

## EFFET DU SUPPLEMENT DU MIEL SUR LA CROISSANCE ET L'ACTIVITE DES BIFIDOBACTERIES DANS LE LAIT

**E. Bărăscu**

*Université Valahia Targoviste, Faculté d'Ingénierie d'Environnement et  
Biotechnologies, Cathèdre 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 cette étude on a surveillé la croissance et l'activité métabolique des bifidobactéries sur le lait avec un supplément de miel polyfleur, en vue de la valorisation des résultats obtenus dans la technologie des produits laitiers symbiotiques, étant connu le fait que le miel est une source de prebiotiques. De plus, pendant les derniers ans, on a beaucoup essayé d'utiliser des ingrédients naturels dans la fabrication des produits alimentaires pour offrir aux consommateurs une gamme diversifiée de produits sains.

Le supplément du miel, en proportion de 1% et 2%, améliore la croissance des bifidobactéries dans le lait, les populations de bactéries obtenues sur ces variantes de milieu étant supérieures à celle enregistrée dans la preuve sans édulcorant.

L'effet stimulateur du miel est plus accentué sur l'activité fermentative que sur la croissance des bifidobactéries, mais l'acidité développée pendant l'incubation a été maximale toujours dans la variante de lait avec 1% miel.

**Mots clé:** *bifidobactéries, miel polyfleur, croissances, activité fermentative, produits laitiers symbiotique, édulcorant naturel*

**Abstract:** In this study the growth and metabolic activity of bifidobacteria were monitored in milk containing polyflower honey, with

the intention to use results in technology of symbiotic fermented milks, because this natural syrup is a source of prebiotics. In addition, using the natural ingredients like honey to the manufacture of fermented milks seems to be an attractive solution to meet the consumers with a variety of healthy foods.

The addition of honey improved the growth of bifidobacteria in milk and bacterial populations obtained in samples with 1% and 2% honey are higher than in milk without sweetness.

In the case of metabolic activity of bifidobacteria, the stimulation effect of honey was more pronounced than the one of the growth of these bacteria, and the acidity developed during the incubation was the greatest in the sample with 1% honey.

*Keywords: bifidobacteria, honey, growth, metabolic activity, symbiotic dairy products, natural sweetness*

## INTRODUCTION

Les bifidobactéries sont des bactéries intestinales bienfaisantes pour l'organisme humaine et, pour ce motif-là, on désire leur maintenance dans un gros numerus dans la microbiota intestinale. Elles sont considérées des agents prophylactiques et thérapeutiques pour l'organisme humaine due au fait qu'elles maintient et ramènent l'équilibre microbienne favorable au santé, inhibent les bactéries pathogènes par leur produits de métabolisme, réduisent le risque de l'apparition du cancer du colon par la diminution de l'activité des enzymes responsables de la genèse des carcinogènes, ont une effet stimulateur sur le système immune, réduisent le niveau du cholestérol sérique etc. [1, 4].

Pendant les derniers ans, on avait investigué des diverses variantes d'introduction des bifidobactéries dans l'organisme humain, en vue de trouver le plus adéquat support alimentaire, qui peut assurer un gros numerus de cellules (minimum  $10^7$  ufc/cm<sup>3</sup>) dans le moment d'ingestion du produit probiotique. Dès les premières applications des bifidobactéries, on avait considéré que le lait et les produits laitiers sont les plus adéquats pour le transport de ces bactéries probiotiques dans l'organisme humain. Pourtant, l'utilisation des bifidobactéries dans l'industrie du lait a été et elle est encore difficile due au fait que le lait est considéré un milieu « artificiel » pour ces bactéries, étant pauvre en sources d'azote facilement assimilable. De cette manière, essayant de solutionner les problèmes lies à la croissance et la viabilité des bifidobactéries dans le lait et produits laitiers, ont été testées des nombreuses variantes de culture (l'amélioration du milieu de culture -lait- avec des diverses substances qui stimulent la croissance et/ ou la viabilité des bifidobactéries, la culture des bifidobactéries dans des cultures mixtes avec d'autres bactéries lactiques etc.). Ainsi, à coté des produits laitiers probiotiques, sur lesquelles les bifidobactéries sont associés avec des bactéries lactiques classiques, ont apparu des produits symbiotiques. Ces produits contient aussi que bactéries probiotique, que des substances qui stimulent la croissance des bifidobactéries « in vivo » et dénommés prebiotique [1, 4]. Les probiotiques sont des ingrédients

