

## EVOLUTION DES BIFIDOBACTERIES DANS LES CULTURES MIXTES AVEC *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* ET *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

E. Barascu

Université Valahia Targoviste, Faculté d'Ingénierie d'Environnement et Biotechnologies, 18-24 Rue Unirii, [elbarascu72@mail.com](mailto:elbarascu72@mail.com),  
[elenabarascu@valahia.ro](mailto:elenabarascu@valahia.ro)

**Abstract:** In this study was monitored growth of bifidobacteria in single or mixed cultures with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* with the purpose of fructification the results in the technology of probiotic dairy products. The cultures used in this experiment were inoculated in different proportion in the base medium (milk reconstituted with 12.4% nonfat dry matter) and for diversification the studied variants and the cultivation conditions was used both simultaneous inoculation of the cultures and inoculation with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* after 4 hours from inoculation of bifidobacteria.

Concerning the growth of bifidobacteria in mixed cultures with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* was acceptable only in variants with simultaneous inoculation, when the number of cells was greater than the variant with single culture. In consequence, the association of cultures in report of 4:1:1 (bifidobacteria: *Streptococcus thermophilus*: *Lactocillus helveticus*) results in obtaining a considerable number of the bifidobacteria ( $1.13 \times 10^9$  cfu/cm<sup>3</sup>) after only 6 hours of optimal incubation for this bacteria.

**Keywords:** *bifidobacteria*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *probiotic dairy products*

**Résumé:** Par cet étude on a surveillé l'évolution des bifidobacteries dans les cultures pures et mixtes avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* en vue de la valorisation des résultats obtenues dans la technologie des produits probiotiques. Les cultures utilisées ont été inoculées en différentes proportions sur le milieu de culture (lait reconstitué avec 12,4% matière sèche dégraissé), mais pour la diversification des variantes d'étude et des conditions de culture on a aussi utilisé l'ensemencement simultané des cultures, mais aussi l'inoculation décalée avec 4 h du *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* vis-à-vis des bifidobacteries.

En ce qui concerne la croissance des bifidobacteries dans les cultures mixtes, on a remarqué que les résultats obtenus étaient satisfaisants seulement dans les variantes simultanées inoculées, quand le nombre de cellules obtenus avait été plus grande que dans les variantes avec des cultures pures. Ainsi, l'association des trois cultures en rapport de 4 : 1 : 1 (bifidobacteries : *Streptococcus thermophilus* : *Lb helveticus*) conduisait à l'obtention d'un nombre de bifidobacteries de  $1.13 \times 10^9$  ufc /dm<sup>3</sup>, après 6 heures d'optime incubation pour ces bactéries.

**Mots clé:** *bifidobacteries, Streptococcus thermophilus, Lactobacillus helveticus, produit laitier probiotique*

## INTRODUCTION

Pendant les trois dernières décennies, un grand nombre de chercheurs ont étudié l'amélioration de la santé de l'homme par la modulation de la microbiota intestinale par l'intermédiaire des suppléments microbiennes vivantes dénommés probiotiques. Les consommateurs ont aussi compris que l'alimentation a un rôle important pour la maintenance de la santé et, pour ce raison-là, ils se sont dirigés vers des aliments sains, en favorisant la production d'une gamme diversifiée des produits probiotiques. Des nombreuses études ont prouvé que l'ingestion des microorganismes probiotique peut influencer la composition de la microbiota intestinale et peut avoir des effets bénéfiques sur la santé de l'homme, parmi lesquelles : la maintenance d'équilibre microbienne intestinale, l'amélioration des symptômes pour les personnes avec d'intolérance au lactose et elle confère une résistance augmentée aux pathogènes entériques. Aussi, les probiotiques peuvent prévenir ou améliorer la diarrhée par leurs effets sur le système immunitaire [1, 4]. N'importe comment, ces effets positifs sur l'organisme humaine peuvent être obtenus seulement si les bactéries probiotiques arrivent vivantes et dans un grand nombre dans le colon. Pour ce motif-là, F.I.L. recommande que les bactéries probiotique doivent être vivantes et abondantes dans les produits alimentaires et la concentration minimale de cellules pendant le consommé soit de  $10^7$  ufc/g [5, 8].

