

Nutrition

Réf :
107 556

Français – p 1

Kit initiation à la microbiologie : Les bactéries du yaourt

Version : 7101

1. Introduction

Le yaourt est le résultat de la fermentation du lait sous l'action de 2 bactéries lactiques qui agissent successivement, le développement de l'une favorisant l'action et la croissance de l'autre.

Au quotidien, nous avons tendance à regrouper sous la dénomination de « yaourt » de nombreux laitages. Cependant en France, la dénomination "yaourt " ou "yoghourt " est définie précisément par le décret N°88-1203 relatif aux laits fermentés :

*La dénomination « yaourt » ou « yoghourt » est réservée au lait fermentéensemencé des seules bactéries lactiques *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*. Elles doivent être vivantes à raison d'au moins 10 millions de bactéries par gramme pendant toute la durée de vie du produit. En France, les produits traités thermiquement après fermentation n'ont pas le droit à l'appellation « yaourt ».*

Les kits ont été conçus pour des manipulations en classe sans matériel particulier, les ferments lactiques produisant de l'acide lactique, ils créent une barrière naturelle aux développements d'autres microorganismes. Les conditions stériles ne sont pas obligatoires. Cependant les activités ont pour objectif d'être une initiation aux techniques de microbiologie, c'est l'occasion de mettre en pratique quelques règles de bases dans l'organisation et les gestes afin de limiter les risques de contaminations des cultures.

- Le matériel et les tubes doivent être très propres et secs.
- En atmosphère non stérile, limiter les mouvements d'air créés par les déplacements et la respiration, réduire les temps d'ouverture des tubes.
- Les manipulations se font sur une paillasse qui a été désinfectée à l'eau de javel diluée ou avec un détergent désinfectant
- Manipuler avec des gants pour éviter les contaminations

Composition du kit - pour 10 postes :

- *Lactobacillus bulgaricus* (LB) : 1g environ de ferments lyophilisés en microtube
- *Streptococcus thermophilus* (ST) : 1g environ de ferments lyophilisés en microtube
- Mélange yaourt traditionnel onctueux LB/ST (M) : 1g environ de ferments lyophilisés en microtube
- 70 tubes stériles*
- Pipette compte-gouttes
- Milieu minimum prêt à l'emploi : 200 mL
- 5 mL de lactose

* Il est possible de réutiliser les tubes : les laver à l'aide de liquide vaisselle, bien les rincer et laisser sécher à l'envers.

Stockage et conservation

	Stockage	Conservation avant ouverture
Ferments lactiques	-20°C à +8 °C	Plusieurs mois à – 20°C, 6 semaines à 4°C

La recette traditionnelle du yaourt

Ensemencement

L'ensemencement se fait directement par versement des ferments dans le lait, en adaptant la quantité de ferment au volume de lait. La température d'ensemencement est de 43 °C. Dans le cas d'une yaourtière, celle-ci étant pré-réglée, on peut utiliser du lait froid (de préférence sorti à l'avance du réfrigérateur pour qu'il ne soit pas trop froid), ou bien le faire bouillir puis tiédir avant emploi, un lait tiède suffit pour l'ensemencement.

(Au préalable, si on souhaite réactiver les ferments, on peut les mélanger dans un peu de lait 1 heure avant).

Mélanger jusqu'à l'obtention d'une préparation homogène. Terminer en ajoutant les éventuels autres ingrédients : sucre ou arômes naturels. Verser le mélange dans le(s) pot(s).

Etuvage (la fermentation)

En yaourtière : Placer les pots sans les couvercles dans la yaourtière. Mettre le capot. Appuyer sur le bouton de mise en marche. 8 à 12 h après, débrancher l'appareil. Laissez le capot en place pendant la préparation.

En incubateur : 43°C-45°C – 2 à 3 heures

Placer les pots sans les couvercles dans l'incubateur, veiller à respecter les conditions d'hygiène alimentaire si les yaourts seront par la suite dégustés par les élèves.

