

## INFLUENCE DE LA MATIERE SECHE DANS LE LAIT SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITE FERMENTATIVE DES BIFIDOBACTERIES

**E. Barascu**

*Université Valahia Targoviste, Faculté d'Ingénierie d'Environnement et  
Biotechnologies, Cathédre de la Technologie des Produits Alimentaires,  
18-24 Rue Unirii, e-mail : [elbarascu72@mail.com](mailto:elbarascu72@mail.com) et  
[elenabarascu@valahia.ro](mailto:elenabarascu@valahia.ro)*

**Résumé:** Dans cet ouvrage on a surveillé la croissance et l'activité métabolique des bifidobactéries dans le lait reconstitué, avec un contenu variable de substance sèche, en vue de la détermination des conditions optimales de culture des bifidobactéries sur les cultures singulières. Aussi, on a surveillé l'obtention des dates utiles dans la technologie des produits laitiers probiotiques qui contiennent seulement des bifidobactéries, étant connu le fait que, en présent, elles sont associées avec des bactéries lactiques classiques dans les produits probiotiques disponible dans le monde.

Les dates obtenues ont montré le fait que le lait reconstitué avec 12.4% substance sèche dégraissée assurait le plus élevé numerus des bifidobactéries, mais l'utilisation du lait poudre dans une plus grande proportion n'était pas justifié parce qu'il ne conduisait pas à une croissance proportionnelle du numerus de cellules. L'acidité développée pendant l'incubation sur les preuves étudiées a été maximale toujours dans la variante avec 12.4% substance sèche dégraissée, fait qui peut être corrélé avec la meilleure croissances des bifidobacteries sur cet milieu.

**Mots clé:** *bifidobactéries, croissance, activité métabolique, lait poudre, produits laitiers probiotiques*

**Abstract:** In this study was monitored the growth and the activity of bifidobacteria in reconstituted milk, with different content of nonfat dry milk, in order to obtain optimal conditions of culture for this bacteria. In addition, the possibility to obtaining the useful date for the technology of probiotic milks, fermented with bifidobacteria in pure cultures, was evaluated. In the present, the most probiotic fermented milks available in the marketplace contain mixed cultures of bifidobacteria and other lactic acid bacteria.

Milk with 12.4% nonfat dry milk provides the most numbering population of bifidobacteria. The utilization of nonfat dry milk in concentration more than 12.4% is not justified because the growth of bifidobacteria is not proportional with the addition of nonfat dry milk. The developed acidity during the incubation was greatest in the same sample (with 12% nonfat dry milk) and this was correlated with the best growth of bifidobacteria.

**Keywords:** *bifidobacteria, growth, metabolic activity, nonfat dry milk, probiotic dairy products*

## INTRODUCTION

Les bifidobactéries forment le plus important group de bactéries intestinales pour la santé de l'homme. Elles s'installent dans un court temps après la naissance et devient le group dominant de bactéries (92%) dans la microbiota intestinale des nouveau-nés naturellement alimentées [5, 8]. Dans le cas des nouveau-nés artificiellement alimentés, les bifidobactéries représentent seulement 20% de la microbiota intestinale, et pour ce motif-là ils sont sensibles aux infections. Ces bactéries peuvent inhiber les coliformes, les entérocoques et les clostridies par leurs produits de métabolisme ou par le consomme de nutriments présentes dans les zones de fixation sur le mur intestinal, de cette manière elles étant capables d'améliorer la microbiota anormale installée en certaines conditions aux hommes. Ainsi, la présence des bifidobactéries dans une grande concentration dans la microbiota intestinale de l'homme est désirable, mais le numerus de ces bactéries, considérées probiotiques, peut être influence positivement par les suppléments alimentaires avec bifidobactéries [11].

On retrouve les bifidobactéries sous une forme de bâtonnets avec un aspect variable, cellules courtes, cocoidales, ramifiées, bifurquées, spatulées, isolées ou en chaîne, dispose en palissade. Leur nom provient par les formes en Y ou V que les cellules présentes en certaines conditions de culture. Ces bactéries sont anaérobies, Gram-positives, immobiles, non sporulées [6, 7]. Elles sont considérées des microorganismes nutritionnellement prétentieux, parce que pour leur culture il faut qu'on assure des facteurs de croissances spécifiques. Ainsi, les peptides sont considérés des sources d'azote adéquates pour la croissance des bifidobactéries et, en général, on considère que elles sont préférées à celles avec une masse moléculaire entre 948 et 2319 Da. La majorité des espèces nécessite riboflavine et pantothenate pour la croissance, pendant que les exigences pour autres vitamines varient beaucoup entre les espèces [1, 9].