Les bifidobacteries représentent le plus important groupe de bactéries intestinales impliquées directement ou indirectement dans la maintenance de la santé de l'organisme humaine, étant considérées des bactéries probiotiques. Elles sont des bactéries strictement anaérobiques, qui se présentent sous une forme de bâtonnets,

apparemment variables, Gram positives, asporulées, immobiles. Ces bactéries enregistrent une croissance optimale à une température de 37 – 41 °C et un pH de 6.5 - 7 [4, 11]. Les bifidobactéries croissent difficilement dans le lait parce qu'elles n'ont pas d'activité protéolytique, mais ce-ci ne satisfait pas les exigences nutritionnelles des bactéries, ayant des réduites concentrations des sources d'azote facilement assimilables. En vue de la stimulation de la croissance des bifidobactéries dans le lait on a pratiqué leur association avec des bactéries lactiques classiques et, surtout, avec celle caractérisées par une activité protéolytique [3].

Malgré le fait que les produits laitiers probiotiques commercialisés dans le monde forment une gamme très diversifiée, on a observé qu'on ne retrouve pas au niveau de tous ces produits la concentration des bactéries probiotiques recommandée par F.I.L. [8, 10]. Cette situation a été générée par l'introduction des bactéries probiotiques dans les produits laitiers classiques, sans existant une solide base de données concernant les interactions des bactéries bienfaisantes et celles lactiques classiques [3, 6]. En présent, il connaît le fait que pour l'obtention d'une yaourte probiotique avec des bifidobactéries on doit éliminer le *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* du culture starter du yaourt due à son caractère post-acidifiant avec un effet négatif sur la viabilité des bactéries bienfaisantes. En plus, certaines bactéries des cultures starter ont la capacité de produire des substances antimicrobiennes (ex. bactériocines), avec d'effet inhibiteur sur les bactéries sensibles du produit [3, 8]. Aussi, la croissance et la viabilité des probiotiques et des bactéries du yaourt sont autant influencées par la composition du produit, par la présence des substances de conservations apportées par les fruits et noisettes et par la disponibilité des facteurs de croissance pour ces microorganismes [3]. Par cet étude on a surveillé l'évaluation des possibilités d'association des bifidobactéries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*, en vue d'amélioration de la croissance des bifidobactéries dans le lait. Aussi, on a recherché le choix de la variante optimale d'association des trois cultures pour l'obtention d'un produit laitier probiotique caractérisé par un gros nombre de bactéries probiotique et attributs sensoriales supérieures. Les résultats obtenus seront valorisés dans la technologie d'obtention des produits laitiers probiotiques, en ajoutant à l'enrichissement des informations liées par les interrelations des bactéries lactiques classiques avec les probiotiques.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Cultures bactériennes**

En cette étude on a utilisé trois cultures pures lyophilisées: une culture probiotique (Bif. species 420, Danisco Cultor, Allemagne) et deux cultures de bactéries lactiques classiques. La culture de *Streptococcus thermophilus* (St. therm. P, Danisco Cultor, Allemagne) utilisée se caractérise par une capacité d'acidification modérée et une capacité d'aromatisation satisfaisante. En ce qui concerne le *Lb helveticus* (Lb. helv. 7, Danisco Cultor, Allemagne), on a surveillé l'utilisation d'une culture avec une activité protéolytique modérée.

Pendant la phase antérieure de l'ensemencement, les cultures étudiées ont été suspendues individuellement sur le milieu de base (M0 = lait reconstitué avec 12.4% matière sèche dégraissée) pour l'hydratation des cellules et l'uniformisation de l'inocule.