→ Pour les intolérants au lactose, il est conseillé de laisser la préparation se faire pendant 24h = pour que tout le lactose du yaourt soit transformé en glucose et galactose facilement digestibles.

Refroidissement

Quand le cycle est terminé, il ne faut pas placer les yaourts aussitôt au réfrigérateur, mais attendre que leur température redescende naturellement. Fermer les pots avec les couvercles.

→ Lorsque les yaourts sont prêts, les placer pendant une heure minimum au réfrigérateur avant de les consommer (idéalement 3 à 4 heures). Ils vont devenir encore un peu plus fermes les jours suivants leur préparation.

→ Il est normal qu'une condensation se forme sur le couvercle de la yaourtière pendant la préparation des yaourts.

Remarques

La teneur du lait en matières grasses et en solides influencent la texture, la saveur et la valeur nutritive du yaourt : du lait entier donne un yaourt plus ferme, plus savoureux, plus gras et plus énergétique qu'un yaourt fait à partir de lait écrémé.

L'ajout de poudre de lait épaissit le yaourt, le rend plus onctueux et augmente sa valeur nutritive.

Si le yaourt n'épaissit pas, plusieurs facteurs peuvent être en cause : température de préparation trop haute ou trop basse, temps de préparation trop court ou faible teneur en extrait sec (poudre de lait).

Si le yaourt est aigre ou que le sérum se sépare, la préparation peut avoir été trop longue ou le refroidissement trop lent. Une température de préparation basse (42-44°C) favorise le streptocoque et donc la production d'arômes ; une température plus haute (45-46°C) favorise le lactobacille et donc la production d'acide.

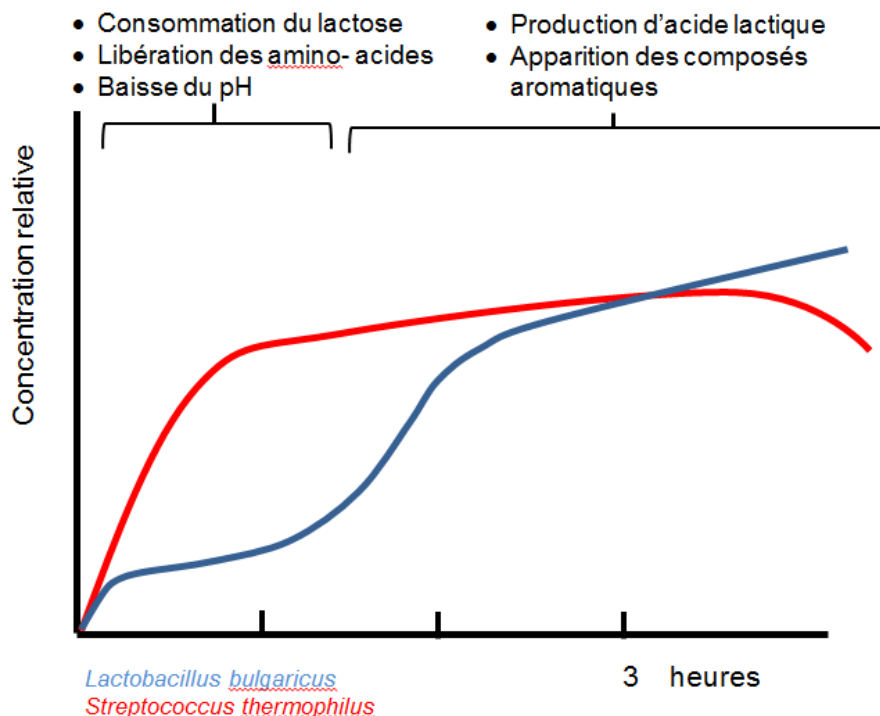
2. Activités

2.1 Présentation

Au cours des activités, le rôle respectif de chaque espèce de bactéries lactiques est mis en évidence de façon simple et expérimentale. Les bactéries lactiques offrent un support d'une innocuité totale permettant d'étendre les champs d'investigation aux paramètres régissant le développement microbien : température, oxygénation, pH etc...

