

**Étude de quelques caractères de souches
de *Streptococcus thermophilus*
utilisées en fabrication de yoghourt*
et proposition d'une méthode de classement**

par

C. BOUILLANNE et M. J. DESMAZEAUD**

(avec la collaboration technique de Michèle LANDON, J. J. GRATADOUX
et M. FOURIER)

INTRODUCTION

Dans la fabrication du yoghourt l'acidification du lait résulte généralement de l'action de deux bactéries lactiques thermophiles *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* [1]. Bien que le yoghourt soit un lait fermenté dont la préparation semble à première vue assez simple, la fabrication industrielle de ce produit n'est pas sans poser des problèmes. En outre, le goût des consommateurs français a notablement évolué depuis le développement industriel du yoghourt à la fin des années 40. A l'heure actuelle on note une préférence marquée pour un produit doux et aromatique qui présente une consistance épaisse et homogène surtout dans le cas des yoghourts brassés additionnés ou non de fruits.

Comme l'a noté Pette [20] les caractéristiques intéressantes du point de vue technologique peuvent varier grandement d'une souche à une autre à l'intérieur d'une espèce donnée. C'est par exemple le cas de l'activité acidifiante des bactéries du yoghourt en fabrication et de l'acidification qui se poursuit plus ou moins rapidement au cours de la conservation au froid du produit [1]. Ainsi, le rôle de *S. thermo-*

* Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche avec la Société de Diffusion des Marques (Sodima-Yoplait), 170 bis, bd du Montparnasse - 75014 Paris.

** Laboratoire de Microbiologie Laitière et de Génie Alimentaire, I.N.R.A. - 78350 Jouy-en-Josas (France).

philus en tant qu'agent acidifiant associé aux lactobacilles est bien établi. Mais, cette espèce intervient aussi dans la production de l'arôme final du yoghourt [27]. Dès 1950, Pette et Lolkema [21] attribuèrent à l'acétaldéhyde un rôle fondamental dans les qualités organoleptiques du produit sans pour autant, être le seul composant en cause. Cette hypothèse a été depuis confirmée par Dumont et Adda [6] qui ont montré, en plus de l'acétaldéhyde, la présence dans le yoghourt d'autres composés (tels que l'acétone, l'éthanol, le butanone, le diacétyle).

En ce qui concerne l'onctuosité du yoghourt, il apparaît que celle-ci peut être améliorée par l'utilisation de certaines souches [10, 18, 26] qualifiées d'épaississantes ou de « filantes » parce qu'elles donnent au gel résultant de leur activité acidifiante des propriétés rhéologiques particulières. Cependant, l'épaississement ou la viscosité parfois très élevée des laits fermentés est une caractéristique encore très mal connue. On évoque souvent la production de polysaccharides par analogie avec celle de certains *Leuconostoc* producteurs de dextrans bien connus en sucrerie. De même, dans les pays nordiques on utilise certaines souches de streptocoques mésophiles pour la fabrication de laits fermentés très « filants », cette propriété résultant de la production de « mucus » par les souches en cause [9]. Notons en outre que chez une souche de *L. bulgaricus* les propriétés épaississantes observées dans du lait ont été attribuées à la production d'un polysaccharide [12]. De même, la formation des grains de Kéfir est attribuée pour une part au moins à la production d'un « kéfirane » par un lactobacille proche de *L. brevis* [15]. Par contre, à notre connaissance, aucune étude détaillée concernant le caractère « épaississant » de *S. thermophilus* cultivant sur le lait n'a été publiée bien que certaines de ces souches soient utilisées couramment de façon empirique pour fabriquer les yoghourts [10].

Le présent travail est consacré à l'étude d'un certain nombre de caractères (vitesse d'acidification, production d'acétaldéhyde, viscosité des cultures sur lait, évolution de l'acidité à basse température) d'une collection de souches de *S. thermophilus* et à celle d'un « profil enzymatique » de ces souches mettant en œuvre une micro-méthode semi-quantitative. A l'aide d'une analyse statistique nous avons ensuite tenté de regrouper les souches en fonction de ces différents paramètres, exception faite de la viscosité. Cette dernière caractéristique intervient à titre indicatif, les mesures n'étant pas effectuées à pH constant.

MATERIEL ET METHODES

1. Souches bactériennes utilisées

Les souches de *S. thermophilus* utilisées dans ce travail proviennent de la collection du Centre National de Recherches Zootechniques

(C.N.R.Z.). Elles étaient conservées à l'état lyophilisé. Elles seront désignées par leur numéro C.N.R.Z. Après remise en culture et repiquage (deux à trois) sur lait tournesolé stérile, il était constitué un stock de cultures sur lait (inoculum 5 p. 100).

