

## Chapitre deuxième : **Microbiologie du yaourt**

### **II. 1. Introduction**

Selon la norme [ALINORM ,2004] du Codex Alimentarius relatif aux laits fermentés et au yaourt ou yoghourt, les laits fermentés sont des produits laitiers préparés avec des laits écrémés ou non, ou des laits concentrés ou en poudre écrémés ou non, enrichis ou non de constituants du lait, ayant subi un traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation, ensemencés avec des micro-organismes appartenant à l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit. Ils ne subissent ni égouttage (ce qui les différencie des fromages), ni affinage, et sont refroidis au dernier stade de leur fabrication à une température comprise entre 0 et 6°C. La fermentation a lieu à l'aide principalement d'une microflore lactique, qui fermente le lactose en acide lactique.

Cependant et compte tenu du traitement thermique appliqué à la matière première au début de la fabrication du yaourt, la microflore pathogène est éliminée. Cependant des recontaminations peuvent avoir lieu tout le long de la chaîne de production, par le biais de l'environnement. Par conséquent, des bactéries pathogènes, des levures et des moisissures peuvent ainsi être retrouvées dans le produit fini. Néanmoins l'acidité de ce dernier (pH ≈ 4,5) limite significativement le développement de la microflore contaminante [PUJOL-DUPUY. 2004].

### **II. 2. Fermentation lactique**

La fermentation de point de vue technologique transforme le produit en modifiant dans un sens favorable ses propriétés [SAHALI et KOURNANE. 1997]. Elle est provoquée par de très nombreuses bactéries, levures et plus rarement par des moisissures [SAHALI et KOURNANE. 1997]. La fermentation lactique est une étape essentielle dans la fabrication des fromages et yaourts, des produits de charcuterie (saucisson, jambon...etc.) mais aussi de nombreux produits végétaux fermentés (olives, cornichons choucroute,... etc.), exploitant ainsi ses apports en matière organoleptique (acidification, aromatisation). Elle joue également un rôle stabilisateur par abaissement du pH et des phénomènes d'antibiose en dépit d'un grand rôle nutritionnel. [SAHALI et KOURNANE. 1997].

Selon le produit, on utilise des bactéries homofermentaires (*streptococcus*, *lactococcus*, certains *lactobacillus*,...etc.) dont le principal produit issu de la fermentation du glucose est l'acide lactique ou hétérofermentaires (*leuconostoc*, autres *lactobacillus*,...etc.) pour

lesquelles la fermentation du glucose aboutie à la formation d'acide lactique et d'autres composés tels que l'éthanol, le CO<sub>2</sub> et autres acides organiques [JOUVE et al. 1998]. Où un mélange de bactéries et de levures et rarement des moisissures [GUIRAUD. 1998].

## II. 3. Bactéries lactiques du yaourt

Le terme « bactérie lactique », désigne des bactéries produisant de l'acide lactique par fermentation des hydrates de carbonés [DESMAZEAUD. 1991]. Ce sont des cellules vivantes, procaryotes, hétérotrophes, et chimio-organotrophe [DE ROISSART. 1986]. Elles existent dans beaucoup de produits naturels, à la surface des végétaux, herbes, fruits et graines.

Dans l'industrie agro-alimentaire, laitière en particulier les bactéries lactiques constituent l'un des groupe microbiens les plus importants en raison du rôle fondamental qu'il joue dans l'élaboration de la majorité des produits laitiers tels que les fromages, les laits fermentés ( yaourt, leben, kéfir,...etc.), la crème et le beurre. De telle importance est justifiée par leur capacité à utiliser les différents constituant du lait et à générer de multiples produits influençant directement les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques des produits finis [DE VUYST et DEGEEST in WALLING et al. 2001].

Les bactéries lactiques utilisées dans la fabrication du yaourt appartiennent aux genres *streptococcus* et *lactobacillus*, il s'agit de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* [DESMAZEAUD. 1991].

### II. 3. 1. *Streptococcus thermophilus*

Habituellement, le genre *streptococcus* constitue la flore dominante du lait Ses espèces se distinguent par une acidification plus modérée, bien que la production d'acide débute à une plus grande vitesse néanmoins cette activité est presque nulle à une acidité avoisinant les 60°D [ALAIS. 1975].