### Préparation des variantes de lait fermenté

Le lait reconstitué (avec 12.4% matière sèche dégraissée) a été pasteurisé à 80-85<sup>0</sup>C, pendant 15 minutes, et après il a été rafraîchi à 40<sup>0</sup>C. En vue d'évaluation d'effet des cultures de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* sur les bifidobacteries ont été réalisés plusieurs variantes de lait avec différents rapports des trois cultures (tableau 1).

*Tableau 1. Variantes de lait fermenté*

Echantillons étudiés	Milieu de culture	Rapport d'inoculation (%)		
		Bifidobacteries	<i>Str. thermophilus</i>	<i>Lb. helveticus</i>
M1	M0	6	-	-
M2	M0	4	1	1
M3	M0	8	-	-
M4	M0	6	1	1
M5	M0	4	2	2
M6	M0	4	1	1
M7	M0	6	1	1
M8	M0	4	2	2

Pour la diversification des conditions de culture et pour l'obtention d'un grand nombre d'informations liées à l'association des bifidobacteries avec les autres deux cultures, après la variation des rapports des cultures on a aussi modifié le moment de leur inoculation:

- inoculation simultanée des trois cultures (valable pour les preuves M2, M4, M5) ;
- inoculation décalée avec 4 h du *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* vis-à-vis des bifidobacteries (valable pour les preuves M6, M7, M8).

Les variantes du lait fermenté obtenues avec une culture pure de bifidobacteries, ajoutée en proportion de 6% et 8% vis-à-vis du lait, ont été utilisées comme des preuves de référence.

Après l'inoculation, les preuves de lait ont été thermostatées à 37°C pendant 6 h (les preuves inoculées simultanément) et, respectivement, 10 h (la période totale de l'inoculation décalée) de la manière que le processus fermentatif a été interrompu avant que le pH se réduisît sous 4.5 dans les preuves avec des cultures mixtes. Immédiatement après l'incubation, les preuves de lait fermenté ont été rafraîchies et maintenues aux températures de réfrigération.

### L'évaluation microbiologique et physico-chimique des preuves de lait fermenté

Pour l'appréciation d'évolution des bifidobacteries sur les cultures pures et mixtes pendant l'incubation, on a fait des moissonnes aseptiques de lait immédiatement après l'inoculation, mais aussi après l'adjonction des cultures de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* (pour l'inoculation décalée) et au fin de la fermentation.

L'évaluation du nombre de bactéries probiotiques et du rapport des trois cultures étudiés, aux intervalles du temps mentionnés au-dessus, a été faite après la dilution des preuves de lait récoltées aseptiquement en système décimale. Après, on a effectué des

préparâtes sèches et colorés pour la détermination du numerus de bifidobacteries (exprimée en ufc/cm<sup>3</sup>) par la méthode directe Breed [2].

Au niveau de tous les variantes étudiées, parallèlement avec le procès de multiplication on a surveillé l'activité fermentative des cultures, au mêmes intervalles du temps, par la détermination de l'acidité titratable et la mensuration du pH. L'acidité a été exprimée en g acide lactique/dm<sup>3</sup> et a été déterminée par titration avec NaOH 0.1 N en présence de la phénophtaléine, utilisée comme indicateur, jusqu'à la coloration rosée. Pour la mensuration du pH on a utilisé un pH-mètre Denver qui a été utilisé après un calibrage avec de solutions standard, fraîchement préparées, avec pH 4 et 7.

À la choix de la variante optimale d'association des trois cultures on a tenu compte de la pointage accordée par 10 dégustateurs (étudiants et professeurs) aux preuves le lait fermentée. L'analyse sensoriale de preuves a été réalisée par la méthode de pointage, après elles avaient été déposées 24 h à la réfrigération [7].

## RESULTATS

### **Inoculation simultanée de bifidobacteries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus***

Par l'inoculation simultanée des trois cultures (M2), associées en rapport de 4 : 1 : 1 (bifidobacteries : *Str. therm* : *Lb helv*), on a constaté une stimulation de la croissance de bifidobacteries, le numerus de cellules obtenues après 6 h d'incubation étant 2.4 fois grande que dans la preuves de référence (fig. 1a). Dans la même variante d'étude (M2), on a aussi observé que le numerus de bifidobacteries obtenus à la fin d'incubation était 10 fois grande, pendant que dans les preuves de références on a enregistré une croissance de seulement 4.15 fois grande vis-à-vis du numerus initial de cellules.