Au fur et à mesure des besoins les cultures étaient décongelées et incubées une nuit (16 h) à 44° C. Ces dernières cultures servent d'inoculum à raison de 3 p. 100 pour les cultures suivantes (flacon de 100 ml).

2. Lait utilisé, cultures, production d'acide lactique

Le lait utilisé était préparé en dissolvant 100 g de poudre de lait écrémé granulé exempt d'antibiotiques, dans 1 000 ml d'eau distillée. Il était réparti en flacons de 100 ml et stérilisé à 110° C pendant 10 min.

Les cultures étaient incubées à 44° C avec un inoculum de 3 p. 100 soit environ $5,00 \cdot 10^7$ germes par ml (culture de 16 h à 44° C). La production d'acide lactique de cette culture était mesurée périodiquement selon Accolas *et al.* [1]. La vitesse d'acidification était le temps (min) mis par une souche pour atteindre 40 ou 50° D dans les conditions d'incubation. En fin de phase exponentielle de croissance, déterminée par mesure de l'acidité, la culture était refroidie rapidement dans l'eau glacée et répartie en tubes de 10 ml ; ceux-ci étaient conservés soit à + 4° C, soit à + 12° C. Le nombre de germes par ml de ces cultures se situait vers $2,00 \cdot 10^9$. L'évolution de l'acidité en cours de conservation était mesurée périodiquement jusqu'à 21 j. Chaque mesure était faite en double. Un autre flacon (100 ml) de culture était congelé en vue du dosage ultérieur de l'acétaldéhyde.

Pour déterminer les activités enzymatiques, on cultivait les cellules bactériennes sur le milieu liquide M17 décrit par Terzaghi et Sandine [25]. Après deux repiquages successifs sur ce milieu, les cultures étaient effectuées à 42° C, la récolte des cellules s'effectuant soit en fin de croissance exponentielle (4 h d'incubation), soit en phase stationnaire (16 h). Les cellules étaient récoltées par centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4° C.

3. Dosage de l'acétaldéhyde

L'acétaldéhyde produit dans les cultures sur lait était dosé selon la méthode de Lindsay et Day [17]. Celle-ci est une adaptation de la technique de Owades et Jakovac décrite précédemment par Pack *et al* [19].

4. Mesure de la viscosité

La viscosité des cultures sur lait était mesurée par détermination directe des contraintes de cisaillement sur 9 ml de lait à l'aide d'un viscosimètre à cylindres coaxiaux (Rotovisco RV2, Haake). Les mesures

étaient faites à 44° C très exactement à une vitesse de déformation de 181 min⁻¹.

5. Analyse enzymatique par le système API-ZYM

Le système API-ZYM (API-System S.A.*) est une microméthode semi-quantitative de recherche d'activités enzymatiques, applicable à divers milieux, tissus, liquides biologiques et micro-organismes. La miniaturisation et la simplicité du dispositif permettent de mettre en évidence dix-neuf systèmes enzymatiques par le développement d'une coloration. Le matériel, les réactifs et le mode opératoire utilisés ont été décrits précédemment par Schmidt *et al.* [23]. La suspension cellulaire utilisée était obtenue par mise en suspension dans de l'eau physiologique (9 g de NaCl pour 1 000 ml d'eau distillée stérile) de cellules non lavées provenant du milieu M17. Ces suspensions étaient ajustées à une densité optique égale à 1,0 à 650 nm (soit environ 3.10⁸ cellules) à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman Model 25 (chemin optique de la cuve = 1 cm). Les galeries étaient incubées pendant 4 h à 42° C.

6. Traitement des résultats

Pour classer les souches bactériennes suivant leurs caractères d'acidification et d'arôme et leurs activités enzymatiques nous avons employé une méthode d'analyse multidimensionnelle, l'analyse factorielle des correspondances [2, 3, 11]. Cette analyse mettait en œuvre un programme informatique, le programme Tabet [22] sur l'ordinateur Iris 80 du C.N.R.Z.

RESULTATS

1. Caractéristiques technologiques des souches de *S. thermophilus*

Parmi les trente souches analysées, deux souches (385 et 409) présentent de fortes vitesses d'acidification puisque dans les conditions standard utilisées le temps mis pour atteindre 40-50° D est inférieur ou égal à 220 min. Par opposition deux autres souches (389 et 785) doivent être considérées comme « lentes » puisqu'elles exigent au moins 440 min pour atteindre 40-50° D. Ces dernières souches présentent aussi les moins fortes acidités (47 et 48° Dornic) en fin de croissance exponentielle (tab. 1). L'évolution des cultures sur lait conservées à 4° ou 12° C après incubation présente une grande variabilité d'une

* API-System : La Balme-les-Grottes - 38390 Montalieu-Vercieu (France).

souche à une autre. La souche 160 n'acidifie plus au cours de la conservation au froid. Les souches 389, 457 et 785 totalement inactives à 4° C produisent cependant à 12° C une faible quantité d'acide. Plusieurs souches (386, 390, 403, 756) continuent d'acidifier à 4° comme à 12° C. D'autre part, il n'apparaît pas de corrélation entre la poursuite de l'acidification à basses températures et l'acidité mesurée au moment de la phase de ralentissement, lorsque cette acidité est faible ($r = -0,19$).