Parmi les produits laitiers commercialisés au niveau mondial on retrouve fréquemment les suivantes espèces d'origine humaine : *Bifidobacterium bifidum*, *B longum*, *Bifidobacterium breve* et *Bifidobacterium infantis* [2]. Ces bactéries se développent lourdement sur le lait de vache, ce dernier étant considéré un « milieu artificiel » pour leurs culture due au fait qu'il ne satisfait pas leurs exigences nutritionnelles en sources d'azote facilement assimilable [11]. Pour ce motif-là, pour l'amélioration de la croissance des bifidobactéries sur le lait et pour la réduction de la période d'incubation on pratique leur association avec d'autres bactéries lactiques (spécialement avec *Streptococcus thermophilus*) [1, 9]. Aussi, pour le même but de stimulation de la croissance des bifidobactéries sur le lait on a obtenu des résultats satisfaisantes dans le cas d'utilisation des sources exogènes d'azote facilement assimilables (peptides, petit lait, concentré protéique du petit lait, hydrolysé acide de caséine) [4].

La clé d'une efficiente fermentation avec des bifidobactéries dans le but d'obtention des produits laitiers acides est la maintenance d'un milieu anaérobie due à leur sensibilité à l'oxygène. Aussi, on connaît le fait que pour une meilleure croissance des bifidobactéries il était nécessaire de maintenir un  $pH > 5.5$ , les valeurs du  $pH$  sous 5 étant accompagnées d'une réduction du procès de multiplication. Mais, en ce qui concerne la température optimale de la croissance des bifidobactéries, elle doit être environs les valeurs de 37-41°C pour les espèces d'origine humaine [10, 11].

Dans des nombreuses études on a utilisé des milieux de culture ayant comme principale élément le lait reconstitué avec un contenu variable de substances sèches sans être justifié la choix des respectives proportions. De plus, on connaît le fait que pour la fabrication des produits laitiers acides on utilisait le supplément du lait poudre pour l'amélioration de leur consistance. Par conséquence, dans cet travail on a surveillé l'évolution des bifidobactéries sur le lait reconstitué, avec un contenu variable de substance sèche du lait poudre, en vue de la détermination des conditions optimale de culture des ces bactéries probiotiques sur les cultures singulières. On a aussi surveillé l'obtention des dates utiles pour la technologie de la fabrication des produits laitiers probiotiques qui contient seulement des bifidobactéries.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Caractérisation de la culture probiotique**

En cette étude on a utilisé une culture probiotique (*Bif. species 420*, Danisco Cultor, Allemagne), caractérisée par une modérée capacité d'acidification et d'aromatisation, tolérance à l'acidité et rate de survivances très bonnes. Le fournisseur de cultures recommandait cette culture-là pour l'obtention de lait fermenté.

Dans la phase antérieure à l'ensemencement, la culture étudiée a été individuellement suspendu sur le milieu de base (Mo = lait reconstitué avec 12,4% substance sèche dégraissé du lait poudre) pour l'hydratation des cellules et uniformisation de l'inocule.

### **Préparation des variantes de lait fermenté**

Pour l'étude de l'influence de la substance sèche du lait poudre sur la croissance des bifidobactéries on a réalisé 6 variantes de lait reconstitué. Ainsi, pour la réalisation des variantes de lait reconstitué on a réalisé les suivantes proportions de substance sèche (du

lait poudre) : 9.4% ; 10.9% ; 12.4% ; 13.9% ; 15.4% et 16.9%. La variante de lait avec 9.4% substance sèche sera utilisée comme preuve de référence.

Les preuves de lait reconstitué ont été pasteurisées à 80-85°C (dans l'autoclave avec le ventile ouvert) pendant 15 minutes. Après ça, elles ont été rafraîchies à 40°C en vue d'inoculation avec des bifidobactéries. La culture probiotique a été inoculée dans la même proportion dans toutes les variantes de lait reconstitué (4%).

Les preuves inoculées ont été incubées à 37°C pendant 32 heures, c'est-à-dire jusqu'à la coagulation.

Immédiatement après l'incubation, les preuves de lait fermenté ont été rafraîchies et maintenues aux températures de réfrigération.