L'acidité développée dans la même variante d'inoculation simultanée des cultures (M2), a été 3.84 fois grande que dans la preuve inoculée avec une culture pure de bifidobacteries (tenue comme preuve de référence). Ainsi, l'acidité de la preuve M2 a cru pendant les 6 h d'incubation de la valeur de 1.6114 à 7.659 g acide lactique/dm<sup>3</sup> (fig. 1b). Proportionnellement avec la croissance de l'acidité on a enregistré une réduction du pH qui à la fin du l'intervalle d'incubation était avec 1.23 unités grande que dans la preuve de référence (fig. 1c).

Dans une autre variante de culture simultanée des bifidobacteries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* (M4), mais associée en rapport de 6 : 1 : 1, la croissance de la culture probiotique a été réduite, le numerus de cellules obtenue après 6h d'incubation étant 1.10 fois grande que dans la preuves de référence. Les résultats obtenus ont aussi prouvés que vis-à-vis de la variante examinée antérieur, le numerus de bifidobacteries obtenus a la fin d'incubation a été 2.17 fois réduit. En ce qui concerne l'acidité et le pH de la preuve M4 on n'a pas enregistré des différences significatives vis-à-vis de la variante précédente (M2).

Par l'association simultanée de bifidobacteries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* en rapport de 4 : 2 : 2 (M5), la croissance de la culture probiotique a été de même sorte réduite que dans la variante M4. Par comparaison avec la variante M2, on a constaté que le numerus maximal de cellules obtenues dans la preuve M5 était 2.14 fois réduit a la fin des 6 h d'incubation. L'acidité développée dans la variante M5 a touché la plus élevée valeur, étant avec 6.3342 g acide lactique/dm<sup>3</sup>

grande après les 6 h d'incubation. Quoique cette valeur a été insensiblement élevée que dans la variante M5, la croissance de l'acidité vis-à-vis de M1, inoculée avec une culture pure de bifidobactéries, elle a été 4.03 fois grande. Par l'analyse des dates obtenues on a observé que aussi dans le cas du pH la preuve M5 a enregistré la plus diminuée valeur, qui a été avec 1.25 unités réduit que dans la preuve M1 et avec 1 unité réduite que dans la preuve M3, les deux preuves étant inoculés avec des cultures pures des bifidobactéries.

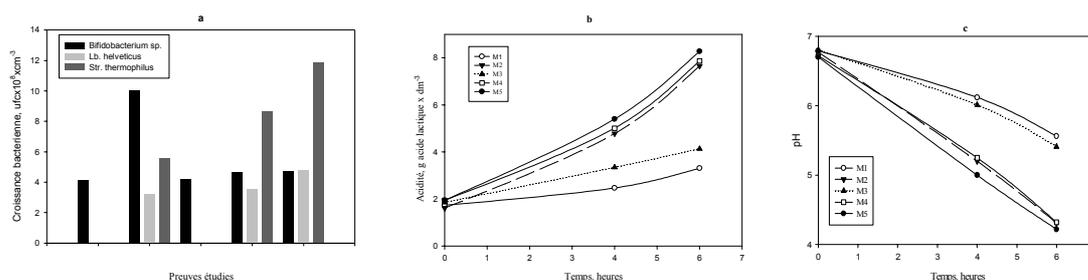


Figure 1. La croissance et l'activité des bifidobactéries dans le cas d'inoculation simultanée des cultures: a) la croissance des bifidobactéries dans les cultures pure et mixtes avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ; b) l'évolution de l'acidité dans les preuves étudiés pendant l'incubation ; c) l'évolution du pH dans l'échantillons étudiés

### Inoculation décalée avec 4 h du *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* vis-à-vis des bifidobactéries