La production d'acétaldéhyde, retenue comme critère d'arôme, varie de 1 à 4 environ parmi les souches étudiées. Il existe une très faible corrélation ($r = -0,43$) entre les quantités d'acétaldéhyde dosées en fin de croissance exponentielle et les vitesses d'acidification ce qui entraîne que certaines souches « rapides » (385) sont fortes productrices d'acétaldéhyde alors que d'autres (409) sont faibles productrices (tab. 1).

La mesure de la viscosité maximum des cultures de *S. thermophilus* sur lait, obtenue entre pH 5,2 et 4,9, fait apparaître une variation de 1 à 8 environ entre les souches (tab. 2). De plus, un groupe de souches (368, 391, 404, 406, 409, 736, 756 et 784), pour lequel le maximum de viscosité du lait est supérieur à 9 mPa.s., se sépare nettement des autres et on peut considérer ces souches comme « épaississantes ». Les autres souches entraînent au plus une augmentation de viscosité du lait de 6,6 mPa.s., la souche 410 étant la moins épaississante. Il n'existe pas de corrélation entre la viscosité maximum et la vitesse d'acidification ou de production d'acétaldéhyde (respectivement $r = -0,22$ ou $r = -0,21$).

2. Classement des souches selon les caractères technologiques

L'analyse factorielle des correspondances permet d'effectuer des rapprochements entre les souches et d'opérer un classement de celles-ci en groupes distincts. Pour discriminer les souches on a utilisé les deux premiers « facteurs » de l'analyse qui représentent ensemble 80,5 p. 100 de l'information (ou dispersion du nuage des points), soit 49,2 p. 100 pour le premier facteur (ou axe 1) et 31,3 p. 100 pour le deuxième facteur (ou axe 2). La projection sur un plan est présentée sur la figure 1. L'examen des contributions absolues les plus fortes pour les axes 1 et 2 permet de regrouper les souches selon les caractéristiques technologiques (ou variables) qui ont participé à la construction des facteurs. La signification des groupes de souches est donnée en examinant les contributions absolues de ces variables. Le groupe A (fig. 1) comporte essentiellement des souches « lentes » peu aromatiques et non épaississantes, excepté la souche 368 ; le groupe B contient des souches aromatiques dont la vitesse d'acidification est moyenne à forte et qui acidifient peu au cours de la conservation au froid. L'ensemble C regroupe des souches dont l'acidité évolue aux basses températures et qui sont peu aromatiques. Le groupe D est

TABLEAU 1

Caractéristiques d'acidification et de production d'acétaldéhyde de différentes souches de *S. thermophilus*

| Souche CNRZ n° | Acidité en fin de croissance exponentielle (degrés D) | Vitesse d'acidification (min) | *Acidité produite à 4° C après 15 j de conservation (degrés D) | *Acidité produite à 12° C après 15 j de conservation (degrés D) | Acétaldéhyde produit en fin de phase exponentielle après incubation à 44° C (ppm x 10 ²) |
|-------------------|--|-------------------------------------|---|--|--|
| 21 | 60 | 300 | 1 | 15 | 376 |
| 160 | 66 | 260 | 0 | 0 | 272 |
| 302 | 63 | 270 | 5 | 21 | 300 |
| 368 | 41 | 360 | 7 | 16 | 114 |
| 385 | 62 | 160 | 14 | 22 | 400 |
| 386 | 46 | 300 | 24 | 24 | 216 |
| 387 | 49 | 300 | 15 | 15 | 200 |
| 388 | 50 | 240 | 12 | 28 | 136 |
| 389 | 47 | 450 | 0 | 9 | 160 |
| 390 | 60 | 270 | 19 | 23 | 200 |
| 391 | 53 | 250 | 7 | 21 | 168 |
| 402 | 63 | 240 | 10 | 10 | 244 |
| 403 | 49 | 300 | 24 | 37 | 140 |
| 404 | 60 | 240 | 12 | 26 | 216 |
| 405 | 64 | 260 | 11 | 11 | 201 |
| 406 | 55 | 240 | 14 | 24 | 304 |
| 407 | 55 | 300 | 13 | 27 | 200 |
| 408 | 45 | 300 | 4 | 16 | 150 |
| 409 | 56 | 220 | 16 | 32 | 128 |
| 410 | 50 | 360 | 10 | 14 | 148 |
| 439 | 49 | 330 | 17 | 30 | 164 |
| 457 | 61 | 270 | 0 | 12 | 212 |
| 736 | 62 | 285 | 10 | 18 | 200 |
| 756 | 55 | 250 | 18 | 31 | 148 |
| 758 | 53 | 270 | 7 | 14 | 128 |
| 759 | 49 | 270 | 20 | 28 | 212 |
| 760 | 52 | 240 | 14 | 24 | 150 |
| 761 | 50 | 320 | 13 | 25 | 232 |
| 784 | 62 | 290 | 8 | 21 | 176 |
| 785 | 48 | 440 | 0 | 8 | 120 |