### **Evaluation microbiologique et physico-chimique des preuves de lait fermenté**

Pour l'appréciation d'évolution des bifidobactéries pendant l'incubation, on a fait des moissonnes aseptiques de lait immédiatement après l'inoculation, à 8 h, à 24 h et au fin de la période d'incubation, c'est-à-dire après 32 h.

L'évaluation du numerus des bactéries probiotiques sur les variantes de lait étudiées, aux intervalles de temps mentionnés au-dessus, a été fait après la dilution des preuves de lait récoltées aseptiquement en system décimale. Après, on a effectué des frottis et colorées pour la détermination du numerus des bifidobactéries (exprimé en ufc/cm<sup>3</sup>) par la méthode directe Breed [3].

Pour le calcul de la rate de croissances ( $\mu$ ) on a utilisé la suivante relation [12] :

$$\mu = \frac{(\log_{10} N - \log_{10} N_0) \times 2.303}{(t - t_0)} \quad (1)$$

$N_0$ - numerus de cellules au moment initial (0 h), en ufc/cm<sup>3</sup> ;

$N$ - numerus de cellules à la fin d'incubation, en ufc/cm<sup>3</sup> ;

$t_0$ - moment initial d'incubation, en heures ;

$t$ - moment final d'incubation, en heures ;

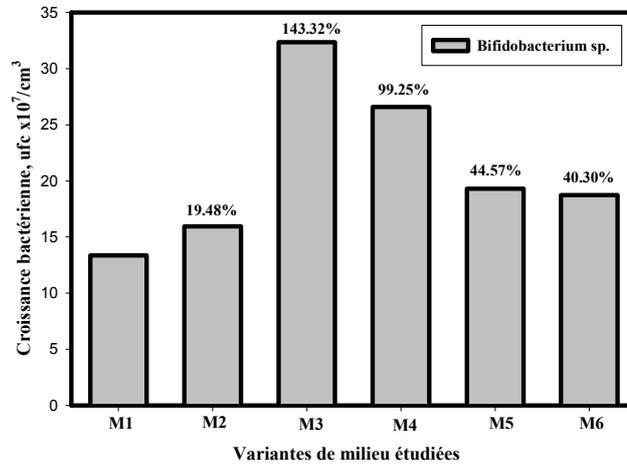
Dans toutes les variantes étudiées, parallèlement avec le procès de multiplication on a aussi surveillé l'activité fermentative de la culture probiotique, aux mêmes intervalles du temps, par la détermination de l'acidité titratable. L'acidité a été exprimée en gramme acide lactique/dm<sup>3</sup> et elle a été déterminée par titrage avec NaOH 0.1N en présence de la phénophthaléine, utilisée comme indicateur, jusqu'à la coloration rosée.

## **RESULTATS**

### **Rôle de la substance sèche du lait sur le procès de multiplication des bifidobactéries**

Par l'optime incubation des bifidobactéries, inoculées dans la même proportion, on a observé une modérée croissance du numerus de cellules sur les milieux étudiés. Ainsi, après les premières 24 h d'incubation on a constaté que le plus réduit numerus de cellules avait été obtenu dans la variante M1 (9.4% substance sèche du lait poudre), dans lequel les bifidobactéries ont été 8.6 fois nombreuses qu'au début du procès de multiplication. On a aussi observé que la croissance des bifidobactéries a été proportionnelle avec l'agrandissement du supplément du lait poudre du milieu jusqu'à la

12.4% substance sèche, et après, la croissance du nombre de cellules a été facilement diminuée, mais supérieure que celle de la preuve de référence (figure 1).



**Figure 1 :** Situation des populations de bifidobactéries au fin de la période d'incubation, dans les preuves du lait avec un variable contenue en substance sèche : M1 (preuve de référence)= lait reconstitué avec 9,4% substance sèche dans le lait poudre; M2= lait reconstitué avec 10,9% substance sèche; M3= lait reconstitué avec 12,4% substance sèche ; M4= lait reconstitué avec 13,9% substance sèche; M5= lait reconstitué avec 15,4% substance sèche et M6= lait reconstitué avec 16,9% substance sèche

Par l'analyse des résultats obtenues on a remarqué que la plus nombreuse population de bifidobactéries a été enregistré sur le milieu M3 (12.4% substance sèche) dans lequel le nombre de cellules a été 22.2 fois grande que celui initial. Ainsi, le nombre de cellules réalisé dans ce milieu a été avec 158.65% plus grande que celui enregistré dans la preuve de référence.