Dans la variante M6, obtenue par la culture décalée des trois cultures, associées en rapport de 4 :1 :1 (bifidobactéries : *Streptococcus thermophilus* : *Lactobacillus helveticus*), on a observé que les bifidobactéries étaient 2.46 fois nombreuses après les 10 h d'incubation (fig. 2a). A l'encontre de la preuve M2 qui a été inoculée simultanée avec les trois cultures associées dans le même rapport, on a constaté que le numerus de bifidobactéries était 1.65 fois réduit. Aussi, on a encore observée que le numerus de bifidobactéries obtenus a la fin de la période d'incubation dans la variante M6 a été 1.6 fois réduit que dans la preuve de référence (M1). Concernant à l'acidité on peut dire que à la fin de la période d'incubation a été 2.92 fois grande que dans la preuve de référence (M1), en considérant les valeurs obtenues après l'adjonction des cultures lactiques classiques (fig. 2b). Proportionnellement avec la croissance de l'acidité on a enregistré une réduction du pH avec 2.36 unités vis-à-vis de la valeur initiale, c'est-à-dire 1.55 fois réduite que dans la preuve de référence (fig. 2c).

En utilisant le même intervalle de décalage des cultures, mais associées dans une autre rapport (6 :1 :1), la croissance des bifidobactéries n'était pas meilleure que dans la variante précédente, et le numerus de cellules obtenue à la fin de la période d'incubation était 2.43 fois réduit que dans M1. L'acidité développe sur la preuve M7 a été avec 0.41 g acide lactique/dm<sup>3</sup> réduite que celle de la preuve M6. En ce qui concerne le pH on n'a pas enregistré des différences significatives vis-à-vis de la variante antérieurement présentée.

Dans le cas de la variante M8 d'inoculation décalée de cultures, mais associées dans le rapport 4 :2 :2, on a obtenues un numerus de bifidobactéries plus grande que dans les variantes antérieurement présentée, et proche de celle de la preuve de référence M3

( $1.055 \times 10^9$  ufc/cm<sup>3</sup>). L'acidité de la preuve M7 a cru pendant les 10 h d'incubation avec 6.04 g acide lactique/dm<sup>3</sup>, et le pH a été réduit avec 2.48 unités.

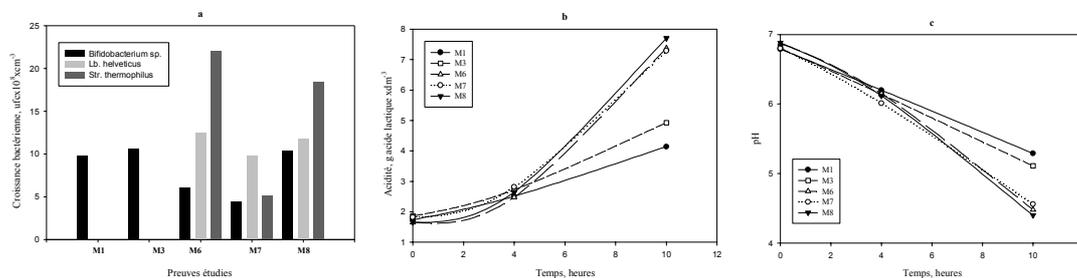


Figure 2. La croissance et l'activité des bifidobacteries pour le cas d'inoculation décalée avec 4h des cultures : a) la croissance des bifidobacteries dans les cultures pures et mixtes avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* ; b) l'évolution de l'acidité dans les preuves étudiés; c) l'évolution du pH dans l'échantillons étudiés pendant l'incubation

## DISCUSSIONS

Sous l'aspect de la croissance des bifidobacteries, dans le cas d'inoculation simultanée avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*, on a remarqué la variante M2, avec les trois cultures associées en rapport de 4 : 1 : 1, dans laquelle on a obtenu un numerus maximal de cellules après 6h, le grand numerus de bifidobacteries d'échantillon M2 est en concordance avec la croissance réduite de l'acidité de cette échantillon, vis-à-vis de celle enregistrée sur les autres variantes mixtes.