* La première colonne du tableau indique l'activité à laquelle les souches ont été refroidies et conservées.

TABLEAU 2

Maxima de viscosité (obtenus entre pH 5,2 et 4,9) dans les cultures de *S. thermophilus*

| Souche CNRZ n° | Maximum de viscosité (mPa.sec) | Souche CNRZ n° | Maximum de viscosité (mPa.sec) | Souche CNRZ n° | Maximum de viscosité (mPa.sec) |
|-------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 21 | 4,6 | 391 | 10,2 | 439 | 4,7 |
| 160 | 6,1 | 402 | 5,3 | 457 | 5,8 |
| 302 | 3,9 | 403 | 4,9 | 736 | 11,6 |
| 368 | 11,4 | 404 | 18,8 | 756 | 9,2 |
| 385 | 3,6 | 405 | 4,6 | 758 | 5,1 |
| 386 | 4,8 | 406 | 13,8 | 759 | 3,9 |
| 387 | 5,1 | 407 | 6,1 | 760 | 5,6 |
| 388 | 3,0 | 408 | 5,9 | 761 | 6,6 |
| 389 | 5,4 | 409 | 13,9 | 784 | 15,0 |
| 390 | 4,8 | 410 | 2,4 | 785 | 4,6 |

La viscosité du lait au début de l'incubation était de 1 mPa.sec.

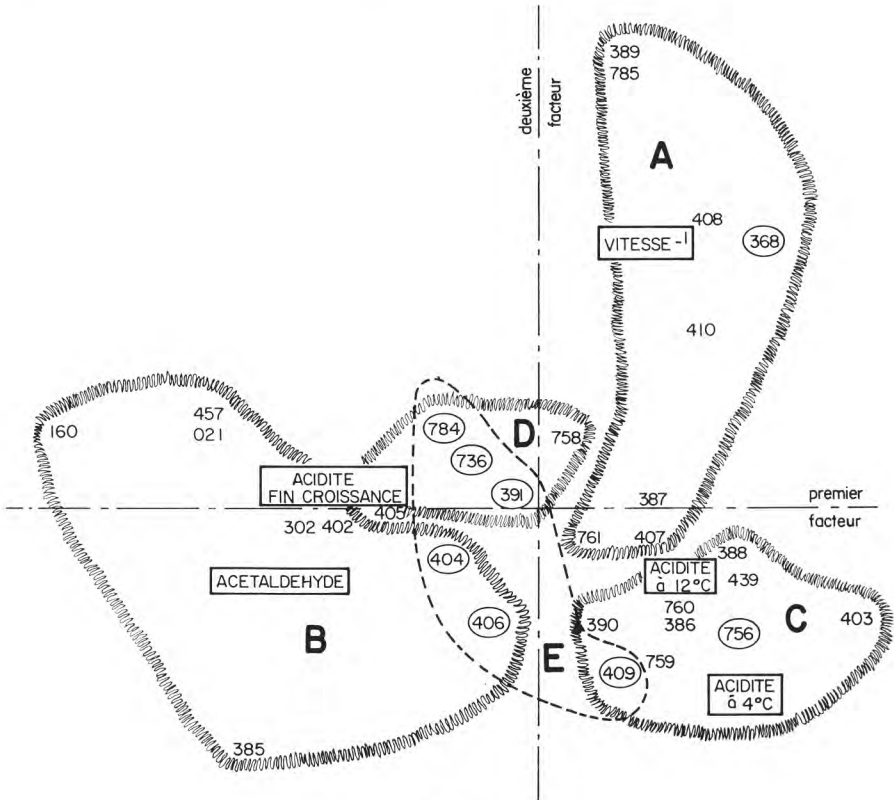


fig. 1

Classement des souches de *S. thermophilus* selon les caractéristiques technologiques (autres que la viscosité maximum)