La fabrication du yaourt

Après l'ensemencement du lait par l'ajout de bactéries, il faut porter l'ensemble à une température de 43°C pendant plusieurs heures, ces conditions favorisant le développement rapide de la flore bactérienne. En premier, *Streptococcus thermophilus* acidifie rapidement le milieu en transformant le lactose en acide lactique. *Lactobacillus bulgaricus* moins acidifiante, et moins rapide en développement intervient dans un second temps en apportant des substances (acides aminés) à *S.thermophilus* favorisant son développement puis en élaborant des substances aromatiques qui vont conférer au yaourt des caractéristiques organoleptiques spécifiques. Lorsque l'acidité du lait atteint un certain seuil, les caséines (protéines du lait) coagulent et forment ainsi le gel caractéristique du yaourt.



2.2 Culture avec du lait

Observation de culture individuelle des ferments sur du lait à comparer avec la culture du mélange de yaourt traditionnel (LB/ST)

Matériel nécessaire pour 1 groupe :

- 3 tubes à hémolyse
- Ferments LB / ST / mélange
- 3 à 4 mL de lait par tube



Mise en œuvre préconisée : ensemencement direct

Conseil : le professeur prépare une quantité pour toute la classe.

Exemple de mode opératoire : prendre un bœcher avec 50 mL de lait. A l'aide d'une spatule parfaitement propre, prendre environ 1/5 du tube de bactéries lactiques ou du mélange et bien mélanger. Répartir 4 mL par tube.

Exemple pour 10 groupes : 30 tubes + témoin (lait)

		Tubes	Vol de lait	Ferment
N°1	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10	40 mL	0,20 g
N°2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	10	40 mL	0,20 g
N°3	Mélange LB/ST	10	40 mL	0,20 g
TOTAL		30 tubes	120 mL	0,60 g

Estimation de la quantité de ferments (approximativement) 0,20 g = 1/5 du microtube

Incubation : 6 h à 44 °C

Yaourtière ou incubateur : bouchon non obligatoire

En bain marie : bouchon conseillé

Eteindre, laisser refroidir et mettre au frigo ⇒ 4 °C

Yaourtière = suivre le protocole de la yaourtière ⇒ 8 h et mettre au frigo ⇒ 4 °C

Les observations peuvent se faire plusieurs jours après la fermentation.
 Résultat attendu : Texture à l'intérieur du tube n°3 (LB/ST), texture ferme et acidité faible.

1- Observation par analyse sensorielle, on se limitera au touché, à l'aspect visuel et à l'odorat :

- Une observation visuelle : couleur, éclat
- Texture : on peut comparer la viscosité en touchant avec une spatule et en écrasant entre 2 doigts
- Odeur : sentir les arômes

2- Mesure du pH avec papier pH

Résultats attendus :

	Texture	Petit lait	Odeur	pH
Mélange LB/ST	Ferme	+	Yaourt	5,5
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Visqueux Manque de fermeté	-	Crème	6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ferme	++	Yaourt acidulé	4,5

Peut-on goûter les préparations ?

Nous vous conseillons d'utiliser une yaourtière, avec des volumes de lait plus important et moins de ferments (1gr pour 5-10 L). Les mélanges lait / ferments sont réalisés par le professeur qui utilisera le matériel (pot en verre) et le protocole associés à la yaourtière dans le respect des bonnes pratiques alimentaires.

2.3 Culture sans lait

Observation de culture individuelle des ferments sur milieu minimum

La culture dans le milieu minimum permet de visualiser, de par sa transparence, la croissance des bactéries. Plus le développement est important, plus le trouble observé est important.

Peut-on cultiver les bactéries sans lait ? De quel nutriment ont besoin les bactéries pour se développer ? Les bactéries ont-elle le même comportement ?