alimentaires nondigestibles qui influencent positivement l'organisme par la stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité d'une ou plusieurs espèces bactériennes déjà résidentes dans le colon [2]. Parmi les prebiotiques utilisés en présent sur les produits symbiotiques commercialisés au niveau mondiale, on peut mentionner les fructo-oligosaccharides (FOS), galacto-oligosaccharides (GOS), lactulose [7]. A coté d'elles ont été obtenus d'autres oligosaccharides non digestibles qui se remarquaient par leur effet prebiotique et elles sont gluco-oligosaccharides, transgalacto-oligosaccharides, xilo-oligosaccharides et oligosaccharides du soya [2, 5]. Des études réalisés in vitro ont démontré que les FOS sont spécifiquement fermentés par les bifidobactéries, fait qui a été confirmé par des testes effectués sur des volontaires saines, qui ont accepté de consumer 15g/jour des oligofructoses et d'inuline, due au fait que l'administration des oligosaccharides a été accompagnée par une importante croissance de la population de bifidobactéries qui dominait la microbiota du colon [9, 10].

Le miel est un sirop naturel qui contienne principalement de fructose (38.5%) et glucose (31.3%). Des autres glucides qui se trouvent dans le miel incluent : maltose (7.2%), saccharose (1.5%) et différentes oligosaccharides (4.2%) [1]. Les oligosaccharides du miel incluent : l'erlose, la theanderose et la panose [14]. Aussi, le miel contienne une variété d'acides organiques comme : acide acétique, butyrique, citrique, formique, gluconique, lactique et succinique, qui impriment au produit un pH autour de 3.9 [1].

Le miel a des propriétés inhibiteurs sur des certains pathogènes comme *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella thyphi*, *Salmonella thiphimurium*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholere* et *Helicobacter pylori*. Grâce à son réduit pH et à la présence de certaines enzymes comme gluco-oxydasse, catalase et lysozyme, le miel a un effet inhibiteur [1].

L'unique composition du miel suggère qu'il serait possible d'améliore la croissance et l'activité des bifidobactéries sur le lait, et le produit obtenue aurait un avantage suplimentaire par la positive image du cet édulcorant naturel. Pour ce motif-là nous avons réalisé cette étude dans lequel, à coté de la détermination d'effet du supplément du miel dans le lait sur la croissance et l'activité des bifidobactéries, le but visé était aussi l'obtention des produits symbiotiques seulement sur la base de ces bactéries probiotiques.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

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

Dans cette étude on a utilisé une culture probiotique (*Bif. species 420*, Danisco Cultor, Allemagne), caractérisée par une modérée capacité d'acidification et d'aromatisation, et de la très bonne tolérance à l'acidité et rate de survivance. 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**

En vue de la surveillance de la croissance et l'activité des bifidobactéries sur le lait avec un supplément de miel polyfleur, on a réalisé 7 variantes de milieu. Le milieu a été supplémenté en proportion de 1%, 2%, 3%, 4%, 5% et 6% (poids/volume) sur le milieu de base représenté par lait reconstitué avec 12.4% substance sèche dégraisse du lait poudre. Le milieu de base sans édulcorant a été utilisé comme preuve de référence. Les preuves de lait reconstitué ont été pasteurisés à 80-85°C (dans l'autoclave avec le ventile ouvert) pendant 15 minute. Après ça, elles ont été incubées à 40°C en vue d'inoculation avec des bifidobactéries. La culture probiotique a été ajoutée en proportion de 4% aussi dans les variantes de milieu avec miel, que dans la variante sans édulcorant. Après l'inoculation, les preuves de lait ont été incubés à 37°C pendant 48 h. Immédiatement après l'incubation, les preuves de lait fermenté ont été rafraîchis et maintenues aux températures de réfrigération.

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

En vue de l'appréciation d'évolution des bifidobactéries pendant l'incubation, on a fait des moissonnes aseptiques de lait immédiatement après l'inoculation, et aussi après 12 h, 24 h et au fin de la période d'incubation, c'est-à-dire après 48 h.