Le genre *streptococcus* compte plusieurs espèces. Certaines sont pathogènes comme *S. pyogenes* et *S. agalactiae* ; d'autre sont impliquées dans la formation de la plaque dentaire (*S. mutans*). L'espèce thermophile *S. thermophilus* se différencie par rapport aux autres surtout par son habitat (lait et produit laitiers), et son caractèrpathogène. Du fait de ses propriétés, c'est la seule espèce considérée comme un streptocoque lactique [JOUVE et al.1998].

#### II. 3. 1. 1. Caractéristiques morphologiques

*S. thermophilus* se présente sous forme de cellules sphériques ou ovoïdes, de 0,7 à 0,9 µm de diamètre, regroupées en paires ou en longues chaînes. Ces dernières sont

caractéristiques des cultures en phase de croissance. Cependant, les cultures âgées présentent un polymorphisme très prononcé, les cellules apparaissent souvent déformées, très grosses et allongées [SAHALI et KOURNANE. 1997].

### **II. 3. 1. 2. Caractéristiques physiologiques**

*S. thermophilus* est une espèce thermophile, elle est caractérisée par une faible activité protéolytique [ACCOLAS et al. in CHOPARD et al. 2001], ce qui n'est pas le cas des lactobacilles thermophiles [El SOD et DESMAZEAUD in CHOPARD et al. 2001]. Elle ne se développe pas à 10°C, généralement pas au-dessous de 20°C. Il est également l'un des streptocoques les plus thermorésistants, puisqu'il survit à un chauffage de 30mn à 65°C. Il ne tolère pas des conditions de culture défavorables ; il ne croit pas en présence de 3% de Na Cl et rarement à 2% [ACCOLAS et al. 1980]. BEAL et al. in SAHALI et KOURNANE. (1997), rapportent des températures optimales de croissance se situant entre 35 à 46°C et considèrent que 6,5 étant la valeur du pH optimal [SAHALI et KOURNANE. 1997].

### **II. 3. 1. 3. Caractéristiques nutritionnelles**

*S. thermophilus* est une espèce fortement inféodée au lait, avec une aptitude réduite à dégrader d'autres sucres que le lactose. Ces exigences nutritionnelles concernent essentiellement les composés azotés de faible poids moléculaire. Donc elle ne se développe bien qu'en présence de produits d'hydrolyse de la caséine ; ce qui explique l'action symbiotique des lactobacilles avec lesquels ils se trouvent fréquemment associé, notamment dans le yaourt [ALAIS in SAHALI et KOURNANE, 1997].

### **II. 3. 1. 4. Caractéristiques biochimiques**

*S. thermophilus* est une bactérie homofermentaire, son spectre de fermentation, bien que restreint, est plus large que de *L. bulgaricus*. Il dégrade préférentiellement le lactose et le saccharose, mais utilise aussi le glucose et le fructose. Il produit exclusivement de l'acide lactique de façon rapide, mais limitée ; en effet, il est inhibé par de fortes concentrations d'acide lactique dans le milieu. Son activité non protéolytique est plus réduite que celle de *L. bulgaricus*. *S. thermophilus* est caractérisé par sa capacité de synthétiser des polysaccharides exocellulaire intervenant comme agents texturants des laits fermentés [PRESCOTT et al. 2003].

## **II. 3. 2. *Lactobacillus bulgaricus***

### **II. 3. 2. 1. Caractéristiques morphologiques**

*L. bulgaricus* est un bacille très polymorphe suivant l'âge de la culture, le milieu utilisé et la souche considérée. Les bâtonnets sont courts dans les cultures jeunes mais peuvent donner naissance à des formes extrêmement longues, dites filamenteuses dans les vieilles cultures [TERRE *in* SAHALI et KOURNANE. 1997].

### **II. 3. 2. 2. Caractéristiques physiologiques**

Cette espèce qui fait partie du groupe des lactobacilles thermophiles ne se développe pas à 15°C mais croît à 45°C. Elle n'est pas thermorésistante, elle ne se développe dans un milieu contenant 2% de sel, son pH optimal de croissance est de 5,5 [TERRE *in* SAHALI et KOURNANE, 1997]. Et elle peut croître même à pH =3,8. C'est une espèce connue pour sa forte activité protéolytique [CHAMBA *in* CHOPARD et al. 2001].