Dans le cas de la variante de milieu M4 (13.9% substance sèche) la croissance des bifidobactéries a été proche à celle obtenue sur le milieu M3 dans le sens que la population enregistrée après 24 h d'incubation avait été 18.15 fois nombreuse, c'est-à-dire 2.12 fois plus grande que dans la preuve de référence.

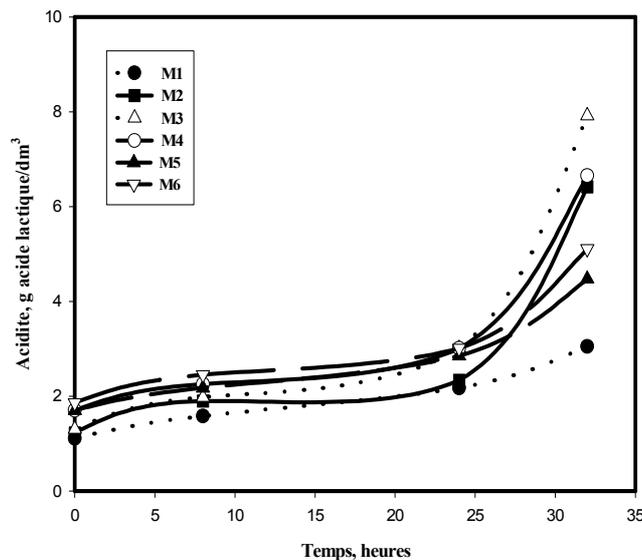
En conclusion, le nombre de cellules enregistré pendant les premières 24 h d'incubation a été inclus entre  $7.75 \times 10^7$  et  $24.5 \times 10^7$  ufc/cm<sup>3</sup>, et la rate de croissance des bifidobactéries sur ces milieux, calculée par l'équation antérieurement présentée (1), a été placé entre les valeurs  $0.09$  et  $0.13 \text{h}^{-1}$ .

Pendant l'intervalle 24-32h d'incubation on n'a pas enregistré une croissance extraordinaire des bifidobactéries, mais toujours la preuve M3 c'était celle qui se mettait en évidence par le nombre maximal de cellules ( $3.2 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>). La population de bifidobactéries obtenue sur ce milieu au fin de la période d'incubation a été 2.42 fois nombreuse que dans la preuve de référence.

Dans la variante M4 (13.9% substance sèche), le nombre de bifidobactéries enregistré au fin de la période d'incubation a été proche à celui obtenue dans la preuve M3, c'est-à-dire 2 fois nombreuse que dans la preuves de référence.

**Influence de la substance sèche du lait sur le procès fermentatif des bifidobactéries**

Par l'analyse des dates obtenues pendant les premières 24 h d'incubation, on a observé que l'acidité développée sur les preuves étudiés avait cru proportionnellement avec le supplément de lait poudre jusqu'à la 12.4% substance sèche, moment après lequel la pousse de l'acidité a été réduite, mais supérieure à celle de la preuve de référence. Aussi, on a observé que l'activité fermentative des bifidobactéries pendant les premières 24 h d'incubation avait été plus lente, l'acidité enregistrée sur les milieux étudiés étant incluse entre 2.17-3.01 g acide lactique/dm<sup>3</sup> (fig. 2).



**Figure 2:** Evolution de l'acidité pendant les 32h d'incubation à 37°C sur les preuves de lait analysés : M1 (preuve de référence)= lait reconstitué avec 9,4% substance sèche dans le lait poudre; M2= lait reconstitué avec 10,9% substance sèche; M3= lait reconstitué avec 12,4% substance sèche ; M4= lait reconstitué avec 13,9% substance sèche; M5= lait reconstitué avec 15,4% substance sèche et M6= lait reconstitué avec 16,9% substance sèche

On a aussi constaté que l'acidité développée n'avait pas variée significativement entre les preuves, mais elle avait atteinte une valeur maximale sur la variante M3 (12.4% substance sèche), valeur qui était avec 59.25% plus grande que dans la preuve de référence. Quoique le M3 se fût remarqué par la valeur supérieure de l'acidité, il faut qu'on mentionne que sur ce milieu la pousse de l'acidité pendant les premières 24 h d'incubation a été seulement de 1.7 g acide lactique/dm<sup>3</sup>.