- : indique la position d'une souche épaississante.
Dans les autres cas, la position d'une souche est indiquée par son numéro.
- : indique la position de la variable participant à la construction du facteur (ou axe) considéré :
Vitesse⁻¹ = inverse de la vitesse d'acidification ; Acidité fin croissance = acidité en fin de croissance à 44° C ; Acidité à 12° C ou à 4° C = acidité produite à 12° C ou à 4° C après culture, après 15 j de conservation ; Acétaldéhyde = quantité d'acétaldéhyde produite en fin de phase exponentielle de croissance à 44° C.

un groupe intermédiaire constitué de souches peu aromatiques dont la vitesse d'acidification est moyenne et qui acidifient peu à basse température. Par contre, l'acidité produite par ces souches en fin de croissance exponentielle est assez forte. En outre ces souches sont généralement épaississantes. La méthode d'analyse met bien en évidence

que le caractère « épaississant » d'une souche n'est pas lié à une ou plusieurs caractéristiques d'acidification ou d'arôme puisque les souches à fortes valeurs de viscosité ne constituent pas une classe précise mais se répartissent au contraire dans tous les groupes. Cependant, un sous-groupe (E) comprenant des souches épaississantes pourrait être constitué au centre de la figure. En effet ces souches ne sont ni des souches « lentes » (368 omise), ni des souches « rapides ». L'acidité de leurs cultures sur lait évolue aux basses températures (surtout à 12° C) et, en excluant les souches 404 et 406, les souches épaississantes sont peu ou pas aromatiques.

TABLEAU 3

Equipement enzymatique de *S. thermophilus*

| Enzymes | Souches 411 et 412 | | 53 souches (411 et 412 omises) | |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Moyenne des notes* | | Moyenne des notes* | |
| | Culture de 4 h | Culture de 16 h | Culture de 4 h | Culture de 16 h |
| Estérase (C 4) | 2 | 1,5 | 1,2 | 0,3 |
| Leucine-aminopeptidase | 3,5 | 0 | 4,4 | 1,8 |
| Valine-aminopeptidase | 0 | 0 | 0,9 | 0,1 |
| Cystine-aminopeptidase | 0 | 0 | 0,9 | 0,1 |
| Activité type chymotrypsine | 0 | 0 | 0,1 | 0 |
| Phosphatase acide | 5 | 5 | 1,5 | 1,5 |
| Phosphatase alcaline | 2 | 2 | 0 | 0 |
| Phosphoamidase | 1,5 | 2 | 1,2 | 0,9 |
| α -galactosidase | 1 | 0 | 0 | 0 |
| β -galactosidase | 0 | 0 | 4,4 | 2,9 |

α Les valeurs extrêmes sont notées 0 \rightarrow 5 selon les méthodes préconisées par API-system.

3. Equipement enzymatique de *S. thermophilus*

Ayant mis en évidence de faibles corrélations inverses entre les caractéristiques d'acidification et de production d'acétaldéhyde ($r = -0,43$) mais non avec la viscosité ($r = -0,22$) de certaines cultures il a été recherché si une corrélation pouvait aussi exister entre la viscosité et la présence de certains systèmes enzymatiques. Cette étude a été réalisée sur un plus grand nombre de souches. Parmi les 55 souches étudiées appartenant à l'espèce *S. thermophilus*, une première

analyse a permis de mettre à part les souches 411 et 412 en raison de leur équipement enzymatique très différent des autres souches. En effet, ces deux souches se caractérisent par la présence d'une très forte activité phosphatase acide, d'une activité phosphatase alcaline (n'existant chez aucune des autres souches), d'une faible activité α -galactosidase dans des cellules en phase de croissance exponentielle et par l'absence de β -galactosidase quel que soit l'âge physiologique des cellules (tab. 3).

Les 53 autres souches de *S. thermophilus* se caractérisent essentiellement par la présence de fortes activités β -galactosidase et leucine-aminopeptidase ainsi que par de faibles activités estérase, valine-aminopeptidase et cystine-aminopeptidase. De plus, contrairement aux souches 411 et 412, l'activité phosphatase acide est faible et les activités phosphatase alcaline et α -galactosidase sont toujours nulles. En moyenne, les activités dans les cellules jeunes étaient très supérieures à celles qui étaient mesurées dans les cellules en phase stationnaire (tab. 3).

Aucune des autres activités dosées avec la micro-méthode API-ZYM n'existe chez *S. thermophilus*, qu'on utilise des cellules jeunes ou âgées : estérase-lipase (C8), lipase (C14), activité type trypsine, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acétyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase et α -fucosidase.