### **II. 3. 2. 3. Caractéristiques nutritionnelles**

Comme toutes les bactéries lactiques, *L. bulgaricus* présente une importante déficience biosynthétique. D'après ACCOLAS et al. (1980), cette espèce présente des exigences nutritionnelles délicates à mettre en évidence. De part sa faible aptitude à dégrader les sucres autres que le lactose. Elle est très dépendant du lait [SAHALI et KOURNANE, 1997].

### **II. 3. 2. 4. Caractéristiques biochimiques**

*L. bulgaricus* est une bactérie lactique homofermentaire [ANONYME. 2004] utilisée pour la production de yoghourts et de fromages de type petit-suisse. Outre sa fonction d'acidification du lait par fermentation du lactose en acide lactique, elle participe également à l'élaboration des qualités organoleptiques du produit par la production de composés aromatiques notamment de l'acétaldéhyde, élément majeur de l'arôme caractéristique du yaourt [PUJOL-DUPUY. 2004]. *L. bulgaricus* peut dégrader le glucose, le lactose et le galactose mais n'attaque ni les pentoses, ni le saccharose. L'acidification est importante [TERRE *in* SAHALI et KOURNANE. 1997].

## II. 4. Aptitudes technologiques

L'utilisation conjointe de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* présente des intérêts d'ordre technologique et nutritionnel.

### II. 4. 1. Acidification

L'acidification résulte de la dégradation d'une partie du lactose du lait (environ 30%) en acide lactique et aboutit à une forte diminution du pH inférieur qui passe dans le cas du yaourt de 6.6 à 4.5. cet abaissement est primordial puisqu'il provoque la gélification (coagulation) du lait d'une part et empêche le développement des germes indésirables, pathogènes et putréfiants d'autre part [TERRE. 1986] ;

La fermentation du lactose par les deux bactéries du yaourt s'effectue selon la voie homofermentaire de la glycolyse [ACCOLAS et al. 1980 ; DESMAZEAUD. 1991 ; DELLAGLIO. 1984 ; TERRE. 1986]. Le glucose est converti en acide lactique selon la voie d'Embden Meyerhof Parnas (EMP), alors que le galactose serait excrété dans le milieu de culture, ce qui explique la présence de ce sucre dans certains laits fermentés. DELLAGLIO (1984), SCHMIDT et al. (2002), précisent que la quantité d'acide lactique produite peut varier selon l'environnement de l'espèce ou parmi les espèces en fonction du substrat et des conditions de développement.

En effet, *Lactobacillus\_bulgaricus*, dans le lait ne produit jamais plus de 1,8% d'acide lactique, quant à *Streptococcus\_thermophilus*, il produit en général 0,5% à 0,6% d'acide lactique [DELLAGLIO. 1984]. L'acide lactique produit par *Lactobacillus\_bulgaricus* est de configuration D (-) par contre celui produit par *Streptococcus\_thermophilus* est l'isomère L (+). Cette dernière présente la forme la plus digestible ; elle varie entre 40 à 70% de l'acide lactique présent. Dans le yaourt l'acidité recherchée est de 80 à 120°D [TERRE. 1986]. Enfin la quantité d'acide lactiques produite par les espèces du genre *Lactobacillus* (espèce thermophile) est supérieure à celle formée par les autres genres utilisés industriellement pour d'autres produits *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Leuconostoc* [DESMAZEAUD et SCHMIDT in DOUMANDJI. 1997].

### II. 4. 2. Production d'arôme

La fermentation lactique par *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* ne libère pas uniquement de l'acide lactique mais également un certain nombre de composés secondaires (aromatiques) dont les principaux sont : l'acide formique, l'acide acétique, l'éthanol, l'acétone, l'acétoïne, le diacétyl et l'acétaldéhyde [BOTTAZI et al. TERRE; GEORGALA et al. In SAHALI et KOURNANE. 1997].

En 1979, DUMONT et ADDA ont attribué un rôle de premier plan à l'acétaldéhyde dans la formation de l'arôme du yaourt alors que, DELLAGLIO (1984) considère que le rapport l'acétaldéhyde/l'acétoïne est également essentiel dans l'arôme du yaourt.

La production de l'acétaldéhyde est avant tout, le fait de *L. bulgaricus*. L'acétaldéhyde est formé à partir du pyruvate par décarboxylation. Il est toutefois, vraisemblable que, dans le cas des bactéries du yaourt, le pyruvate formé à partir du lactose est affecté en totalité à la production d'acide lactique afin de permettre la glycolyse de se poursuivre [SUZUKI et al *in* ACCOLAS et al. 1980].