Dans les mêmes conditionnes de travail, des bonnes résultats ont aussi obtenues sur la variante avec 13.9% substance sèche du lait poudre (M4), où l'acidité obtenue après les premières 24h d'incubation avait été 1.22 fois grande que dans la preuve de référence. Par comparaison avec la preuve antérieurement présentée (M3), l'acidité enregistrée sur M4 a été 0.4 g acide lactique/dm<sup>3</sup> réduite.

Sur l'intervalle 24-32h d'incubation a eu lieu la coagulation des preuves, avec l'exception du M1, mais l'acidité développée pendant les 8h d'incubation a été incluse

entre les valeurs 0.871 et 4.91 g acide lactique/dm<sup>3</sup>. La plus grande pousse de l'acidité a été enregistrée toujours dans la variante M3 (12.4% substance sèche), et elle est aussi remarquée à 24h, mais cette a été 5.63 fois grande que dans la preuves de référence.

L'analyse succincte des dates a aussi montrée que dans la variante M2 (10.9% substance sèche) avait eu lieu une significative pousse de l'acidité pendant les dernières 8h, qui a été 4.68 fois grande que dans la preuve de référence, mais vis-à-vis de la variante M3 a été 1.2 fois réduite. Aussi, on a observé que la variante M4 (13.9% substance sèche) avait enregistré une pousse d'acidité 4.18 fois grande que celle de la preuve de référence, mais cette a été réduite que celle enregistrée sur la variante antérieurement pressente seulement avec 0.435 g acide lactique/dm<sup>3</sup>.

Les variantes M5 (15.4% substance sèche) et M6 (16.9% substance sèche) n'étaient pas remarquées par une pousse significative de l'acidité, mais cette acidité avait été supérieure à celle enregistrée sur la preuve de référence avec 86% et, respectif, 141.12%.

## DISCUSSION

Pendant les premières 24 h d'incubation on a remarqué une lente pousse des bifidobactéries sur les milieux étudiés et, parce que la croissance du numerus des cellules a été proportionnelle avec le supplément du lait poudre jusqu'à la 12.4% substance sèche, mais après a été facilement réduit, il était évidente que la période d'adaptation des bactéries avait été influencé par la proportion de substance sèche du milieu. Aussi, il était possible que le supplément de lait poudre dans une concentration plus grande, par exemple sur les variantes M4-M6, d'avoir aussi un petit effet inhibiteur sur le procès de multiplication des bifidobactéries.

Comme nous avons antérieurement mentionné, la croissance du numerus de cellules pendant les dernières 8 h d'incubation n'était pas spectaculaire, mais on peut affirmer que le numerus maximale de cellules ( $3.23 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>), obtenue au fin de la période d'incubation sur la variante M3 (12.4% substance sèche), était suffisamment grande pour compenser les éventuelles pertes de cellules qui ont lieu pendant la maintenance au froid ainsi que, dans le moment du consume cet produit accomplit la condition de probiotique, c'est-à-dire de contenir  $10^6$  ufc/cm<sup>3</sup> cellules viables.

La difficile croissance des bifidobactéries dans le lait ou l'incapacité des certaines espèces de croître sur cet milieu sont en corrélation avec leurs nécessité en facteurs de croissance (amine saccharide, caséine bovine digérée, extrait de levure), étant considérées des bactéries prétentieux vis-à-vis des sources d'azote facilement assimilables. En ce qui concerne l'incapacité de certaines espèces de bifidobactéries de croître sur des milieux de lait, on suppose qu'elle provienne par le lacune d'enzymes protéolytiques dans l'équipement enzymatique de ces bactéries, étant, de cet manière manquées de la possibilité d'assurer pour elles-mêmes des sources d'azote facilement assimilables [1].

En ce qui concerne l'évolution de l'acidité des preuves étudiées on a constaté que la pousse de l'acidité a été proportionnelle avec l'agrandissement du supplément de lait poudre jusqu'à 12.4% substance sèche, mais après, la pousse a été plus lente mais supérieur vis-à-vis de la preuve de référence. Cette évolution de l'acidité est en corrélation avec la réduite croissance des bifidobactéries sur le milieu avec un élevé contenue de lait poudre.