En tenant compte du fait que les bifidobacteries ne sont pas acido-tolérantes, il est possible que le numerus de bifidobacteries sur M5 et M5 soit plus grande, mais la croissance rapide de l'acidité aurait diminué leur numerus.

Par l'inoculation décalée on a surveillé que les bifidobacteries bénéficier d'une période d'adaptation au milieu avant que les cultures de bactéries lactiques classiques fussent ajoutées dans le milieu de culture, en vue de la prévention d'acidification rapide du milieu avec un négatif effet sur les probiotiques. Mais par l'analyse des dates a résulté que l'adjonction des cultures de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* après 4 h vis-à-vis de bifidobacteries, semble avoir un petit effet inhibiteur sur la culture probiotique, fait constaté par comparaison avec les preuves de référence. De plus, il semble que par cette culture décalée avaient été avantagées les cultures *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus*, qui avaient enregistrées des rates de croissance presque doubles sur les variantes décalées vis-à-vis de celles inoculées simultanément.

Au choix de la variante optimale d'association des trois cultures on a tenu compte des résultats obtenus, mais aussi des appréciations sensoriales des dégouttants. Il doit être mentionné que les preuves avec cultures mixtes, inoculées simultanément, ont été dépointées due à l'acidité élevée, la majorité des dégouttants en y considérant les preuves de référence meilleurs. Pourtant, la variante M2 a obtenu finalement le plus élevé pointage.

## CONCLUSIONS

Due à les résultats obtenus on recommande la culture de bifidobacteries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* en vue de la stimulation de la croissances des bifidobacteries dans le lait, avec la spécification que les trois cultures soient ajoutées simultanément. Aussi, on considère qu'il est important que l'incubation ne soit pas plus longue de 5 h pour la prévention d'obtention d'une acidité élevée avec un négatif effet sur la viabilité de bifidobacteries.

Dans le cas d'association de bifidobacteries avec *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* on recommande l'adjonction des trois cultures en rapport de 4 : 1 : 1, si on désire l'obtention d'un produit laitier probiotique caractérisée par un grand nombre de bifidobacteries ( $1.13 \times 10^9$  ufc/cm<sup>3</sup>) et par des attributs sensoriales remarquables.

**REMERCIEMENTS :** Cette étude a été réalisée grâce au prof. dr. ing. Constantin Banu d'Université « Dunarea de Jos » Galați, Faculté des Science et Ingénierie d'Alimentes.

## REFERENCES

1. Baron, M., Roy, D., Vuilleumard, J.C.: Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed- cultures of lactic acid starters and bifidobacteria, *Lait*, **2000**, 80, 465-478
2. Dan, V. s.a.: *Îndrumar de lucrări practice la microbiologie*, Universitatea Galați, Galați, **1985**, pp. 48-51
3. Dave et al.: Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt, *Journal of Dairy Science*, **1998**, 81, 2804-2816
4. Roy, D.: Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, **2001**, 69, 167-182
5. Sultana, K. et. al: Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal condition and in yoghurt, *International Journal of Food Microbiology*, **2000**, 62, 47-55
6. Knut J. Heller: Probiotic bacteria in fermented food: product characteristics and starter organisms, *American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 73(suppl), 374S-9S
7. Segal, B., Dan, V. s.a.: *Determinarea calității produselor alimentare*, Ceres, București, **1985**, pp. 23-45; 253-273
8. Shah, N.P.: Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, **2000**, 83, 894-907
9. Stanton et al.: Market potential for probiotics, *American Journal of Clinical Nutrition*, **2001**, 73, (suppl), 476S-83S
10. Vinderola, C.G., Mocchiutti, P. and Reinheimer, J.A.: Interaction among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products, *Journal of Dairy Science*, **2002**, 85(4), 721-729
11. \*\*\*: Bifidobacteria in Foods, *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* (Macrae, R., Robinson, R. K., Sadler, M.J.), No. 2, Academic Press, New York, **1993**, pp. 374-377