### II. 4. 3. Elaboration de la texture

La texture est élaborée par les bactéries lactiques qui synthétisent plusieurs types d'agent texturants, des polysaccharides. Certains sont les constituants de la paroi, tels que les peptidoglycane et les acides teichoïques, d'autres sont élaborés et excrétés dans le milieu de culture sous forme de polymères, généralement des polysaccharides exocellulaires [CERNING. 1990]. Ce même auteur souligne que la production des polysaccharides exocellulaires par les bactéries lactiques thermophiles et mésophiles a souvent été estimée indirectement par le développement de la viscosité, ou simplement par estimation sensorielles de la consistance, de la résistance à l'écoulement ou d'un caractère filant du produit.

DELLAGLIO (1984) ; LOONES (1989) ; ZOURARI et al. (1991) ; HASSAN et al. (1996), considèrent que l'élaboration de polysaccharides dans le yaourt peut augmenter la viscosité de celui-ci et confère une agréable texture, par l'augmentation de la résistance aux manutentions notamment les traitements mécaniques du yaourt brassé tout en diminuant la susceptibilité à la synérèse. Ceci serait dû à la formation de filaments par les polysaccharides qui renforceraient la cohésion entre les différents constituants du caillé.

Des travaux de CERNING et al. (1990), ont montré qu'une souche épaississante de *L. bulgaricus* produit dans le lait un polysaccharide viscosifiant composé de galactose, glucose et rhamnose dans un rapport 4/1/1 respectivement. Par contre, les souches épaississantes de *S. thermophilus* élaborent en culture sur lait un polysaccharide composé essentiellement de galactose (52%) et de glucose (36,2%). De petites quantités de pentose (4,9%), de rhamnose (2%) et de mannose (4,9%) ont été décelées également. Lorsqu'une souche de *S. thermophilus* épaississante est associée à une souche de *L. bulgaricus* non épaississante, le glucose devient le monomère prédominant (56%) et le galactose ne représente que 41% environ [CERNING. 1990] En revanche, GROUX (1973), a trouvé que

le monomère prédominant dans le polysaccharide sécrété par *L. bulgaricus*, était le galactose, avec présence de faibles quantités de mannose, d'arabinose et de glucose. [SAHALI et KOURNANE. 1997].

#### II. 4. 4. Activité protéolytique

Les bactéries lactiques sont dotées de systèmes protéolytiques complexes (par leur nature et leur localisation). Elles possèdent des exopeptidases également associées aux enveloppes cellulaires [SCHMIDT et al. in SAHALI et KOURNANE. 1997].

En effet, certaines espèces possèdent une bonne activité protéolytique, c'est le cas de *L. bulgaricus* qui dégrade la caséine du lait et libère des peptides de plus petit poids moléculaire qui seront par exemple à leur tour dégradés en tri et dipeptides ou en acides aminés par *S. thermophilus* qui lui, par contre possède une faible activité protéolytique. Ceci explique le phénomène de symbiose existant entre ces deux espèces dans la fabrication du yaourt. [CHANDAN. 1982 ; ALAM. 1983 ; MARTEAU in LOONES . 1989 ; GROSEVA et al. 1994]. En revanche, SHAHBAL et al. (1991) ont trouvé que certaines souches de *S. thermophilus* douées d'activité protéolytique très forte ; ce qui explique d'après eux leur forte vitesse d'acidification du lait. [SAHALI et KOURNANE. 1997].