4. Classement des souches selon leur équipement enzymatique

Pour discriminer les 53 souches étudiées (411 et 412 étant omises) les trois premiers « facteurs » de l'analyse ont été retenus car ils expliquent ensemble 57,2 p. 100 de l'information (dispersion du nuage de points), soit 25,1 p. 100 pour le premier facteur, 18,7 p. 100 pour le deuxième facteur et 13,4 p. 100 pour le troisième facteur. L'examen des contributions absolues les plus fortes permet d'isoler des groupes de souches. La projection sur un plan du nuage de points en fonction des deux premiers facteurs est reproduite dans la figure 2. Le groupement des souches est effectué en examinant les contributions absolues des activités enzymatiques suivant ces mêmes axes. Le groupe A comporte des souches dont les cellules âgées de 4 h possèdent une activité valine-aminopeptidase et (ou) une activité cystine-aminopeptidase (désignées respectivement dans la figure 2 : VAL J et CYS J) et dont les cellules âgées de 16 h possèdent une activité leucine-aminopeptidase (désignée LEU V). La plupart de ces souches possèdent aussi une activité estérase pendant la phase de croissance (désignée BUT J) ou pendant la phase stationnaire (BUT V). Le groupe B s'oppose au précédent par l'absence de leucine-aminopeptidase dans les cellules âgées de 16 h, mise à part la souche 391 qui conserve cette activité. Ce groupe se caractérise également par la présence d'une activité phosphatase acide dans les cellules jeunes (PH2 J). En outre dans ce groupe, trois souches se distinguent par l'existence d'une activité

DISCUSSION - CONCLUSION

Une sélection de souches faisant intervenir plusieurs caractères, certains d'entre eux présentant un intérêt pratique, ne peut être réalisée qu'en utilisant un traitement statistique complexe des informations. L'intérêt du programme Tabet est d'obtenir une représentation graphique visualisant les analogies entre souches. Il est facile, pour cette raison, de substituer à une souche une autre souche qui présente globalement le comportement le plus voisin (en dehors de l'intensité de la viscosité). On peut par exemple (fig. 1) remplacer la souche 404 par la souche 406, ou la souche 302 par la souche 402, ou la souche 391 par la souche 736, etc. En conséquence, cette représentation a l'avantage de montrer immédiatement les différences les plus fortes existant entre souches. C'est par exemple le cas de la souche 385 par rapport à la souche 389 ou de la souche 160 par rapport à la souche 785. Cela est valable non seulement pour un caractère pris isolément mais tient compte statistiquement de l'ensemble des caractéristiques analysées. On notera en particulier que la recherche de simples corrélations n'aurait pas permis de regrouper certaines souches épaississantes intéressantes pour des fabrications de yoghourts brassés.

En plus du caractère épaississant, la variabilité la plus forte parmi les souches de *S. thermophilus* résulte de l'activité acidifiante observée, après culture, au cours de la conservation à 4° C ou à 12° C. La production d'acétaldéhyde ou la vitesse d'acidification à 44° C présente des amplitudes moindres de variation. Ainsi, cette propriété de certaines souches de *S. thermophilus* d'acidifier à basse température pose un certain nombre de problèmes pour la fabrication du yoghourt. Il conviendrait donc, comme le proposent Accolas *et al.* [1] non seulement de refroidir les yoghourts rapidement mais aussi et surtout de les conserver à une température voisine de 0° C. Les quantités d'acétaldéhyde trouvées dans les cultures de *S. thermophilus* sur lait sont beaucoup plus faibles que celles dosées dans le yoghourt [27], ou les cultures associées avec *L. bulgaricus* [13]. Ceci s'explique par le fait que, d'une part, *L. bulgaricus* produit lui-même plus d'acétaldéhyde que *S. thermophilus* [13] et que, d'autre part il existe un effet synergique sur l'apparition de ce composé d'arôme dans les cultures associées [13].

L'absence apparente de lien entre les caractères technologiques et le profil enzymatique d'un groupe de souches, indique que d'autres activités enzymatiques devraient être mesurées en complément de celles que propose le système API-ZYM. Par exemple, la recherche des niveaux d'activité d'une thréonine aldolase ou de décarboxylation du pyruvate pourrait être entreprise afin de déterminer les voies de production de l'acétaldéhyde (et leur système de régulation) par ana-

logie avec ce qui existe chez d'autres micro-organismes [16]. Cependant l'utilisation des plaquettes commerciales a apporté différentes informations sur *S. thermophilus*. En effet, deux souches seulement (411 et 412) présentent un équipement enzymatique particulier ce qui signifie que l'espèce *S. thermophilus* semble très homogène et se caractérise par de fortes activités β -galactosidase et leucine-aminopeptidase. Ces résultats sont en accord avec les travaux précédents ayant aussi montré chez les streptocoques thermophiles la présence des systèmes β -galactosidase et phospho- β -galactosidase [14]. De même, chez un petit nombre de souches de *S. thermophilus* il avait été montré (exclusivement dans des cellules en phase stationnaire) la présence constante d'une activité leucine-aminopeptidase [4]. Parmi les faibles activités mises en évidence, certaines souches possèdent une enzyme protéolytique de type chymotrypsine semblable à celle étudiée chez *L. casei* [7] ou *S. cremoris* [8]. D'autre part, comme les streptocoques mésophiles [24] *S. thermophilus* est potentiellement capable de libérer de faibles quantités d'acides gras à courtes chaînes grâce à une estérase (C4) mais ne peut avoir de rôle dans la lipolyse faute de posséder une lipase (C8 ou C14). La présence chez certaines souches d'une forte activité phosphatase acide se maintenant en phase stationnaire peut revêtir un intérêt technologique. En effet, comme l'ont montré Dullely et Kitchen [5], une activité phosphatasique acide peut dans certains produits favoriser la protéolyse de ceux-ci.

