermophilus* association, more evident for *L. bulgaricus*.

The chemical and physico-chemical properties of the different types of beverage reflect the provenance milk composition and do not influence negatively their firmness.

Reçu pour publication en septembre 1977

### Bibliographie

- [1] IBEKE (N.), HIGUCHI (K.), OKADA (H.), HINO (M.) (1967). — Preparation of a beverage containing lactic acid bacteria. *Jap. Pat.*, 27, 293-297.
- [2] JYOKUTO KAGAKU, SANGYO Co Ltd (1970). — Acidophilus drink. *Jap. Pat.*, 39, 21-70.
- [3] ANGEVINE (N. C.) (1972). — Making yoghurt via vat method. *Dairy e Ice Pr. Fld.*, 155, 52-86.
- [4] NIPPON SODA Co Ltd. NIKKEN CHEMICALS Co Ltd. (1972). — Production of acidophilus drink. *Jap. Pat.*, 37, 555-572.
- [5] PIJANOWSKI (E.) *et al.* (1972). — New types of cultured concentrated milk product. Zbornik referatov Konferencie « Nova technique a technologie vyroby kyslomliecnich vyrobkov a ostatnych mliecnich specialit, 172.
- [6] KOROLEVA (N. S.), SUVOROVA (G. V.) (1966). — Selection of starters for sour milk products with reference to relationships between microorganism. *Dokl. II Merhdunarod. Kongr. Vop. Nauki Tekhnol. pishch. Prom.*, 62.
- [7] MILLERI, KANDLER (O.) (1964). — Breakdown of protein in sour milks. I. Free amino acids in yoghurt byoghurt and acidophilus milk. *Medizin Ernähr.*, 5, 100.
- [8] DOLEZALEK (J.), HAVLICKOVA (V.) (1969). — Possibilities of utilization of propionie bacteria in the production of acidophilus milk. *Sb. vys. Sk. chem. technol. Praze, E 27*, 59.
- [9] SCHULER (R.) (1969). — Method of manufacturing products. *Can. Pat.*, 829-840.
- [10] KYOWA HAKKAKOGYO Co Ltd. (Japan) (1970). — Milk products. *Br. Pat.*, 1, 202, 539.
- [11] ZIAJKA (S.), KISZA (J.), KOSKOSZ (D.) (1974). — Growth of *Lactobacillus bifidus* cultures in cows milk. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolinzo-Technicznej j w Olsztynie*, 121.