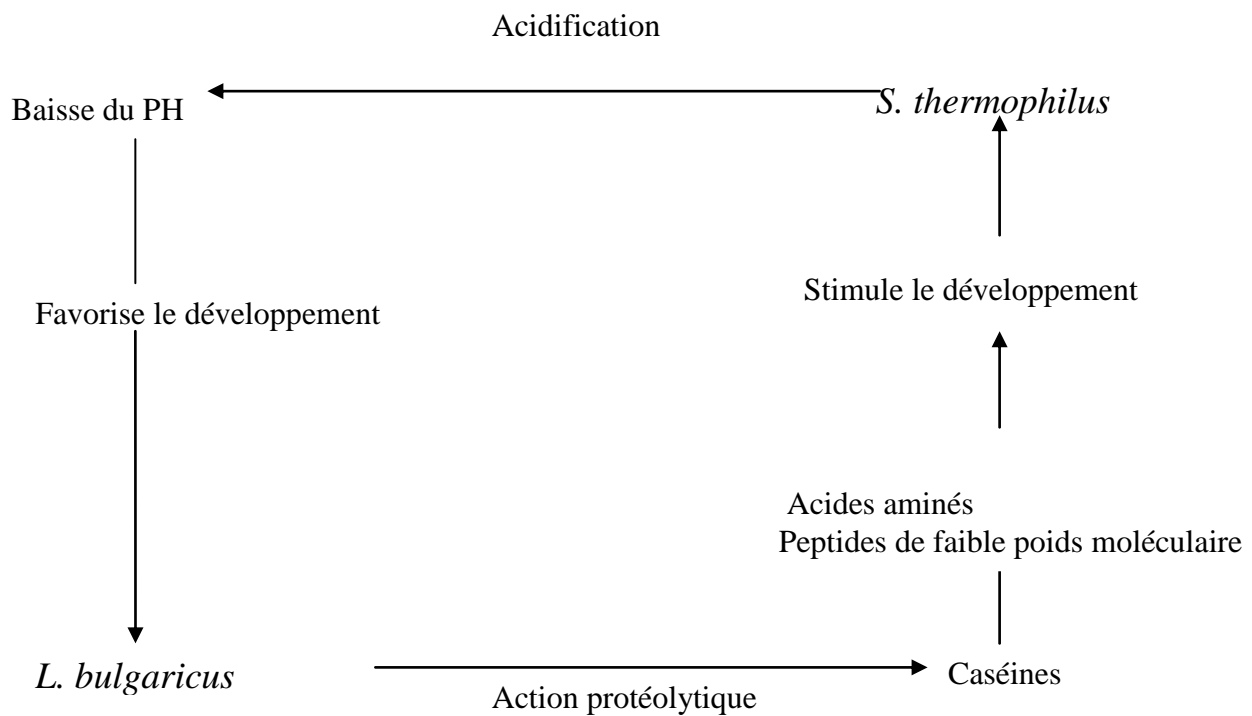
Quant aux travaux de SCHMIDT et al. (2002) réalisés sur 42 souches de *S. thermophilus*, prouvent que leur activité protéolytique à l'égard des caséines était plus importante que celle des lactocoques. Cependant, l'activité protéolytique de *L. bulgaricus* présente une grande hétérogénéité (niveau de l'activité, la localisation des enzymes et la nature des composés libérés). En règle générale, les espèces thermophiles possèdent une activité protéolytique supérieure à celle des mésophiles [SAHALI et KOURNANE. 1997].

#### II. 5. Caractéristiques symbiotiques

L'avantage primordial de l'utilisation de l'association de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* est la symbiose existante entre ces deux espèces. *S. thermophilus* étant donné ses caractéristiques, se multiplie dans un premier temps ; arrivée à un certain pH, son action se ralentit, tandis que *L. bulgaricus* poursuit son activité fermentaire jusqu'à ce que le pH arrive à 4,3 – 4,2. Le rapport *Streptococcus/lactobacillus* s'équilibre à ces valeurs et l'arôme s'affine [DELLAGLIO. 1984].

KOROLEVA et KONDRANTENKO rapportés par BEAL et al. (1994) précisent que la qualité d'acide lactique issue de la dégradation du lactose est importante avec des espèces en mélange. Ces mêmes auteurs ont également obtenu des effets bénéfiques de l'association sur la texture et le temps de coagulation du lait.

La symbiose entre *S.thermophilus* et *L.bulgaricus* se manifeste donc bien à différents égards et outre les technologiques et nutritionnels qui en résultent, il faut noter que les cultures mixtes présentent une plus grande stabilité que les cultures monospécifiques [ACCOLAS et al. in SAHALI et KOURNANE. 1997]. Enfin, d'après les travaux de RADKE-MICHEL et SANDINE (1986) ; SCHMIDT et al. (2002) ; GROZEVA et al. (1994), on peut dire qu'il existe bien un effet synergique de l'utilisation de ces deux bactéries, celui-ci s'établit selon le mécanisme schématisé ci-après :



**Figure 02:** Représentation schématique de symbiose entre *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* adaptée de GROZEVA et al. (1994)