En conclusion, cette étude ne représente que la première phase d'un travail plus général [1] qui visait pour une part à sélectionner et à proposer pour la fabrication des yoghourts brassés des associations de souches de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* aux caractères technologiques connus. La même méthode de regroupement des souches a donc été appliquée aux lactobacilles et fera l'objet d'une prochaine publication. Enfin, il sera établi sur des cultures mixtes et dans les conditions de la pratique industrielle quel facteur de variation les effets de la symbiose entre le streptocoque et le lactobacille, peuvent entraîner par rapport aux caractéristiques technologiques étudiées sur les souches pures.

Remerciements

Nous remercions très vivement Mme Françoise Bonjean et Mme Martine Wagner pour l'excellente participation qu'elles ont apportée à ce travail comme stagiaires au laboratoire, ainsi que M. E. Jolivet et Mme Colette Roux du Laboratoire de Biométrie, I.N.R.A. Jouy-en-Josas, pour les conseils qu'ils nous ont fournis au cours de ce travail, ainsi que MM. J. L. Bergère et J. P. Accolas pour les discussions que nous avons eues lors de la rédaction du manuscrit.

Résumé

Différents caractères technologiques ainsi que la présence de plusieurs enzymes ont été recherchés chez *Streptococcus thermophilus*. En fonction de ces caractères une méthode de regroupement des souches dans une optique d'utilisation technologique est aussi proposée.

Les souches ont été classées selon leur vitesse d'acidification, la quantité d'acide lactique obtenue en fin de croissance logarithmique et leur possibilité de produire de l'acide lactique à 4° C et 12° C après croissance à 44° C. D'autre part, la production d'acétaldéhyde retenue comme critère d'arôme varie de 1 à 4 et la mesure de la viscosité maximale des cultures sur le lait fait apparaître une variation de 1 à 8 selon les souches.

S. thermophilus se caractérise essentiellement par la présence de fortes activités β -galactosidase et leucine-aminopeptidase ainsi que par de faibles activités estérase, valine-aminopeptidase et cystine-aminopeptidase.

En utilisant une méthode d'analyse multidimensionnelle (analyse factorielle des correspondances, programme Tabet) un regroupement entre les souches a été effectué. Cette méthode peut être utilisée par le technologue cherchant à remplacer une souche par celle ayant globalement le comportement le plus voisin.

Summary

A STATISTICAL METHOD FOR GROUPING SOME *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* STRAINS ACCORDING TO THEIR TECHNOLOGICAL OR ENZYMOLOGICAL CHARACTERISTICS

The detection of different enzyme systems as well as the study of some technological parameters concerning *S. thermophilus* has been reported.

The strains were classified according to the rate and amount of lactic acid production, and their ability to produce lactic acid stocked at 4 or 12° C after normal growth at 44° C. Acetaldehyde formation by these strains was taken as a criteria for aroma production, the values obtained varied from 1 to 4. A variation of 1 to 8 in viscosity was also reported after normal growth of *S. thermophilus* strains in milk.

Our results also reveal that *S. thermophilus* show high levels of β -galactosidase and leucine-aminopeptidase while only low esterase, valine- and cysteine-aminopeptidase activities were detected.

A statistical analysis was made to interpret the results. A multivariate method (correspondence analysis) has allowed grouping the strains into various clusters.

Reçu pour publication en mars 1980.