Kosikowska [11] soutient que les souches de *Lactobacillus bifidus* (maintenant connu comme *Bifidobacterium bifidum*) se caractérisent par une différente capacité d'acidification du lait. Il a observé que l'acidité titrable pour des différentes souches de *Bifidobacterium bifidum*, après 48 h d'incubation, avait varié entre les limites 0.60 et 1.40% acide lactique. Aussi, Collins et autres [11] ont obtenu des acidités titrables comprises entre 0.6 et 1.27 sur le lait ultra-filtré après 24 h d'incubation. Des valeurs de l'acidité titrable voisines à 6 g acide lactique/dm<sup>3</sup>, c'est-à-dire la limite inférieure mentionnée par Kosikowska, avaient été atteintes par la culture utilisée dans notre expérimentation pendant les premières 32h (sur les variantes M2, M3 et M4) d'incubation à 37°C.

## CONCLUSIONS

La conclusion de cet expérimentation a été celle conformément à laquelle la substance sèche du lait influençait la croissance et l'activité des bifidobactéries. Ainsi, on a observé que par leur culture sur le lait reconstitué avec 12.4% substance sèche (du lait poudre) on pouvait obtenir du lait fermenté avec une satisfaisante population de bifidobactéries ( $3.23 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>), dans le sens que cet produit fournirait au consommateur la minimale dose thérapeutique de  $10^6$  cellules de *Bifidobacterium*/cm<sup>3</sup>. Il faut qu'on mentionne que la grande période d'incubation (32 h) a été aussi influencée par le réduit pourcentage d'inoculation (4%), dans la majorité des études effectuées les bifidobactéries étant utilisées en proportion de 10% vis-à-vis du milieu.

En ce qui concerne l'activité fermentative des bifidobactéries, on a observé qu'elle a été beaucoup influencée par le nombre de cellules réalisées, en touchant la plus élevée valeur (7.92 g acide lactique/dm<sup>3</sup>) toujours dans la variante de lait reconstitué avec 12.4% substance sèche dégraissée.

La rapide croissance et l'acidification dans un court temps du lait sont des caractéristiques désirables pour les bifidobactéries mais, comme on avait observé dans cette étude aussi, l'utilisation du pur lait pour la culture de ces bactéries, n'offrait pas des extraordinaires résultats. Pour ce motif-là, on considère qu'il ne devait pas négliger le fait qu'il y avait des possibilités pour l'amélioration des performances des bifidobactéries sur le lait par l'utilisation des substances avec un effet stimulateur sur leur croissance et activité fermentative.

**REMERCIEMENTS :** Cette étude a été réalisée grâce au prof. dr. ing. Constantin Banu d'Université « Dunarea de Jos » Galati, Faculté des Industries Alimentaires, Aquaculture et Pêche.

## REFERENCES

1. Abu-Taraboush, H.M. et al: Growth, Viability and Proteolytic Activity of Bifidobacteria in Whole Camel Milk, *Journal of Dairy Science*, **1998**, 81, 354-361
2. Chandan, R.C.: Enhancing market value of milk by adding cultures, *Journal of Dairy Science*, **1999**, 82, 2245-2256
3. Dan et al.: *Îndrumar de lucrări practice la microbiologie*, Universitatea Galați, Galați, **1985**, pp. 48
4. Dave et al.: Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt, *Journal of Dairy Science*, **1998**, 81, 2804-2816

5. Desjardine, M.L. et al.: Uncoupling of Growth and Acid Production in Bifidobacterium ssp., *Journal of Dairy Science*, **1990**, **73**, 1478-1484
6. Gournier-Chateau, N., Larpent, J.P.: *Les Probiotiques en Alimentation Animale et Humaine*, Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, **1994**, pp. 107-113
7. Leveau, J.Y., Bouix, M.: *Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel*, Lavoisier, Paris, **1994**, pp. 374-384
8. Modler, W.H.: Bifidogenic Factors-Sources, Metabolism and Application, *Lait*, **1994**, **74**, 383-402
9. Proulx, M. et al.: Utilisation d'hydrolysats enzymatiques de caséine pour la croissance des bifidobactéries, *Lait*, **1992**, **72**, 393-404
10. Shah, N. P.: Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods, *Journal of Dairy Science*, **2000**, **83**, 894-907
11. Ventling, B.L. and Mistry, V.V.: Growth Characteristic of Bifidobacteria in Ultrafiltered Milk, *Journal of Dairy Science*, **1993**, **76**, 962-971
12. \*\*\*: Growth of Bacteria, [www-micro.msb.le.ac.uk/LabWork](http://www-micro.msb.le.ac.uk/LabWork)