On propose de tester en parallèle

- Le mélange LB/ST
- *Lactobacillus bulgaricus*
- *Streptococcus thermophilus*

Matériel nécessaire pour 1 groupe :

- 6 tubes à hémolyses stériles
- Milieu minimum prêt à l'emploi sous forme liquide
- Lactose en poudre

	Milieu minimum	Milieu minimum + lactose
Mélange (LB/ST)	M mi	M lac
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	LB mi	LB lac
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST mi	ST lac

Il est à noter que les lyophilisats bactériens peuvent contenir un peu de lait (utilisé comme cryoprotecteur). De ce fait, on peut constater le développement bactérien sur milieu minimum en absence de sucre ajouté, ce développement étant favorisé par le lactose du lait lyophilisé, faussant la lecture du témoin négatif (milieu minimum).

Pour limiter ce désagrément, il faut diminuer la dose de bactéries inoculées dans les tubes, grâce à un ensemencement indirect.

Mise en œuvre préconisée : ensemencement indirect

Conseil : le professeur prépare la solution mère, les élèves feront l'ensemencement à l'aide d'une pipette 1 mL.



Volume approximatif
équivalent à 0,1 g

2.3.1 Préparation de la solution d'ensemencement (ferment revivifié)

- 10 mL d'eau (idéalement stérile ou une eau minérale, type Volvic, d'une bouteille récemment ouverte) dans un récipient propre : tube à essai, bécher...
- Prélever 0.1g du ferment (<1/5 du tube)
- Mélanger par agitation

10 mL permettent d'ensemencer 20 tubes.

2.3.2 Préparation des tubes de milieu pour 5 groupes

Pour chaque tube de milieu minimum verser directement 3,5 mL de milieu
 30 tubes = 52,5 mL

Milieu minimum + lactose à 20 g/L

- 55 mL de milieu minimum
- Ajouter 0,11g de lactose
- Agiter
- Répartir 3,5 mL par tube

En suivant un protocole pour 5 groupes, identique à celui-ci, il est possible de faire 2 tests complémentaires avec les 90 mL de milieu restant.

⇒ Peut-on utiliser n'importe quel sucre?

Le lactose est le sucre présent naturellement dans le lait : 4,7 à 6,5 g / 100g. Il est découpé en glucose et galactose.

Les souches bactériennes utilisées sont hétérofermentaires, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas spécifiques du lactose, par contre il faut que le sucre apporte du glucose. On peut donc, en activités complémentaires, réaliser d'autres tests avec d'autres sucres tels que le glucose ou le saccharose. Par contre, si on utilise du galactose pur, il n'y a pas de croissance car il n'est pas métabolisé.

2.3.3 Ensemencement des tubes avec le milieu de culture

Ensemencer chaque tube à l'aide de la pipette 1 mL :

- Remettre en suspension à l'aide de la pipette
- Attendre quelques seconde afin d'éviter de prélever les particules au fond du tube
- Ajouter 0,5 mL de solution de ferment revivifié

Ainsi, vos milieux de départ seront translucides (de très fines particules de l'inoculum sont visibles sur le fond).

Exemple pour 5 groupes : 30 tubes

		Milieu minimum	Milieu minimum + lactose
N°1	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	10 tubes	10 mL
N°2	<i>Streptococcus thermophilus</i>	10 tubes	10 mL
N°3	Mélange LB/ST	10 tubes	10 mL
TOTAL		30 tubes	120 ml

2.3.4 Comment mesurer le développement ?

Observation à l'œil nu

Avec le développement des bactéries, les milieux se troublent progressivement. Après 3 heures, apparaissent des particules solides blanchâtres, signe d'un développement important de la population. Après plusieurs jours (à température ambiante), les amas de cellules sont de plus en plus visibles et sédimentent au fond du tube. Plus il y a d'amas, plus il y a de bactéries.

Techniques de mesure du suivi de croissance

Mesure de l'absorbance à l'aide d'un colorimètre

Principe : Le colorimètre émet un faisceau lumineux qui peut être absorbé par les cellules bactériennes, proportionnellement à la quantité présente dans le milieu. On mesure l'absorption au voisinage de 470 nm. Le milieu étant dans la teinte jaune, il absorbe dans le violet, ce qui nous intéresse ce sont les cellules bactériennes qui absorbent plus dans les teintes jaune à orange.