L'évaluation du numerus des bactéries probiotiques des variantes de lait étudiés, aux intervalles du temps mentionnés au-dessus, a été fait après la dilution des échantillons de lait aseptiquement récoltés en système decimale. Après ce moment-là, on a fait des préparâtes sèches et colorés pour la détermination du numerus des bifidobacteriees (exprimé en ufc/cm<sup>3</sup>) par la méthode directe Breed [3].

Pour le calcul de la rate de croissances ( $\mu$ ) nous avons utilisé la suivante relation [13] :

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

$N_0$ - 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 ;

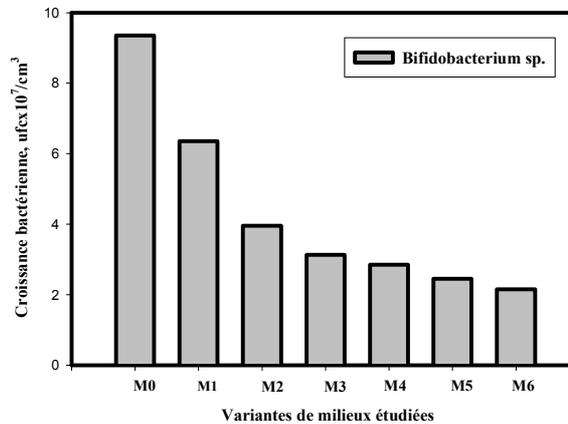
Dans toutes les variantes étudiées, parallèlement avec le procès de multiplication on a aussi surveillé l'activité fermentative de la culture des bifidobactéries, aux mêmes intervalles du temps, par la détermination de l'acidité titratable. L'acidité a été exprimée en gramme acide lactique/dm<sup>3</sup>, 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**

### **L'influence du supplément du miel polyfleur dans le lait sur la croissance de bifidobactéries**

Pendant les premières 24 h d'incubation des preuves, on a observé que les populations des bifidobactéries des variantes de lait avec miel étaient moins nombreuses que celle de la preuve de référence. Ainsi, après les premières 24 h d'incubation, la plus

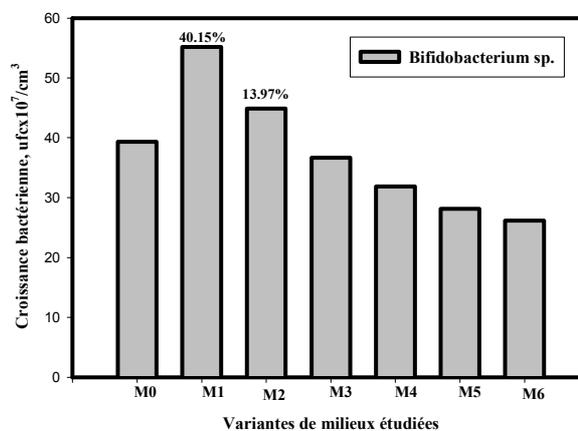
nombreuse population de bifidobactéries ( $9.35 \times 10^7$  ufc/cm<sup>3</sup>) a été obtenue dans la preuve de référence, et le numerus de cellules avait été 11.4 fois grand que celui initial (fig. 1). Aussi, on a observé que le numerus de bifidobactéries obtenue après les premières 12 h, qu'après les suivantes 12 h d'incubation, a varié inversement proportionnel avec la proportion de miel des preuves de lait étudiés.



**Figure 1:** Situation des populations de bifidobactéries dans les milieux étudiés après les premières 24h d'incubation à 37°C

De cet manière, la preuve de lait supplémenté avec miel en proportion de 1% (M1), a enregistré le plus grand numerus de bifidobactéries vis-à-vis des variantes de lait supplémentés avec cet édulcorant, mais il était 1.68 fois diminué que celle de la preuve de référence. Par comparaison avec les populations de bifidobactéries réalisés sur les autres variantes de milieu, on peut mentionné que le numerus de cellules du milieu avec 1% miel a été avec 1.4 fois grand que dans la preuve avec 2% édulcorant et 2.3 fois plus nombreux que celui obtenu dans le cas d'utilisation du miel en proportion de 6%.

En ce qui concerne la croissance des bifidobactéries pendant les suivantes 24 h d'incubation, on peut noté qu'elle avait été meilleure que pendant les premières 24 h, et les population de bifidobactéries obtenues sur les milieux étudiés ont été comprises entre  $2.7 \times 10^8$  et  $5.6 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup> (fig. 2).