Bibliographie

- [1] ACCOLAS (J. P.), BLOQUEL (R.), DIDIENNE (R.) et RÉGNIER (J.) (1977). — Propriétés acidifiantes des bactéries lactiques thermophiles en relation avec la fabrication du yoghourt. *Le Lait*, 57, 1-23.
- [2] BENZECRI (J. P.) *et al.* (1973). — L'analyse des données. Tome 2. Analyse des correspondances. Dunod, Paris.
- [3] BONIN (G.) et ROUX (M.) (1978). — Utilisation de l'analyse factorielle des correspondances dans l'étude phyto-écologique de quelques pelouses de l'Apennin lucano-calabrais. *Oecol. Plant.*, 13, 121-138.
- [4] DESMAZEAUD (M. J.) et JUGE (M.) (1976). — Caractérisation de l'activité protéolytique et fractionnement des dipeptidases et des aminopeptidases de *Streptococcus thermophilus*. *Le Lait*, 56, 241-260.
- [5] DULLEY (J. R.) and KITCHEN (B. J.) (1973). — The acid phosphatase of Cheddar cheese. *Austr. J. Dairy Technol.*, 28, 114-116.
- [6] DUMONT (J. P.) et ADDA (J.) (1973). — Méthode rapide d'étude des composés très volatils de l'arôme des produits laitiers. Application au yoghourt. *Le Lait*, 53, 12-22.
- [7] EL SODA (M.), BERGÈRE (J. L.) and DESMAZEAUD (M. J.) (1978). — Detection and localization of peptide-hydrolases in *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Res.*, 45, 519-524.
- [8] EXTERKATE (F. A.) (1975). — An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* strain HP. *Neth. Milk Dairy J.*, 29, 303-318.
- [9] FORSEN (R.), RAUNIO (V.) and MYLLYMA (R.) (1973). — Studies on slime forming group N *Streptococcus* strains. *Acta Univ. Oul.*, A12 (Biochem. 3), 1-19.
- [10] GALESLOOT (T. E.) and HASSING (F.) (1973). — Maintaining the slime production of yoghurt cultures. *Mededelingen, NIZO*, 7, 57-62.
- [11] GARNOT (P.), TOULLEC (R.), THAPON (J. L.), MARTIN (P.), HOANG (M. T.), MATHIEU (C. M.) and RIBADEAU-DUMAS (B.) (1977). — Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasal enzymic secretion. *J. Dairy Res.*, 44, 9-23.
- [12] GROUX (M.) (1973). — Critical observations of yoghurt manufacture with reference to protein breakdown. *Schweiz. Milchzeit.*, 99, 18-20.
- [13] HAMDAN (I. Y.), KUNSMAN (J. E.) and DEANE (D. D.) (1971). — Acetaldehyde production by combined yoghurt cultures. *J. Dairy Sci.*, 54, 1080-1082.
- [14] HEMME (D.), VASSAL (L.), FOYEN (H.) et AUCLAIR (J.) (1979). — Effet de l'addition de lactase au lait sur le développement des lactobacilles et des streptocoques thermophiles. *Le Lait*, 59, 597-614.
- [15] LA RIVIERE (J. W. M.), KOOLMAN (P.) and SCHMIDT (K.) (1967). — Kefiran a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.*, 59, 269-278.
- [16] LEES (G. J.) and JAGO (G. R.) (1976). — Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.*, 43, 63-73.
- [17] LINDSAY (R. C.) and DAY (E. A.) (1965). — Rapid quantitative method for determination of acetaldehyde in lactic starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 48, 665-669.
- [18] MARTENS (R.) (1972). — Influence de quelques facteurs sur la consistance et le goût du yoghourt brassé. *Revue de l'Agriculture*, 25, 461-480.

-
- [19] PACK (M. Y.), SANDINE (W. E.), ELLIKER (P. R.), DAY (E. A.) and LINDSAY (A. C.). (1964). — Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters. *J. Dairy Sci.*, 47, 981-986.
- [20] PETTE (J. W.) (1964). — Les laits fermentés. Caractéristiques des souches communément utilisées pour la préparation des laits fermentés les plus importants. *Fédération Intern. Laiterie, Bulletin annuel, Partie III*, 78-93.
- [21] PETTE (J. W.) and Lolkema (H.) (1950). — Acid production and aroma formation in yoghurt. *Neth. Milk Dairy J.* 4, 261-273.
- [22] ROUX (C.) (1975). — Analyse factorielle des correspondances (Version Tabet). Document 75/05. Laboratoire de Biométrie I.N.R.A., Jouy-en-Josas.
- [23] SCHMIDT (J. L.), GRAFFARD (C.) et LENOIR (J.) (1979). — Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert. I. Essais préliminaires. *Le Lait*, 59, 142-163.
- [24] STADHOUDERS (J.) and VERINGA (H. A.) (1973). — Fat hydrolysis by lactic acid bacteria in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, 27, 77-91.
- [25] TERZAGHI (B. E.) and SANDINE (W. E.) (1975). — Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.*, 29, 807-813.
- [26] VANDERPOORTEN (R.) et WAES (G.) (1972). — Etude des propriétés de quelques cultures de yoghurt. *Revue de l'Agriculture*, 25, 101-114.
- [27] VERINGA (H. A.) (1973). — Biochemistry of yoghurt. *Medelingen, NIZO*, 7, 88-96.
-