- [12] ANON (1969). — Yoghurt milk with bifidus bacteria. *Molkereizeitung Hildesh* 23, 1115.
- [13] KLUPSCH (H. J.) (1972). — Manufacture of cultured milk products byoghurt and biogarde of optimal characteristics. *Dte. Molk. Ltd.*, 93, 925.
- [14] KLUPSCH (H. J.) (1972). — Manufacture of cultured milks of long storage life. Zbornik referatov z Konferencie Nova Technika a Technologia vyroby Kyslomliecnych vyrobkov a ostatnych mliecnych specialit. *Banska Bystrica, Czechoslovakchia, Slovenska Vedeckotechnicka Spolocnost pre Potravinarsky Pziemysl*, 114.
- [15] HINTERWALDNER (R.) (1971). — Process for producing a cultured milk product, the acidity of which does not increase after the ripening process. *W. Germ. Pat. Appl.*, 1, 951, 361.
- [16] OGAI (D.K.), MUSAEV (Sh.M.), MADRAKHIMOV (Yu.) (1970). — Comparative study of the formation of free aminoacids by local thermophilic lactic acid bacteria. *Pziki. Biokhim. Mikrobiol.*, 6, 103.
- [17] LUCA (C.) (1970). — Influence of yoghurt microorganism on contents of nitrogenous substances. *Industria Aliment. Buc.*, 21, 633.
- [18] ZALASHKO (M. W.), OBRAZTSOVA (N. V.), SAVCHENKO (E. I.) (1970). — Proteolytic activity of lactic acid bacteria. In : *Fiziologiya i biokhimiya mikroorganizmov*, 121.
- [19] FORMISANO (M.), PERCUOCO (G.), PERCUOCO (S.) (1971). — Microbiological investigation of fermented milk drinks. Gas chromatography of the fatty acids in yoghurt. *Industrie Agr.*, 9, 273.
- [20] GASSMAN (B.), HEINE (W.), KIETZHANN (A.) (1970). — Composition of a new non milk infant food and comparison with milk based foods. *Ernährungs-forschung*, 15, 81.
- [21] NAKAYAMA (Y.), YOSIDA (R.), SANNIMIYA (Y.) (1965). — Studies on milk allergy in infancy. *Paediat. Indonesia*, 5, 609.
- [22] BULGARELLI (R.) (1966). — Allergy to milk primary carbohydrate intolerance, the corlice syndrome. *Minerva Pediat.*, 18, 521.
- [23] JOHNSTONE (D. E.), DUTTON (A. M.) (1966). — Dieraty prophylatis of allergie disease in children. *New. Engl. J. Med.*, 274, 715.
- [24] BATES (R. D.), BARRET (W. W.), ANDERSON (D. W.), SAPERSTEIN (S.) (1968). — Milk and soya formucas: a comparative growth study. *Ann. Allergy*, 26, 577.
- [25] POEY (S. H.) (1965). — Trial of soy milk on children alden than 5 months. *Paediat. Indonesia*, 5, 599.
- [26] VEST (M.), OLAFSON (A.), SCHENKER (P.) (1966). — A new type of soya milk for feeding newly born and older babies. A comparison with human milk and adapted cows'milk. *Schweiz med. Wscher.*, 96, 762.
- [27] MITAL (B. K.), STEINKRAUS (K. H.), NAILOR (H. B.) (1974). — Growth of lactic acid bacteria in soy bean. *J. of Food Sci.*, 39, 1018.
- [28] ARIYAMA (H.) (1963). — Process for the manufacture of a synthetic yoghurt from soy bean. *U.S. Pat.*, 3, 96-197.
- [29] SANS (D. C.), HANKIN (L.) (1974). — Seleching lysine excreting mutants of lactobacilli for use in food and feed enrichment. *Appl. Microb.*, 28, 523.
- [30] EMALDI (G. C.), POMPEI (C.), CARBONE (E.), PERI (C.) (1974). — Composizione e conservabilità di yogurt preparati con latte concentrato per ultrafiltrazione. *Scienza e Tecnica Lattio Casearia*, 25 (2), 33.
- [31] RUBIN (J.), WERNER (H.) (1974). — Experiences with ultrafiltration in the production of a protein enriched cultured milk product. *XIX Int. Dairy Congr.*, 1 E, 755.

- [32] BIERNE (P.) (1974). — Protein enriched milk products manufactured by the ultrafiltration process. *XIX Int. Dairy Congr., 1 E*, 755.
- [33] BJERRE (P.), MIELSON (P. S.) (1974). — Application of ultrafiltration in the manufacture of cultured milk products. *XIX Int. Dairy Congr., 1 E*, 738.
- [34] THOMPSON (M. P.), GYURICSEK (D. M.) (1974). — Manufacture of yoghurt, buttermilk and cottage cheese from hydrolyzed lactose milks. *J. Dairy Sci.*, 57, 584.
- [35] ROSSI (J.), JEMMET (M. T.) (1977). — Dé lactosation du lait par cellules de levures, en phase de reproduction, pour la production de yoghourt. *Le Lait*, 57, 393.
- [36] RAIBAUD (P.), COULET (M.), GALPIN (I. V.), MOCOQUOT (G.) (1961). — *J. Appl. Bact.*, 24, 285.
- [37] SHARPE (M. E.) (1962). — *D. Science Abst.*, 45.
- [38] SAVINI (E.) (1946). — *Analisi del latte e dei latticini*. Ed. Hoepli, Milano.
- [39] A.O.A.C. (1970). — *Official methods of analysis*. Washington D.C.
- [40] MORRIS (D. L.) (1948). — Colorimetric Determination of total carbohydrates. *Science*, 107, 254.
-