**Figure 2:** Situation des populations de bifidobactéries dans les milieux étudiés au fin de la période d'incubation à 37°C

On a aussi constaté une différente évolution des populations des bifidobactéries à 48 h vis-à-vis de celle à 24 h, dans le sens que le numerus de cellules des milieux avec un supplément de 1% et 2% miel a été supérieur au numerus de cellules de la preuve de référence, et après il a été inférieur celui de la variante de lait sans édulcorant. C'est-à-dire, la plus nombreuse population de bifidobactéries avait été obtenue dans la variante avec 1% miel, et le numerus de cellules obtenu après 48 h d'incubation avait été 8 fois grandes que celui réalisé pendant les premières 24 h d'incubation. Par comparaison avec la preuve de référence, la population de bifidobactéries de la variante de lait avec 1% miel a été 1.4 fois plus nombreuse que celle enregistrée sur la variante avec lait sans édulcorant.

La rate de croissance des bifidobactéries sur les milieux étudiés, calculée par l'équation antérieurement présentée (1), a été placée entre les valeurs  $0.05$  et  $0.10h^{-1}$ , après les premières 24h.

On a enregistré une bonne évolution des bifidobactéries au fin de la période d'incubation dans la variante de milieu avec 2% miel, sur laquelle le numerus de cellules avait été avec 14% plus grande que celle de la preuve de référence et 1.2 fois diminué que celle de la variante avec 1% édulcorant. Dans ce cas, on a noté que le numerus de bifidobactéries était 10 fois grand que dans l'intervalle 24-48h d'incubation, et au fin de la période d'incubation la population de bactéries a été  $4.6 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>.

La plus réduite croissance des bifidobactéries a été obtenue sur le milieu avec 6% miel polyfleur, où le numerus de cellules a été 2 fois réduit que celui obtenu sur le milieu M1.

### **L'effet du supplément du miel polyfleur dans le lait sur l'activité fermentative des bifidobactéries**

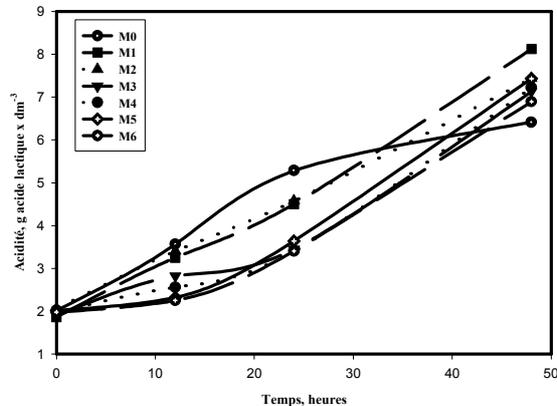
Par l'analyse des dates obtenues après les premières 24h d'incubation on a observé que l'acidité des milieux testés a lentement cru, et les valeurs enregistrées on été situées entre 3.405 et 5.284 g acide lactique/dm<sup>3</sup> (fig. 3). Quoique on n'ait pas enregistré des significatives différences entre les preuves, on a remarqué le fait que l'acidité développée sur les variantes de lait avec le supplément du miel polyfleur avait été inférieure à celle de la preuve de référence. Cette chose était en corrélation avec la réduite croissance des bifidobactéries pendant les premières 24 h d'incubation sur les milieux avec miel.

Parmi les variantes de lait avec du supplément du miel, le meilleur résultat a été obtenu dans la variante M1 (avec 1% miel polyfleur), sur laquelle on a enregistré une pousse de l'acidité de 2.6 g acide lactique/dm<sup>3</sup>. Mais, comme nous avons mentionné antérieurement, la pousse de l'acidité du milieu M1 a été inférieure vis-à-vis de la preuve de référence, étant 23.65% réduite.

Les plus faibles résultats sous l'aspect de l'acidification ont été obtenus dans les variantes de lait M4 (avec 4% miel polyfleur) et M6 (avec 6% miel polyfleur), sur lesquelles l'acidité développée pendant les premières 24 h d'incubation a été 2.3 fois réduite que dans la preuve de référence.