Agiter et homogénéiser le tube avant la mesure.



Colorimètre 1-G7



Turbidimètre

Turbidité : à l'aide d'un turbidimètre

Le principe est le même que précédemment. On mesure la dispersion du faisceau lumineux monochromatique qui est proportionnelle aux nombres de cellules rencontrées entre l'émetteur et le capteur.

Ce sont deux techniques rapides et fiables (ce sont des estimations). Pour le comptage plus précis, les microbiologistes utilisent des techniques de dénombrement (cellule de Kova, étalement, compteur électronique).

Mesure du pH

Matériel nécessaire :

Papier pH

La mesure du pH est un bon indicateur de l'activité bactérienne.

Le lactose est découpé en glucose et galactose.

Le glucose est transformé par le métabolisme des bactéries en acide lactique, qui s'accumule dans milieu.

Résultat :

Le milieu minimum apporte protéine et lipide. La source de carbone est apportée par le lactose.

On constate visuellement la présence des cultures par l'apparition d'un trouble du milieu.

Une observation régulière les premières heures de développement à 44°C permet de mettre en évidence la différence de comportement de 2 souches bactériennes.

L'odeur caractéristique du yaourt

Lorsque le développement est très prononcé (milieux avec sucre), l'analyse olfactive par comparaison avec le témoin sans bactérie est très intéressante.

Les bactéries ont produit de l'acide lactique et des composés aromatiques, ainsi les effluves sont similaires à celles d'un yaourt : on sent l'odeur caractéristique du yaourt.

Le pH et l'acide lactique

A l'aide du papier pH, on peut distinguer clairement la production d'acide lactique. En milieu minimum le pH se situe à 6-7, sur les milieux avec lactose (sucre) le pH est de 4,5.

2.4 Effet de la température sur le développement d'une bactérie lactique

Modification des paramètres de développement : Tests à différentes températures

Matériel fourni :

- Tubes à hémolyse
- *Lactobacillus bulgaricus* (LB) et/ou *Streptococcus thermophilus* (ST)

Préconisation : Travailler sur les bactéries seules, afin de vérifier qu'elles ont le même comportement.

Milieu : lait ou milieu minimum + lactose

Dose ensemencement : 0,20g pour 50 mL environ

Déroulement :

- 1- Ensemencement sur du lait ou sur bouillon lactose (au choix suivant les quantités disponibles et les activités sélectionnées par le professeur)
- 2- Stockage pendant 20 à 30 minutes minimum à 4 températures différentes ($t = -20^{\circ}\text{C}$; $t = +4^{\circ}\text{C}$; $t = t^{\circ}\text{ ambiante}$ et $t = +90^{\circ}\text{C}$ (faire bouillir le lait pendant 20 minutes)
- 3- Chaque milieu est ensuite incubé à 44°C

Incubation : 6 h à 44°C

(si utilisation d'un bain-marie : bouchon conseillé)

Laisser refroidir et mettre au réfrigérateur $\Rightarrow 4^{\circ}\text{C}$

Yaourtière = suivre protocole yaourtière $\Rightarrow 8$ h et mettre au frigo $\Rightarrow 4^{\circ}\text{C}$

Résultat attendu : seul le lait ayant subi un traitement thermique à plus de 90°C ne fermente pas.

2.5 Observation des ferments au microscope

L'observation des bactéries lactiques est une étape incontournable dans notre étude. La traditionnelle méthode du frottis de yaourt est assez délicate. On peut lui préférer le montage d'une petite quantité de ferment lyophilisé réhydraté colorée au bleu de méthylène. Ceci permet une plus grande autonomie de l'élève.

Matériel nécessaire :

- Ferments yaourt traditionnel (25 LB /75 ST) ou ferments «onctueux» (20 LB /80 ST) réhydraté dans très peu d'eau (aspect «laiteux»)
- Bleu de méthylène dilué
- Lame et lamelle,
- Baguette de verre,
- Aiguille lancéolée
- Microscope relié à un appareil photo ou une caméra numérique

3. Service après-vente

Pour toute question, contacter le **Support Technique** au **0 825 563 563**.