Au fin de la période d'incubation, c'est-à-dire après 48h, on a observée que l'acidité développée sur les variantes avec miel a été supérieure à l'acidité de la preuve de référence, et la pousse de l'acidité a été située entre 4.395 et 6.261 g acide lactique/dm<sup>3</sup>. Aussi, on a remarqué le fait que la plus parte de la pousse de l'acidité enregistrée sur les

preuves au fin de la période d'incubation a été réalisée pendant les dernières 24 h d'incubation.



**Figure 3:** Evolution de l'acidité sur les milieux étudiés pendant l'incubation à 37°C

Par l'analyse des dates obtenues on a aussi observé que la pousse de l'acidité a été inversement proportionnelle avec l'agrandissement de la proportion du miel du milieu. Donc, la plus grande valeur de l'acidité a été atteinte dans la variante avec 1% miel polyfleur (M1) et elle a été 1.42 fois grande que celle obtenue sur la preuve de référence. Quoique la plus grande acidité enregistrée au fin du période d'incubation a été noté sur le milieu M1, les résultats obtenus ont aussi montré que la pousse de l'acidité du cet milieu a été facilement réduit que sur le milieu M4 (avec 4% miel polyfleur), c'est-à-dire avec 0.202 g acide lactique/dm<sup>3</sup>.

Malgré au fait que il n'y avait pas des significatives différences entre les variantes avec édulcorant, en ce qui concerne l'activité fermentative des bifidobactéries, on a remarqué le fait que la plus lente pousse de l'acidité a été obtenue dans la variantes avec 6% miel (M6), étant avec seulement 11% plus grande que dans la preuves de référence. Par comparaison avec la variante M1, la pousse de l'acidité de la variante M6 a été 1.27 fois réduite.

## DISCUSSION

Après les premières 24 h d'incubation, on peut affirmé que le supplément du miel ne semble pas stimuler la croissance de bifidobactéries, si nous tenons compte du fait que la population de bactéries de la preuve de référence était plus nombreuse que dans les variantes avec miel. Les résultats obtenus nous permettent affirmer que la faible développement des bifidobactéries sur les milieux avec miel, pendant les premières 24 h, pouvait être expliquée par la nécessité d'un plus long temps d'adaptation de ces bactéries à ces milieux. D'ailleurs, cette chose a ete évidente à la fin de la période d'incubation quand, dans les milieux avec 1% et 2% miel (M1 et M2), les populations de bifidobactéries ont été plus nombreux dans la preuve de référence. Pourtant, la plus nombreuse population de bifidobactéries a été obtenue sur M1, et le numerus de cellules réalisé dans la période d'incubation ( $5.6 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>) était suffisamment grand pour surmonter les éventuelles pertes de cellules enregistrées dans la période de réfrigération,

ainsi qu'il accomplit la condition de probiotique, condition valable aussi pour les produits symbiotiques (c'est-à-dire de contenir des bifidobactéries vivantes dans une concentration de minimum  $10^6$  ufc/cm<sup>3</sup> dans le moment du consommé).

Ustunol soutient que l'effet du miel sur la rate spécifique de croissance des bifidobactéries est en correspondance avec la souche de Bifidobacterium et la concentration du miel utilisée [12]. Dans son étude, il a observé que le miel supplémenté en concentration de 3% et 5% a été efficace pour la stimulation de la croissance des souches de Bifidobacterium Bf-1 et Bifidobacterium Bf-6 vis-à-vis d'autres édulcorants (saccharose, glucose ou fructose).

En ce qui concerne l'activité fermentative des bifidobactéries on a observé qu'elle avait été plus faible pendant les premières 24 h d'incubation, et elle était en corrélation avec l'insignifiante croissance des bifidobactéries dans cette période. Le fait que après 48 h d'incubation l'acidité des variantes de lait avec miel a été supérieure à la preuve de référence (variante de lait sans miel), nous permet de confirmer que le miel a un effet stimulateur sur l'activité fermentative des bifidobactéries. D'ailleurs, cette observation avait été faite aussi par Ustunol et autres [1], qui ont remarqué que la production d'acide du Bifidobacterium bifidum était plus grande sur le lait avec miel qu'en présence d'autres édulcorants (glucose, fructose) ou même dans leur absence (lait sans édulcorant = preuve de référence). Il semble que le supplément de miel (en proportion de 5%) dans le lait avait déterminé une croissance de la production d'acide lactique 2.5 fois plus grande que dans le lait avec glucose et 4 fois plus grande dans le lait avec fructose.

Par l'analyse sensoriale des variantes de lait avec du supplément de miel on a constaté que l'utilisation de certaines proportions d'édulcorant au-dessus 3% n'était pas désirable due au fait que les produits fermentés obtenus ont un goût frappant de miel.

## CONCLUSIONS

Par ce travail on a remarqué le fait que le supplément de miel polyfleur dans le lait n'inhibait pas la croissance des bifidobactéries de la culture utilisée dans cette expérimentation. Au contraire, les résultats obtenus ont montré que le miel a un effet stimulateur surtout sur l'activité fermentative des bifidobactéries. Ainsi, par la culture des bifidobactéries dans le lait avec du supplément de miel, en proportion de 1%, on a observé qu'il était possible d'obtenir un produit laitier symbiotique avec une nombreuse population de bactéries ( $5.6 \times 10^8$  ufc/cm<sup>3</sup>), qui fournisse au consommateur la dose minimale thérapeutique de  $10^6$  bifidobactéries/cm<sup>3</sup>. Pour la réduction de la période d'incubation du produit une solution serait d'utiliser un plus grand pourcentage d'inoculation (10%), fait noté par la majorité des recherches du domaine.

En ce qui concerne l'activité fermentative des bifidobactéries sur le lait avec du supplément de miel, elle a été maximale (8.122 g acide lactique/dm<sup>3</sup>) sur la preuve avec 1% d'édulcorant et ce résultat-là était en corrélation avec la meilleure croissance des bifidobactéries sur ce milieu.

Malgré au fait que le miel ne s'était pas remarqué par un fort effet stimulateur sur la croissance ou l'activité des bifidobactéries, nous considérons que l'utilisation de ce sirop naturel à l'obtention des produits symbiotiques est désirable tant pour les bactéries, que pour l'image du produit, qui aurait des gains.

**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. Chick, H., Shin, H.S., Ustunol, Z.: Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Grown in Skim Milk Containing Honey, *Journal of Food Science*, **2001**, 66 (3), 478-481
2. Crittenden, R.G. and Playne, M.J.: Production, Properties and Applications of Food-Grade Oligosaccharides, *Trends in Food Science and Technology*, **1996**, 7, 353-361
3. Dan et al.: *Îndrumar de lucrări practice la microbiologie*, Universitatea Galați, Galați, **1985**, pp. 48
4. Dubey, U.K. and Mistry, M.M.: Effect of Bifidogenic Factors on Growth Characteristics of Bifidobacteria in Infant Formulas, *Journal of Dairy Science*, **1996**, 79, 1156-1163
5. Fooks, L.J. et al.: Prebiotic, probiotic and human gut microbiology, *International Dairy Journal*, **1999**, 9, 53-61
6. Ibrahim, S.A. and Bezkorovainy, A.: Growth-promoting factors for Bifidobacterium longum, *Journal of Food Science*, **1994**, 59 (1), 189-191
7. Lamoureux, L., Roy, D., and Gauthiert, S.F.: Production of Oligosaccharides in Yogurt Containing Bifidobacteria and Yogurt Cultures, *Journal of Dairy Science*, **2002**, 85, 1058-1069
8. Modler, W.H.: Bifidogenic Factors-Sources, Metabolism and Application, *Lait*, **1994**, 74, 383-402
9. Roberfroid, M.B. and Delzenne, M.N.: Dietary Fructans, *Annual Review of Nutrition*, **1998**, 18, 117-143
10. Šušković, J. et al.: Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect, Food technology and biotechnology, **2001**, 39, 227-235
11. Ustunol, Z. and Vachon, H.: Honey-Sweetened Drinkable Yogurt Shake, [www.nhb.org](http://www.nhb.org)
12. Ustunol, Z.: The Effect of Honey on the Growth of Bifidobacteria, [www.nhb.org](http://www.nhb.org)
13. \*\*\*: Growth of Bacteria, [www-micro.msb.le.ac.uk/LabWork](http://www-micro.msb.le.ac.uk/LabWork)
14. \*\*\*: Carbohydrates and the Sweetness of Honey, [www.nhb.org](http://www.nhb.org)