Le matériel doit être retourné dans nos ateliers et pour toutes les réparations ou pièces détachées, veuillez contacter :

JEULIN – S.A.V.

468 rue Jacques Monod

CS 21900

27019 EVREUX CEDEX France

0 825 563 563*

* 0,15 € TTC/min. à partir un téléphone fixe

Annexe : Fiche de comparaison lait yaourt

Composition pour 100 g	
Lait ½ écrémé	Yaourt (fabriqué à partir de ce même lait ½ écrémé)
Eau 89,2	Eau 88,4
Glucides: <ul style="list-style-type: none"> Lactose : 4,7 à 6,5 g 	Glucides <ul style="list-style-type: none"> Lactose: 3,3 à 4,0 g Galactose: 0,7 à 1,5 g Traces de glucose (< 0,05 g)
Protides: 3,8 g <ul style="list-style-type: none"> Protéines non enzymatiques en quantité importante *Caséine 3 g, soluble *Albumine 0,3 g *Autres 0,5 g <ul style="list-style-type: none"> Protéines enzymatiques: traces (amylases, lipases, protéases) 	Protides: 4,3 g <ul style="list-style-type: none"> Protéines non enzymatiques : Caséine (insoluble) , Albumine, Autres . En proportion, elles sont présentes en quantité moindre par rapport au lait Protéines enzymatiques: en quantité importante :(amylases, lipases, protéases) Acides aminés <i>En pratique, on rajoute des protéines sous forme de lait en poudre afin d'augmenter la consistance du yaourt. Ainsi en moyenne un yaourt contient 3,2 à 5 % de protides.</i>
Lipides : 1,6 g Glycérides, Phospholipides, Stérols	Lipides : 1,1 g Glycérides, Phospholipides, Stérols
Sels minéraux : Calcium : 0,1 g Phosphore : 0,1 g	Sels minéraux : Calcium : 0,15 g Phosphore : 0,1 g
Vitamines : traces	Vitamines : traces
Gaz dissous : 5 % du volume	Composés aromatiques : acétaldéhyde, cétone, diacétyl, ...
Acide lactique : < 0,18 g (pour un lait frais)	Acide lactique : 1 g
	Bactéries : 100.10 ⁶ / g



Assistance technique en direct

Une équipe d'experts
à votre disposition
du lundi au vendredi
de 8h30 à 17h30

- Vous recherchez une information technique ?
- Vous souhaitez un conseil d'utilisation ?
- Vous avez besoin d'un diagnostic urgent ?

Nous prenons en charge
immédiatement votre appel
pour vous apporter une réponse
adaptée à votre domaine
d'expérimentation :
Sciences de la Vie et de la Terre,
Physique, Chimie, Technologie.

Service gratuit*

0 825 563 563 choix n°3**

* Hors coût d'appel. 0,15 € TTC/min à partir d'un poste fixe.

** Numéro valable uniquement pour la France métropolitaine et la Corse. Pour les DOM-TOM et les EFE, composez le +33 2 32 29 40 50.

Aide en ligne
FAQ.jeulin.fr



Direct connection for technical support

A team of experts
at your disposal
from Monday to Friday
(opening hours)

- You're looking for technical information ?
- You wish advice for use ?
- You need an urgent diagnosis ?

We take in charge your request
immediatly to provide you
with the right answers regarding
your activity field : Biology, Physics,
Chemistry, Technology.

Free service*

+33 2 32 29 40 50**

* Call cost not included.

** Only for call from foreign countries.



468, rue Jacques-Monod, CS 21900, 27019 Evreux cedex, France

Métropole • Tél : 02 32 29 40 00 - Fax : 02 32 29 43 99 - www.jeulin.fr - support@jeulin.fr

International • Tél : +33 2 32 29 40 23 - Fax : +33 2 32 29 43 24 - www.jeulin.com - export@jeulin.fr

SAS au capital de 1 000 000 € - TVA intracommunautaire FR47 344 652 490 - Siren 344 652 490 RCS Evreux